



**Universidad Nacional del Comahue**  
**Centro Regional Universitario Bariloche**

**“CAPACIDAD PROBIÓTICA DE MICROORGANISMOS  
AUTÓCTONOS DE PATAGONIA PARA EL CONTROL  
DE PATÓGENOS DE USUAL OCURRENCIA EN  
ACUICULTURA”**

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en  
Biología**

**Lic. Marisa Elisabeth Garcés**

**Director de Tesis: Dra. Cynthia Sequeiros**

**Co-Directores de Tesis: Dra. Nelda Lila Olivera**

**Dr. Miguel Ángel Battini**

**Año: 2018**

## RESUMEN

La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimento de más rápido crecimiento que provee actualmente casi la mitad de todo el pescado para consumo humano. Con la acuicultura intensiva en expansión a nivel mundial, los riegos asociados a la aparición y transmisión de bacterias patógenas aumentan. Un probiótico para acuicultura es un suplemento microbiano vivo que proporcionado a través de la dieta o en el agua beneficia la condición de los peces modificando la flora asociada a los mismos y al ambiente, mejorando el valor nutricional de los alimentos, la respuesta inmunológica de los peces, la eficiencia reproductiva, y la calidad del agua y del ambiente que los rodea. El objetivo de esta Tesis fue aislar cepas bacterianas autóctonas de ambientes acuáticos de la región patagónica y estudiar sus propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo*, para evaluar su potencial utilidad en acuicultura. A partir de muestras del tracto gastrointestinal de organismos acuáticos de Patagonia se obtuvieron 149 aislamientos. Utilizando la técnica de la doble capa, se detectaron 58 aislamientos con actividad antimicrobiana contra alguno de los patógenos indicadores *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* y *Carnobacterium piscicola*. De dichos aislamientos, las únicas cepas cuya actividad antimicrobiana fue del tipo extracelular fueron T4, T15 y M5, y sólo contra *C. piscicola*. Estas cepas correspondieron al género *Carnobacterium* (99,93% homología en la secuencia del gen ARNr 16S con *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20345(T)). Además, se sumó al estudio la cepa H16, previamente aislada y parcialmente caracterizada, con actividad antimicrobiana extracelular contra *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y *V. alginolyticus*. La secuencia del gen ARNr 16S de H16 mostró 100% de homología con la de *Lactobacillus pentosus* JCM 1558(T). *Carnobacterium* sp. T4, *Carnobacterium* sp. T15, *Carnobacterium* sp. M5 y *Lactobacillus pentosus* H16 mostraron baja resistencia a los antibióticos y ausencia de actividad hemolítica, las cuales son características positivas en cuanto a la seguridad microbiológica de estas cepas. La actividad antimicrobiana contra *V. alginolyticus* y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* presentada por H16 estuvo asociada con la producción de ácidos orgánicos. En cambio, la actividad antimicrobiana presentada por las cepas T4, T15 y M5 contra *C. piscicola* fue causada por la producción de bacteriocinas. Debido a la producción temprana del agente antimicrobiano y a su mayor título de inhibición, T4 fue elegida entre las cepas del género *Carnobacterium* para continuar los estudios. Así, las propiedades probióticas de T4, H16 y *Lactococcus lactis* TW34 (una cepa proveniente de la colección del laboratorio) fueron evaluadas en ensayos *in vitro* e *in vivo*. T4, H16 y TW34 mostraron tolerancia a la bilis de trucha arco iris (TAI) y resistencia a pH ácido, sugiriendo que podrían adaptarse a las condiciones del tracto digestivo de los peces. Además, las tres cepas fueron capaces de adherirse al mucus de TAI. La capacidad de adhesión al mucus es una condición favorable para posibilitar la colonización del intestino del pez. En particular, H16 fue capaz de inhibir la adhesión de *V. alginolyticus* y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* al mucus de TAI, bioencapsularse en nauplios de *Artemia franciscana* y protegerlos de la infección con *V. alginolyticus*. Estos resultados sugieren que H16 se podría administrar a través de portadores vivos, por ejemplo, en el cultivo de larvas.

En ensayos *in vivo* utilizando el pez cebra como modelo, después de 14 días de administración de T4, H16 o TW34, los recuentos de bacterias totales disminuyeron en el intestino de los peces probablemente a expensas de las enterobacterias y *Vibrio* spp. que disminuyeron en promedio un orden y medio orden de magnitud, respectivamente. En cambio, las bacterias ácido lácticas (BAL) aumentaron aproximadamente dos órdenes de magnitud en los tres grupos tratados. T4 y TW34 se recuperaron del intestino sólo durante su administración mientras que H16 se recuperó 48 h después de la suspensión de su administración, con una abundancia similar a los valores registrados en el período de administración. Esto demostraría la capacidad de colonización del intestino del pez cebra de H16. En ensayos de crecimiento del pez cebra, también los recuentos de BAL en el intestino de los peces cebra fueron mayores y los de *Vibrio* spp. y enterobacterias menores que los del grupo control sin probiótico, luego de 90 días de tratamiento con T4, H16 o TW34. A su vez, el peso corporal promedio de los peces en los tratamientos con T4 o H16 fue significativamente mayor que en el control. Particularmente, los peces tratados con H16 presentaron una mayor tasa de crecimiento específica, un mejor factor de condición y un menor factor de conversión del alimento, comparado con el control. Así, el presente estudio demostró que existen microorganismos en los ambientes acuáticos de la región patagónica que cumplen con los criterios de selección de probióticos. Además, las cepas T4, H16 y TW34 lograron modificar la microbiota intestinal del pez cebra, promoviendo la población beneficiosa de BAL y disminuyendo otros grupos bacterianos conocidos por incluir patógenos oportunistas. La evaluación *in vivo* demostró que las cepas *L. pentosus* H16 y *Carnobacterium* sp. T4 tuvieron efectos positivos sobre el crecimiento del pez cebra. Por lo tanto, estas cepas son prometedoras para futuros estudios de desarrollo de alimentos probióticos para acuicultura.

## SUMMARY

Aquaculture is one of the fastest-growing food producing sectors and today provides almost half of all fish for human food. With worldwide intensive aquaculture expanding, the risks associated with the emergence and transmission of pathogenic bacteria increased. An aquaculture probiotic is a live microorganism which when provided via the diet or rearing water produces benefits on the host by modifying the host-associated or ambient microbial community, by ensuring improved digestion and feed utilization, by stimulating the immune system and the reproductive efficiency, and by improving the water quality and the surrounding environment. The main goal of the present Thesis was to isolate autochthonous bacterial strains from aquatic environments of the Patagonian region and to study their probiotic properties *in vitro* and *in vivo*, to evaluate their potential usefulness in aquaculture. From the gastrointestinal tract of aquatic organisms from Patagonia, 149 isolates were obtained. Using the double layer assay, 58 isolates with antimicrobial activity against at least one of the indicator pathogens *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, and *Carnobacterium piscicola* were detected. From them, only strains T4, T15, and M5 showed extracellular antimicrobial activity and just against *C. piscicola*. Such strains belonged to *Carnobacterium* genus (99.93% homology of rRNA 16S to *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20345(T)). Moreover, it was included in this study the strain H16, a previously isolated and partially characterized bacterium, with extracellular antimicrobial activity against *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and *V. alginolyticus*. H16 rRNA 16S gene sequence showed 100% homology to that of *Lactobacillus pentosus* JCM 1558(T). *Carnobacterium* sp. T4, *Carnobacterium* sp. T15, *Carnobacterium* sp. M5, and *Lactobacillus pentosus* H16 showed low resistance to antibiotics and absence of hemolytic activity. These are positive characteristics regarding microbial security of these strains. H16 antimicrobial activity against *V. alginolyticus* and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* was associated with organic acid production. In contrast, T4, M5, and T15 antimicrobial activity against *C. piscicola* was due to bacteriocin production. In view of T4 early production and high titer of antimicrobial activity, it was chosen among *Carnobacterium* strains to continue the studies. Thus, the probiotic properties of T4, H16, and *Lactococcus lactis* TW34 (a strain from the laboratory collection) were assessed through *in vitro* and *in vivo* experiments. T4, H16, and TW34 showed tolerance to rainbow trout bile and acid pH resistance, suggesting that they could adapt to the gastrointestinal tract conditions of fish. In addition, the three strains were able to adhere to rainbow trout mucus. This capability is a favorable property related with the possibility of colonizing the fish intestine. Particularly, H16 was able to inhibit the adhesion of *V. alginolyticus* and *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to rainbow trout mucus, to bioencapsulate in *Artemia franciscana* nauplii, and to protect them from *V. alginolyticus* infection. This suggests that it is possible to use live carriers in its administration, for instance in larvae culture. In *in vivo* experiments using the zebrafish as a model, after administrating T4, H16 or TW34 for 14 days, the total viable counts of bacteria significantly decreased in fish intestine which could be related with a declined in average of an order and a half order of magnitude of enterobacteria and *Vibrio* spp. counts, respectively. On the other

hand, lactic acid bacteria (LAB) increased approximately two orders of magnitude in the probiotic treated groups compared to the control. T4 and TW34 were recovered from the intestine only during their administration while H16 was recovered 48 h after suspending its administration, in a number similar to those registered in the administration period. This revealed the colonization capability of zebrafish intestine by H16. In zebrafish growth experiments, after 90 days of treatment with T4, H16, or TW34, intestine LAB counts were also higher and *Vibrio* spp. and enterobacteria lower than in the control group. At the same time, the fish weight of the group fed with T4 or H16 was significantly greater than the control. Particularly, the fish treated with H16 showed a higher specific growth rate, a better condition factor, and a lower feed conversion ratio than the control group. The present study demonstrated that there are microorganisms in aquatic environments of the Patagonian region that meet probiotic selection criteria. Furthermore, strains T4, H16, and TW34 modified zebrafish intestinal microbiota, promoting beneficial LAB population and reducing other groups which include opportunistic pathogens. The evaluation of growth parameters demonstrated that proposed probiotics *L. pentosus* H16 and *Carnobacterium* sp. T4 had positive effects on zebrafish growth. Therefore, these strains are promising for future studies of probiotic food development for aquaculture.

# ÍNDICE

Dedicatoria y Agradecimientos	1
Símbolos y abreviaturas	3
<b>CAPÍTULO I: Introducción general</b>	<b>4</b>
1-Acuicultura	5
2- Enfermedades bacterianas que afectan a la acuicultura	7
2.1- <i>Aeromonas salmonicida</i>	8
2.2- <i>Lactococcus garvieae</i>	8
2.3- <i>Yersinia ruckeri</i>	9
2.4- <i>Carnobacterium piscicola</i>	9
2.5- Situación sanitaria acuícola en Argentina	10
3- Medidas de control de las enfermedades bacterianas	11
3.1- Antibióticos	11
3.2-Tratamientos alternativos al empleo de antibióticos en acuicultura	13
3.2.1- Vacunación	13
3.2.2- Fagoterapia	13
3.2.3- Prebióticos	14
3.2.4- Probióticos para acuicultura	15
4- Bacterias ácido lácticas	17
5- Mecanismos de acción de los probióticos	20
5.1- Producción de compuestos antimicrobianos	20
5.1.1- Ácidos orgánicos	20
5.1.2- Peróxido de hidrógeno	21
5.1.3- Bacteriocinas	21
5.2- Competencia por sitios de adhesión y colonización	23
5.3- Mejoramiento de la respuesta inmune	24
5.4- Mejoramiento de la calidad del agua de cultivo	25

6- Criterios de selección de cepas probióticas	25
6.1- Seguridad de las cepas probióticas	26
6.2- Actividad antimicrobiana contra patógenos	27
6.3- Resistencia al pH y a bilis	27
6.4- Capacidad de adhesión	28
7- Utilización de <i>Artemia</i> como modelo invertebrado para el estudio de probióticos	28
8- Pez cebra como modelo vertebrado para acuicultura	30
9- Probióticos para acuicultura en Patagonia	31

## **OBJETIVO E HIPOTESIS** **33**

## **CAPÍTULO II: Materiales y métodos** **34**

1-Sitios de muestreo y ejemplares analizados	35
2- Medios de cultivo y condiciones de aislamiento	36
2.1- Actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar	38
2.2- Procedimientos y disposición de residuos peligrosos y patogénicos	39
3- Caracterización de las cepas seleccionadas	39
3.1- Tinción de Gram	40
3.2- Prueba de la catalasa	40
3.3- Identificación molecular	40
3.4- Capacidad hemolítica y susceptibilidad a los antibióticos	41
4- Producción del agente causante de la actividad antimicrobiana y su caracterización	42
4.1- Curva de crecimiento bacteriano y producción del agente antimicrobiano de las cepas T4, T15 y M5	42
4.2- Curva de crecimiento bacteriano y producción del agente antimicrobiano de la cepa H16	42
4.3- Cuantificación de actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células	43

4.4- Evaluación de ácidos orgánicos y proteínas de alto peso molecular	<b>43</b>
4.5- Sensibilidad a la catalasa	<b>44</b>
4.6- Sensibilidad a la tripsina	<b>44</b>
4.7- Identificación de bacteriocinas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS)	<b>45</b>
5- Propiedades Probióticas	<b>46</b>
5.1- Resistencia a la bilis	<b>47</b>
5.2- Resistencia al pH	<b>48</b>
5.3- Capacidad de adhesión	<b>48</b>
5.3.1- Test de hidrofobicidad	<b>48</b>
5.3.2- Adhesión selectiva al mucus de trucha arcoíris	<b>49</b>
5.3.3- Ensayo de exclusión competitiva contra patógenos de peces	<b>48</b>
	<b>51</b>
5.3.4- Evaluación de sustancias tensioactivas	<b>52</b>
6- Obtención de <i>Artemia franciscana</i> axénica	<b>53</b>
6.1- Efecto de <i>V. alginolyticus</i> y <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i>	<b>54</b>
6.2- Bioencapsulación de H16 en <i>Artemia franciscana</i>	<b>54</b>
6.3- Desafío <i>in vivo</i> de <i>Artemia franciscana</i> enriquecida con H16 frente a la acción de <i>V. alginolyticus</i>	<b>55</b>
7- Conservación de las cepas probióticas para los ensayos <i>in vivo</i>	<b>56</b>
8- Ensayos <i>in vivo</i> empleando el pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) como modelo experimental vertebrado	<b>57</b>
8.1- Diseño experimental: ensayo de colonización y ensayo de crecimiento	<b>58</b>
8.1.1- Análisis de la microbiota intestinal	<b>58</b>
8.1.2- Detección de las cepas probióticas en el intestino de los peces	<b>60</b>
8.2- Parámetros medidos durante el ensayo de crecimiento	<b>61</b>
8.3- Desafío de larvas de pez cebra con patógenos de peces	<b>62</b>
9- Análisis estadístico	<b>62</b>

**CAPÍTULO III: Aislamiento y selección de bacterias con potencial probiótico de la región patagónica** **65**

1- Introducción	66
2- Resultados y discusión	67
2.1- Aislamiento y selección de bacterias con potencial probiótico	67
2.2- Capacidad hemolítica y susceptibilidad a los antibióticos	73
2.3- Producción y caracterización del agente causante de la actividad antimicrobiana	76
2.3.1- <i>Carnobacterium</i> sp. T4, T15 y M5	76
2.3.2- <i>Lactobacillus pentosus</i> H16	81
3- Conclusión	84

**CAPÍTULO IV: Evaluación de las propiedades probióticas de *Carnobacterium* sp. T4, *Lactobacillus pentosus* H16 y *Lactococcus lactis* TW34** **85**

1- Introducción	86
2- Resultados y discusión	88
2.1- Propiedades probióticas relacionadas con la capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto intestinal de organismos acuáticos	88
2.1.1- Resistencia a la bilis y al pH ácido	88
2.1.2 Capacidad de adhesión	90
2.1.2.1 Test de hidrofobicidad y de adhesión	90
2.1.2.2. Exclusión competitiva sobre mucus de trucha arcoíris	92
2.2- Desafío <i>in vivo</i> de <i>Artemia franciscana</i> enriquecida con <i>L. pentosus</i>	94

3- Conclusión	99
---------------	----

<b>CAPÍTULO V: Evaluación del efecto probiótico <i>in vivo</i> de <i>Carnobacterium</i> sp. T4, <i>Lactobacillus pentosus</i> H16 y <i>Lactococcus lactis</i> TW34, utilizando el pez cebra como modelo</b>	<b>100</b>
---	------------

1- Introducción	101
2- Resultados y discusión	102
2.1- Conservación de las cepas probióticas para los ensayos <i>in vivo</i>	102
2.2- Evaluación del efecto de T4, H16 y TW34 sobre la microbiota intestinal del pez cebra, ensayo de colonización	105
2.3- Evaluación de las cepas probióticas como promotoras del crecimiento del pez cebra	111
2.3.1- Análisis de la microbiota intestinal a los 90 días de experimentación	115
2.4- Efecto de los patógenos usados en la presente tesis sobre larvas de pez cebra	117
3-Conclusión	119

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
---------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>124</b>
---------------------	------------

<b>ANEXO: Optimización de la cría y mantenimiento del pez cebra</b>	<b>155</b>
---	------------

1-Introducción	<b>156</b>
2-Diseño y construcción de los sistemas de recirculación	<b>157</b>
3-Adquisición de peces cebras	<b>160</b>
4-Optimización de los sistemas de recirculación	<b>161</b>
4.1-Calidad del agua, parámetros físicos y químicos	<b>161</b>
4.2-Optimización de los filtros biológicos	<b>164</b>
4.3-Limpieza	<b>166</b>
5-Alimentación	<b>167</b>
6-Optimización de la reproducción del pez cebras	<b>168</b>
7-Bibliografía	<b>172</b>

## **DEDICATORIA**

A Joaquín, Carlos, Nora y Teresa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Cynthia, por su ilimitado apoyo y su constante guía y por ponerse a trabajar codo a codo cuando fue necesario. Por su dedicación, tiempo, esfuerzo y las enseñanzas que con paciencia y cariño me brindó. Por su enorme predisposición y estar siempre presente sin importar horarios, feriados ni distancias y ayudarme a resolver todo lo que surgía y darme la confianza de que siempre contaba con ella.

A mi co-directora Nelda porque también actuó como mi directora, por su guía, sus constantes aportes, su capacidad para ordenar ideas y encaminarme. Por su dedición, tiempo y esfuerzo.

A mi co-director Miguel por haber aceptado la co-dirección de la presente Tesis Doctoral, su gran predisposición, sus consejos y generosidad.

A la Universidad Nacional del Comahue, en especial al departamento de Postgrado por darme la posibilidad de acceder a mi formación doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el PICT CAMEB-III 2012-1004.

Al CONICET por el proyecto PIP-112-2012-0100050 CO y el Proyecto de de Cooperación Internacional.

Al CENPAT, por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente trabajo. En especial al Laboratorio de Bioquímica (CECIMAR-CONICET) y al Laboratorio de Microbiología y Biotecnología (IPEEC-CONICET).

A la Dres. Carla Riva Rossi, David Galván, Cruz Sueiro, Marina Tagliaferro, Nicolás Ortíz y a la Lic. Estefanía Bagnato por su ayuda brindada en la recolección e identificación de las especies acuáticas utilizadas en este estudio.

A los técnicos Guillermo Mirena y Mabel Orellana y al Sr. Rodrigo Larraza del Centro de Salmonicultura de Bariloche por las truchas.

Al Dr. Sergio Martínez-Díaz y a la Dra. Bárbara González por sus enseñanzas en mi estadía en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR- IPN) en la ciudad de La Paz, México.

A Diana, Lucy, Eduardo y Érica, por hacer más grata mi estadía en México y por la ayuda brindada.

A Cecilia Castaños y Diana Bohn por su colaboración.

Al Tec. Acuarista Mariano Moris por la construcción de los sistemas de recirculación, su predisposición y toda su ayuda brindada que ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

A Noberto de Garín, responsable de la sala de óptica del CCT-CENPAT.

A la Dra. Marina Nievas por su colaboración y generosidad.

A Fernando Jaguer que siempre me ayudó a resolver los problemas con la compu y la tecnología.

A Melania por su compañerismo, su solidaridad, generosidad y colaboración.

También quiero agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional SIEMPRE. En especial a Joaquín, Carlos y Nora por el infinito amor y la paciencia.

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\Delta l$ : Ganancia de longitud del pez (mm)

$\Delta p$ : Ganancia de peso corporal del pez (mg)

**Abs**: Absorbancia

**ADN**: Acido desoxirribonucleico

**ATCC**: del inglés, American Type Culture Collection

**BAL**: Bacterias ácido lácticas

**CAA**: Código Alimentario Argentino

**DA**: Difusión en agar

**DC**: Doble capa

**dpf**: Días post fecundación

**DTT**: 1,4-Dithiothreitol

**E3**: Embriomedio

**EPSP**: Complejo exopolisacárido-proteína

**FCA**: Factor de conversión de alimento

**GRAS**: del inglés, generally recognized as safe

**H %**: Porcentaje de hidrofobicidad

**K**: Factor de condición

**LC- MS/MS**: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem

**MRS**: De Man Rogosa and Sharpe

**PBS**: Buffer fosfato salino

**TCBS**: Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa

**TCE**: Tasa de crecimiento específica

**TGI**: Tracto gastrointestinal

**TS**: Tripticasa soja

**TSA**: Agar tripticasa soja

**UA**: Unidades arbitrarias

**UFC**: Unidades formadoras de colonias

**VRBG**: Agar bilis rojo violeta glucosado

# **CAPÍTULO I**

## **Introducción general**

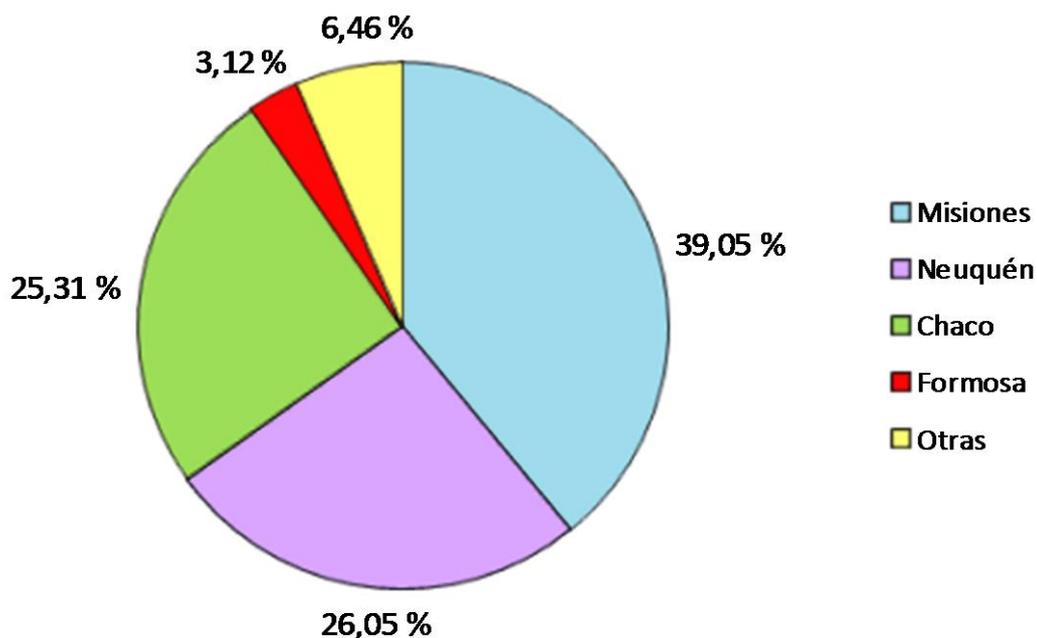
## 1- Acuicultura

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) la acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, con la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de depredadores (FAO/NACA/WHO, 1999). A partir de 1985, la acuicultura se convirtió en una de las principales industrias de producción animal (Done et al., 2015). Al principio, era una actividad mayormente no comercial, representando un estilo de vida tradicional durante siglos y, a menudo, proporcionando la única fuente confiable de alimentación para sus productores (Cole et al., 2009). En la actualidad, la acuicultura es uno de los sectores de producción de alimento de más rápido crecimiento, así en el 2004 la producción de peces representaba un 31,1 % de la producción acuícola mundial, en el 2012 un 42,1 % y desde el 2014 ofrece casi la mitad de todos los peces para alimentación humana, tendencia que está presente en todos los continentes (FAO, 2016). Este crecimiento de la acuicultura tiene varias razones: mayor demanda de lo que ahora se reconoce como una elección saludable de proteínas, avances en la producción de alimentos marinos, agotamiento de las poblaciones de peces silvestres y mejoras en las instalaciones que permiten una acuicultura de alta densidad (Cole et al., 2009; Done et al., 2015).

En Argentina la acuicultura es una actividad joven y en desarrollo, originada a fines del siglo pasado. En los últimos 20 años ha mostrado un crecimiento lento pero sostenido, desde las 1.000 toneladas en 1996, hasta un máximo de 4.027 en el año 2014, con una leve disminución en los años 2015 y 2016 causada mayormente por los costos del alimento balanceado, la falta de financiamiento y razones climáticas (Panné Huidobro, 2016). El principal cultivo es el de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en las provincias de Misiones y Chaco. En el 2016, el pacú contribuyó con el porcentaje más alto (58,32 %) de la producción de organismos acuáticos del país. En segundo lugar, se ubicó la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un 29,16 % y en

tercer lugar el cultivo de varias especies, principalmente carpas (*Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristichthys nobilis*, *Ctenopharyngodon idella*), surubí (*Pseudoplatystoma fasciatum* y *P. corruscans*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*), (Panné Huidobro, 2016).

La región patagónica ocupa un lugar muy importante en la producción acuícola nacional. Allí se desarrolla la mayor producción de trucha arcoíris, principalmente en dos de los embalses hidroeléctricos del río Limay (embalse Alicurá y embalse Piedra del Águila), en la provincia de Neuquén (Fig. 1). Además, se cultivan en sus costas marinas dos especies de mejillón (*Mytilus edulis* y *M. chilensis*), la cholga (*Aulacomya atra*) y la ostra cóncava (*Crassostrea gigas*) en Tierra del Fuego y Chubut (Panné Huidobro, 2016).



**Figura 1:** Participación por provincias en la producción acuícola total año 2016. Otras: La Rioja, Río Negro, Tierra del Fuego, Mendoza, Buenos Aires, Corrientes, Córdoba, Santa Fe, Chubut, Jujuy, La Pampa y Entre Ríos. (Fuente: Panné Huidobro, 2016)

Según el informe de la FAO nº 549 (Kapetsky et al., 2013), Argentina tendrá un rol cada vez más protagónico en la acuicultura debido a que posee una amplia extensión de mar propicia para la producción acuícola. Además, posee diversidad climática, agua dulce de calidad y la ventaja de poder producir alimento balanceado. En este marco, en 2017, Argentina inició el

llamado a su primer proyecto estratégico nacional en acuicultura para la Región Patagónica “Innovación Acuicultura Argentina – INNOVACUA”; una propuesta que incluye el diseño, desarrollo e instalación de una Granja Marina Multitrófica Integrada, donde se combina el cultivo de varias especies en el mar. Entre ellas, trucha arcoíris, mejillón azul (*Mytilus edulis*) y alga parda (*Macrocystis pyrifera*), además de la captura y repoblación de la centolla. Este proyecto se desarrollará en la provincia de Tierra del Fuego y constituirá una experiencia piloto que brindará los conocimientos necesarios para el posterior escalamiento y desarrollo del sector productivo, con vistas a replicarlo en diferentes lugares de la costa patagónica.

## **2- Enfermedades bacterianas que afectan a la acuicultura**

El crecimiento de la producción acuícola ha generado la expansión, intensificación y diversificación de los sistemas de cultivo, exponiendo a los peces de cultivo a diversos factores de estrés como la manipulación de los organismos, el hacinamiento, la falta de higiene y la nutrición con dietas no balanceadas (Makridis et al., 2005). Esto ha provocado un aumento en la vulnerabilidad de los peces aumentando la incidencia de enfermedades, principalmente bacterianas, causando una alta mortalidad (Kurath, 2008).

Las enfermedades de origen bacteriano en peces pueden ser originadas por un gran número de especies, en la presente tesis se utilizarán principalmente los patógenos: *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* y *Carnobacterium piscicola*. Estos patógenos afectan a nivel mundial diferentes especies de peces de agua dulce y de mar entre las que se encuentran trucha arcoíris, tilapia, rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y róbalo (*Dicentrarchus labrax*), entre otras (Wiklund y Dalsgaard, 1998; Vendrell et al., 2006; Menanteau-Ledouble et al., 2016; Zorriehzahra et al., 2017).

## **2.1- *Aeromonas salmonicida***

*Aeromonas salmonicida* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, inmóvil, no esporulado ni encapsulado. Esta bacteria se puede encontrar en casi todo el mundo en ambientes marinos y de agua dulce (Hiney y Olivier, 1999). Si bien es conocido como un patógeno de salmónidos, tiene un amplio rango de hospedadores y puede afectar tanto a peces de aguas continentales como marinos (Wiklund y Dalsgaard, 1998). *Aeromonas salmonicida* es el principal agente etiológico de la forunculosis, enfermedad que se desarrolla como una septicemia hemorrágica crónica o aguda, a menudo con extensa necrosis licuefactiva. La forunculosis se caracteriza por la aparición de forúnculos, coloración oscura de la piel, exoftalmia, esplenomegalia, nefritis y enteritis (Hiney y Olivier, 1999). *Aeromonas salmonicida* es un patógeno distribuido globalmente que históricamente ha estado entre las bacterias más importantes que afectan a la acuicultura (Menanteau-Ledouble et al., 2016).

## **2.2- *Lactococcus garvieae***

*Lactococcus garvieae* es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, no móvil y no formador de esporas. Esta especie es el agente causal de la lactococosis, una enfermedad emergente que afecta a varias especies de peces de agua dulce y marinos, entre ellos la trucha arcoíris y la tilapia (Vendrell et al., 2006). La enfermedad que produce se caracteriza por una septicemia hiperaguda y hemorrágica, que evoluciona dependiendo de las condiciones ambientales del hábitat del pez, con especial importancia de la temperatura y la calidad microbiológica del agua (Vendrell et al., 2006). Los síntomas que causa son anorexia, melanosis, natación errática, exoftalmia a menudo con hemorragias en la cámara del ojo, agrandamiento del bazo, abdomen hinchado y prolapso anal (Bekker et al., 2011).

La lactococosis es una de las enfermedades de peces más importantes en Europa, Asia, Australia y América (Nelson et al., 2016). Cabe destacar que este patógeno causa grandes pérdidas económicas debido a las elevadas tasas de mortalidad (hasta 50 %), la disminución de las tasas de crecimiento y la apariencia de los peces que los hace no comercializables (Vendrell et al., 2006).

### **2.3- *Yersinia ruckeri***

*Yersinia ruckeri* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que puede presentar movilidad por flagelos peritricos. Este patógeno es el agente causal de la enfermedad de la boca roja, una de las enfermedades más comunes en salmónidos, especialmente en trucha arcoíris juvenil, pero se lo ha reportado en peces marinos como bacalao (*Gadus morhua*), rodaballo y róbalo, entre otros. La enfermedad de la boca roja es altamente contagiosa y ha sido reportada en América, Australia, Nueva Zelanda, África, Europa y Asia (Zorriehzahra et al., 2017). Los signos más característicos son el enrojecimiento de la garganta y la cavidad bucal debido a una hemorragia subcutánea, una congestión de los vasos de la zona oral y hemorragias en la boca (Woo y Bruno, 2011). Además, se encuentran hemorragias en la superficie externa, en la base de las aletas, en las branquias y alrededor de la línea lateral, en la base de las aletas pélvicas, ano y zonas ventrales (Zorriehzahra et al., 2017).

### **2.4- *Carnobacterium piscicola***

*Carnobacterium piscicola* es un cocobacilo Gram positivo, fermentativo no móvil. Este patógeno es uno de los agentes causales de la estreptococosis, enfermedad con síntomas variados, incluyendo septicemia, abdomen distendido con líquido ascítico, abscesos musculares, ampollas de sangre justo debajo de la piel y hemorragia interna (Austin y Austin, 2012). Esta enfermedad

de agua dulce que se distribuye en Europa y América (Austin y Austin, 2012) afecta a distintas especies incluyendo salmónidos, carpa, lubina rayada y bagre (Michel et al., 1986; Baya et al., 1991; Starliper et al., 1992; Toranzo et al., 1993).

## **2.5- Situación sanitaria acuícola en Argentina**

En Argentina la habilitación sanitaria de los productos originados en acuicultura, así como los trabajos de prevención y de vigilancia y monitoreo se encuentran a cargo del Servicio Nacional de Sanidad Alimentaria (SENASA) (FAO, 2005-2018). Dicho Ente lleva adelante un Programa sobre enfermedades de los animales acuáticos que tiene como objetivo principal determinar la presencia/ausencia de aquellas enfermedades de los peces, moluscos y crustáceos de denuncia obligatoria para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y para nuestro país. La producción acuícola de nuestro país cuenta con una situación sanitaria muy favorable ya que los estudios que se llevan a cabo en las diferentes especies de producción han demostrado la ausencia de las principales patologías. Hasta el momento este programa de enfermedades de animales acuáticos se ha implementado únicamente para salmónidos y en los últimos años, para moluscos bivalvos (SENASA).

En la región patagónica, la Cuenca alta del Rio Limay incluyendo el embalse Alicurá fue declarada como libre de enfermedades de los salmónidos por SENASA en el año 2013. Dentro de estas enfermedades se incluyen 5 víricas (necrosis hematopoyética epizoótica (EHNV), necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), septicemia hemorrágica viral (VHS), necrosis pancreática infecciosa (IPN) y anemia infecciosa del salmón (ISA)) y 2 bacterianas, enfermedad bacteriana renal (BKD) producida por *Renibacterium salmoninarum* y el síndrome Rickettsial del salmón (SRS) por *Piscirickettsia salmonis*. Sin embargo, el Centro de Ecología Aplicada de Neuquén (CEAN) que desarrolla proyectos aplicados a la producción de trucha, abarcando aspectos como la sanidad acuícola, nutrición y manejo de la reproducción en

salmónidos, ha reportado en el año 2016 mortalidad subaguda de la trucha arcoíris cultivada, asociada con síntomas de necrosis dérmica y ha identificado al agente bacteriano causante de esta enfermedad como *Flavobacterium psychrophilum* (Moreno et al., 2016).

Los resultados sobre la sanidad relacionada a moluscos bivalvos hasta el año 2013/2014 arrojaron ausencia de las enfermedades de notificación obligatoria para la OIE que se encuentran bajo vigilancia en nuestro país (SENASA).

### **3- Medidas de control de las enfermedades bacterianas**

A nivel mundial, la producción acuícola intensiva se ve obstaculizada por mortandades impredecibles debidas a interacciones negativas entre los peces y las bacterias patógenas (Romero et al., 2012). Estas infecciones surgen generalmente como consecuencia del estado inmunitario deficiente de los organismos en cultivo, que está asociado con la alta densidad y con una calidad de higiene subóptima (Cabello et al., 2013). Por lo tanto, la implementación de buenas prácticas de cría que minimicen el nivel de estrés en los peces, aumenten la calidad del agua y que reduzcan las probabilidades de las infecciones es primordial.

#### **3.1- Antibióticos**

Los antibióticos han sido muy utilizados para tratar infecciones bacterianas en el sector acuícola. Sin embargo, el uso incorrecto y el abuso de antibióticos para prevenir y tratar infecciones durante el cultivo de peces e invertebrados ha provocado la aparición de patógenos resistentes y la acumulación de antibióticos en los órganos internos de los organismos producidos, haciéndolos inapropiados para el consumo humano (Cabello, 2006; Romero et al., 2012). Además, algunas de estas sustancias son excretadas

persistiendo en el ambiente durante largo tiempo (Díaz-Cruz et al., 2003). La liberación de forma continua de efluentes contaminados con antibióticos genera una constante presión de selección incrementando la aparición de cepas resistentes y propiciando un cambio en la microbiota del entorno (Boon y Cattanach, 1999). Las altas proporciones de bacterias resistentes a los antibióticos que persisten en los sedimentos de los criaderos y en sus proximidades representan una amenaza para la industria acuícola, ya que pueden servir como fuentes de genes de resistencia a antibióticos para patógenos de peces en las cercanías de los criaderos. Asimismo, muchas bacterias patógenas son capaces de diseminar los genes de resistencia a los antibióticos desde las zonas de producción acuícola hasta los humanos, pudiendo generar cepas resistentes en la flora intestinal humana (Sorum y L´Abee-Lund, 2002).

En los últimos años, los productores acuícolas han tenido que adaptarse a las restricciones en el uso de antibióticos que están comenzando a implementarse a nivel mundial (Cabello et al., 2013). Así, países como Canadá, Estados Unidos y Noruega han aprobado el uso de un número muy limitado de antibióticos.

En relación a lo expuesto, en la actualidad hay un creciente interés por los tratamientos ambientalmente amigables para el desarrollo de una acuicultura más sustentable (Balcázar et al., 2006; Lazado y Caipang, 2014). El control de enfermedades es un campo de investigación activo, en el cual alternativas a los tratamientos con antibióticos como lo son las vacunas, los bacteriófagos, los prebióticos y probióticos están siendo constantemente explorados (Romero et al., 2012).

## **3.2 Tratamientos alternativos al empleo de antibióticos en acuicultura**

### **3.2.1- Vacunación**

La vacunación es un tratamiento utilizado en acuicultura para prevenir enfermedades, cuya implementación es relativamente nueva en comparación con su uso en humanos. En 1976, se comercializó la primera vacuna que fue desarrollada para proteger a los salmónidos de la yersiniosis (enfermedad de la boca roja), (Ringø et al., 2014). Este tipo de tratamiento puede prevenir enfermedades infecciosas en ciertos casos, pero presenta varias dificultades, por ejemplo, la efectividad es solo contra un tipo específico de patógeno (Ardó et al., 2008), no es un tratamiento para infecciones ya existentes y las vacunas disponibles comercialmente son todavía muy limitadas (Romero et al., 2012). Otros inconvenientes son la falta de efectividad cuando se aplica a peces juveniles, inmunológicamente inmaduros (Balcázar et al., 2008), y la problemática de la aplicación, ya que no es una tarea sencilla la vacunación de peces muy pequeños o a un gran número de individuos (Gram et al., 1999). Además, las vacunas pueden tener un elevado costo, retardar el crecimiento y producir estrés en los individuos cuando se administran por inyección (Toranzo et al., 2009).

### **3.2.2- Fagoterapia**

La fagoterapia es el empleo de bacteriófagos para tratar enfermedades causadas por bacterias. Los bacteriófagos son virus que pueden infectar de forma específica a bacterias, multiplicarse utilizando la maquinaria celular de la misma y destruirla mediante lisis. Los bacteriófagos son ubicuos y abundantes, especialmente en el agua de mar existen  $10^{10}$  bacteriófagos por litro de agua, con una proporción de 10 fagos por bacteria aproximadamente y son responsables de un tercio de las muertes de bacterias marinas (Weinbauer et al., 2009). Si bien los fagos se han estudiado por sus propiedades terapéuticas

y por su capacidad de controlar infecciones bacterianas desde su descubrimiento en el año 1915, estos estudios fueron abandonados con el descubrimiento de antibióticos de amplio espectro (Romero et al., 2012). En la actualidad, debido a la problemática que ha provocado el uso indiscriminado de antibióticos, la fagoterapia es uno de los métodos emergentes para el control de enfermedades bacterianas.

Esta terapia presenta características interesantes tales como: la alta especificidad por una especie bacteriana sin afectar a la microbiota intestinal normal del hospedador; la autorreplicación en la bacteria diana reduciendo el número de aplicaciones y la capacidad de penetrar en cualquier tejido infectado (Mathur et al., 2003). No obstante, la fagoterapia también presenta limitaciones como lo son su costo, la liberación de endotoxinas bacterianas a causa de la lisis bacteriana, el riesgo de transferencia de genes de virulencia a las bacterias hospedadoras, el desarrollo de anticuerpos que reduzcan la eficacia de los fagos (Mathur et al., 2003; Romero et al., 2012).

### **3.2.3- Prebióticos**

Los prebióticos se definen como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias específicas que pueden mejorar la salud del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). Los prebióticos son carbohidratos que se pueden clasificar según el tamaño molecular y/o el grado de polimerización en: monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos (Ringø et al., 2010). Como ejemplo se pueden mencionar los fructo-oligosacáridos, manano-oligosacáridos, inulina y  $\beta$ -glucanos, entre otros.

A pesar de que algunos resultados han revelado beneficios potenciales de los prebióticos en la salud y rendimiento de crecimiento en algunas especies de peces (Merrifield et al., 2010a; Ringø et al., 2014; Hoseinifar et al., 2015), el uso de prebióticos en acuicultura ha sido menos investigado (Ringø et al., 2014).

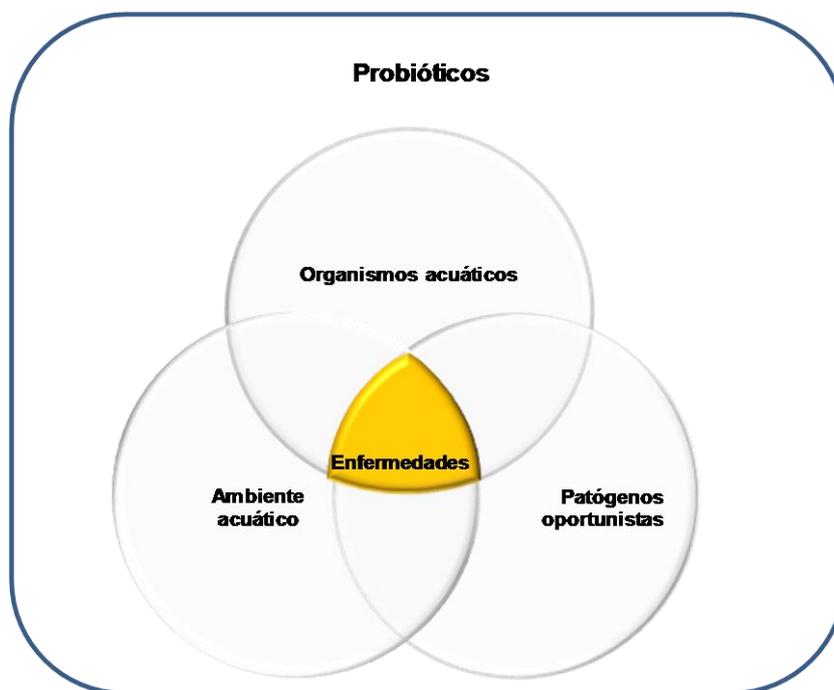
### 3.2.4- Probióticos para acuicultura

El término probiótico deriva del griego, pro y bio significan “a favor de la vida” (Schrezenmeir y De Vrese, 2001). La definición de probiótico ha ido cambiando con el tiempo, así Fuller (1989) los definió como “un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio intestinal”. En el año 1998, Guarner y Schaafsma los definieron como "microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables”.

Estas definiciones son aplicables para humanos y animales terrestres. En cambio, en acuicultura la microbiota gastrointestinal de los animales acuáticos tiene una gran dependencia del ambiente, debido al flujo de agua que pasa a través del tracto digestivo durante el proceso de osmorregulación y de la alimentación (Verschuere et al., 2000a; Martínez Cruz et al., 2012). Varios estudios han demostrado que las bacterias presentes en el ambiente acuático influyen en la composición de la microbiota intestinal y viceversa (Cahill., 1990; Verschuere et al., 2000a). También los patógenos oportunistas pueden ser ingeridos ya sea con el alimento o a través del agua (Verschuere et al., 2000a). Por lo tanto, el entorno ambiental adyacente tiene una influencia mucho mayor en el estado de salud de los animales acuáticos que en los animales terrestres (Balcázar et al., 2006). Por este motivo, las bacterias probióticas en acuicultura pueden beneficiar no solo al huésped sino también al entorno circundante (Verschuere et al., 2000a). En base a la importante influencia que tiene el ambiente en la salud de los organismos acuáticos, la definición más completa es la siguiente: “Un probiótico es un suplemento microbiano vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el huésped, capaz de modificar la flora asociada al mismo y la flora asociada al ambiente, asegurando un mejor uso del alimento, mejorando su valor nutricional, la respuesta del huésped hacia las enfermedades y/o la calidad del ambiente que lo rodea” (Verschuere et al., 2000a).

Por lo comentado anteriormente, en los organismos acuáticos el desarrollo de una enfermedad puede ser el resultado de un desequilibrio entre

los organismos cultivados, la calidad del agua de cultivo y la presencia de patógenos oportunistas dentro de los sistemas acuícolas (Fig. 2). Los probióticos para acuicultura podrían actuar sobre alguno o los tres componentes, previniendo así la enfermedad (Fig. 2) (Sequeiros et al., 2016).



**Figura 2:** Representación esquemática de la relación entre los probióticos y los componentes de la acuicultura.

Los probióticos son cada vez más aceptados como tratamiento profiláctico alternativo para humanos y animales ya sea para tratar enfermedades relacionadas con patógenos o para ser utilizado en tratamientos preventivos (Ringø et al., 2014), y son por lo tanto una alternativa muy atractiva para el control de patologías en acuicultura (Martínez Cruz et al., 2012).

A pesar de que el uso de probióticos para acuicultura es un concepto más nuevo en comparación con su uso en humanos y animales terrestres, en los últimos años se han empleado diferentes cepas a nivel comercial como alternativa al uso de antibióticos para mejorar la tasa de supervivencia y el crecimiento de animales en cultivo (Lauzon, 2010). En este sentido BACTOCELL®, que contiene a *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5M, fue el

primer probiótico autorizado por la Unión Europea para el cultivo intensivo de peces y crustáceos (Muñoz-Atienza et al., 2014). Una amplia gama de microorganismos (bacterias Gram negativas y Gram positivas, levaduras y microalgas) han sido propuestos como probióticos para acuicultura, pero las bacterias ácido lácticas (BAL) son el grupo más caracterizado debido a su extensa aplicación en animales y formulaciones probióticas humanas (Ringø y Gatesoupe, 1998).

#### **4- Bacterias ácido lácticas**

Las BAL son microorganismos Gram positivos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, por lo general no móviles y catalasa negativos. Además, carecen de citocromos, poseen metabolismo fermentativo, son microaerófilos o anaerobios facultativos y ácido-tolerantes (Carr et al., 2002). Las BAL pertenecen a la familia *Lactobacillales*, orden *Bacilli* del filo *Firmicutes* y comprende alrededor de 20 géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, entre otros (Holzapfel et al., 2001). Además, las bacterias pertenecientes a este grupo bacteriano son buenas candidatas probióticas ya que la mayoría son consideradas GRAS (del inglés Generally Recognized As Safe, establecido por la Agencia de Alimentos y Medicamentos [FDA] de EE.UU.) (Hugas, 1998).

Los mecanismos relacionados con la protección de las BAL contra patógenos incluyen la producción de compuestos antimicrobianos (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, bacteriocinas y compuestos tensioactivos) y la competencia por sitios de adhesión mediada por su capacidad de adherirse a las células epiteliales y a superficies mucosas (Pascual et al., 2008; Siciliano et al., 2008; Golek et al., 2009). De esta manera, las BAL pueden mejorar la barrera defensiva de la mucosa intestinal y actuar de barrera anti-antígenos (Salminen et al., 1996; Fang et al., 2000).

La administración de BAL propuestas como probióticos en acuicultura ha demostrado efectos positivos tanto en peces como en crustáceos (Ringø y Gatesoupe, 1998; Balcázar et al., 2007a; Dimitroglou et al., 2011). Estos efectos benéficos incluyen: el mejoramiento en la tasa de supervivencia luego de la infección con patógenos, la estimulación del sistema inmune, mejoras en la nutrición, modificaciones en la microbiota intestinal del hospedador, estimulación del crecimiento y mejoras en la calidad del agua (Verschuere et al., 2000a; Balcázar et al., 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield et al., 2010a). En la Tabla 1 se muestran diferentes géneros de BAL, con propiedades antagónicas contra patógenos de usual frecuencia en acuicultura, utilizados en ensayos *in vivo*.

<b>Género de BAL</b>	<b>Patógeno</b>	<b>Referencia</b>
<i>Carnobacterium</i>	<i>A. salmonicida</i>	Jöborn et al. (1997) Robertson et al. (2000)
	<i>V. anguillarum</i>	Gildberg et al. (1997) Jöborn et al. (1997) Gildberg y Mikkelsen (1998) Robertson et al. (2000)
		<i>V. ordalii</i>
	<i>Y. ruckeri</i>	Robertson et al. (2000)
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. tarda</i>
<i>V. harveyi</i>		Swain et al. (2009)
<i>V. parahaemolyticus</i>		Swain et al. (2009)
<i>Lactobacillus</i>	<i>A. salmonicida</i>	Nikoskelainen et al. (2001a)
	<i>E. tarda</i>	Pirarat et al. (2006)
	<i>L. garvieae</i>	Vendrell et al. (2008)
	<i>P. fluorescens</i>	Aly et al. (2008)
	<i>S. iniae</i>	Aly et al. (2008)
	<i>V. alginolyticus</i>	Lamari et al. (2014)
<i>Lactococcus</i>	<i>V. anguillarum</i>	Harzevili et al. (1998)
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. garvieae</i>	Vendrell et al. (2008)
<i>Pediococcus</i>	<i>V. anguillarum</i>	Adel et al. (2017)
<i>Streptococcus</i>	<i>V. harveyi</i>	Swain et al. (2009)
<i>Vagococcus</i>	<i>V. anguillarum</i>	Sorroza et al. (2012)

**Tabla 1:** Géneros de BAL (bacterias ácido lácticas) empleados como probióticos para acuicultura que actúan sobre patógenos específicos *in vivo*. A.: *Aeromonas*, V.: *Vibrio*, Y.: *Yersinia*, E.: *Edwardsiella*, L.: *Lactococcus*, P.: *Pseudomonas*, S.: *Streptococcus*. (Adaptada de Newaj-Fyzul et al., 2014)

## **5- Mecanismos de acción de los probióticos**

Se han descrito múltiples mecanismos para explicar los efectos beneficiosos de los probióticos. Entre los principales se encuentran: la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por sitios de adhesión y colonización, el mejoramiento de la respuesta inmune y el mejoramiento de la calidad del agua (Verschuere et al., 2000a; Balcázar et al., 2006; Merrifield et al., 2010a).

### **5.1- Producción de compuestos antimicrobianos**

La producción de compuestos antimicrobianos, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, es uno de los principales modos de acción para explicar los efectos beneficiosos de los probióticos. Estos compuestos producidos por bacterias probióticas ya sea en el intestino del huésped, en su superficie o en el agua pueden constituir una barrera contra la proliferación de patógenos oportunistas, reduciendo la probabilidad de desarrollo de enfermedades (Verschuere et al., 2000a).

#### **5.1.1- Ácidos orgánicos**

El metabolismo de las BAL se caracteriza por la producción y acumulación de los ácidos orgánicos que disminuyen el pH del medio. La fracción no disociada de los ácidos orgánicos puede atravesar la membrana celular, disociarse en el citoplasma y ejercer dos tipos de efectos. Uno de ellos es aquel en el cual interfieren con funciones celulares como la translocación de sustratos y la fosforilación oxidativa (Vásquez et al., 2009). El otro efecto que provocan es el incremento de protones en el interior celular y una vez que la concentración de protones citoplasmática excede su capacidad tampón, desciende el pH interno y como consecuencia se desnaturalizan las proteínas y

desestabilizan otros componentes estructurales y funcionales afectando la viabilidad de la célula (Davidson y Taylor, 2007; Vásquez et al., 2009).

### **5.1.2- Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno tiene un efecto bactericida debido a su poder oxidante. Éste actúa oxidando grupos sulfhidrilos, provocando la desnaturalización de proteínas y la peroxidación de los lípidos que componen la membrana celular de las bacterias (Kong y Davison, 1980). La mayor parte de las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, en presencia de oxígeno libre a través de la acción de flavoproteínas (oxidasa o peroxidasa), el cual es liberado al medio donde puede resultar altamente tóxico para otras bacterias que comparten el mismo hábitat, y de esta manera eliminarlas (Sorroza, 2012).

### **5.1.3- Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente que poseen distintos mecanismos de acción, niveles y espectro de actividad, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Tagg et al., 1976; Klaenhammer, 1993). El mecanismo de acción de las bacteriocinas implica la destrucción de la integridad de la membrana plasmática de la célula diana mediante la formación de poros que provocan un vaciamiento intracelular, generando la pérdida de iones  $K^+$ , de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular (Bemena et al., 2014). Todo esto se traduce en la disminución del potencial de membrana y de reservas energéticas disponibles, que conduce a la disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y finalmente a la muerte celular (Vásquez et al., 2009; Heredia-Castro et al., 2017).

Si bien las bacteriocinas pueden ser sintetizadas tanto por bacterias Gram negativas como Gram positivas las producidas por éstas últimas, donde

se encuentran las BAL, son las que más interés han despertado ya que se las considera seguras para su consumo (GRAS) debido a que se encuentran o se utilizan en alimentos y productos fermentados (FAO/WHO, 2002). Estas bacteriocinas no presentan toxicidad para las células eucariotas y tienen un espectro de inhibición más amplio que las producidas por bacterias Gram negativas y, además, algunas de ellas ejercen actividad directa contra bacterias patógenas en acuicultura (Sahoo et al., 2016).

La clasificación de las bacteriocinas ha sido un tema discutido a lo largo de los años, debido en parte a la creciente información y actualización respecto de este campo. Diferentes autores han propuesto distintos tipos de clasificación (Klaenhammer, 1993; Nes et al., 1996; Drider et al., 2006; Nissen-Meyer et al., 2009, Tulini et al., 2014). Sin embargo, el eje central y común a todos ha sido la base propuesta por Klaenhammer en 1993, quien planteó la clasificación de acuerdo a la similitud en sus propiedades, tales como la secuencia aminoacídica, modificaciones químicas, propiedades fisicoquímicas y secuencia líder. Las bacteriocinas según Tulini et al. (2014) se pueden clasificar en 3 clases diferentes:

Clase I. Lantibióticos: son bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), resistentes a altas temperaturas (termoresistentes) y con aminoácidos poco usuales resultantes de modificaciones postraduccionales. La nisina, pertenece a esta clase (Klaenhammer et al., 1993). La mayoría de los lantibióticos interfieren con la síntesis de la pared celular bacteriana y promueven formación de poros (Ross y Vederas, 2011).

Clase II. No lantibióticos: son péptidos de pequeño tamaño (<10 KDa), con aminoácidos no modificados y termoresistentes (Nissen-Meyer et al., 2009). Estas bacteriocinas generalmente actúan permeabilizando la membrana de la célula diana. A su vez esta clase está dividida en 4 subgrupos:

Clase IIa, son bacteriocinas que actúan fuertemente contra *Listeria* y poseen un elevado grado de homología estructural (40-60 %), presentan una secuencia altamente conservada en la región N-terminal YGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys, donde X representa un residuo aminoacídico no

conservado) y un puente disulfuro en la mitad N-terminal del péptido, esencial para la actividad antimicrobiana.

Clase IIb, son bacteriocinas formadas por dos péptidos diferentes, cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de éstos dos péptidos.

Clase IIc, son bacteriocinas con sus extremos N y C terminales unidos covalentemente (bacteriocinas circulares).

Clase IId, son las bacteriocinas restantes que no se ajustan a los otros subgrupos.

Clase III, son aquellas bacteriocinas de elevado peso molecular (>30 kDa) y termolábiles, se inactivan mediante tratamientos térmicos a 60-100 °C durante 10-15 min. Catalizan la hidrólisis de la pared celular bacteriana.

Esta gran diversidad estructural de bacteriocinas provenientes de las BAL proporcionan una ventaja para superar los problemas de resistencia que generalmente ocurren con una única clase de bacteriocina y además ofrece diferentes modelos para el diseño de nuevos péptidos antimicrobianos (Metivier et al., 1998).

## **5.2- Competencia por sitios de adhesión y colonización**

La capacidad de adhesión y posterior colonización de los probióticos al mucus intestinal y a otras superficies mucosas (piel y branquias) de los organismos acuáticos es la primera barrera contra la proliferación de microorganismos patógenos, en un mecanismo llamado exclusión competitiva. Este mecanismo involucra la adhesión del probiótico y posterior exclusión de los patógenos a través de la competencia por los sitios de unión y nutrientes (Westerdahl et al., 1991), lo que impediría la etapa inicial de infección de los patógenos (Balcázar et al., 2006). Esta adhesión puede ser inespecífica (mediada por uniones no covalentes como las interacciones electrostáticas, puente de H, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) o

específica (donde intervienen estructuras moleculares como las adhesinas que se ubican en la superficie de las cepas probióticas y los receptores en las células del epitelio intestinal) (Salminen et al., 1996; Verschuere et al., 2000a; Nikoskelainen et al., 2001b). Por lo cual, varios autores han evaluado la capacidad de distintas bacterias probióticas de adherirse al mucus de los peces y la capacidad para desplazar patógenos, también sobre mucus (Nikoskelainen et al., 2001b; Balcázar et al., 2008; Sica et al., 2012).

Algunas bacterias probióticas tienen además la capacidad de producir compuestos tensioactivos, también llamados biosurfactantes, los cuales favorecen la adhesión de éstas al epitelio intestinal del hospedador, brindándoles mayor capacidad para competir con patógenos por sitios en el epitelio intestinal (Salazar y Montoya, 2003). Los compuestos tensioactivos son un grupo diverso de compuestos químicos tales como lipopéptidos, glucolípidos, glicopéptidos y polímeros de proteínas, polisacáridos y lípidos tales como glicoproteína, lipopolisacáridos y lipoproteínas (Banat et al., 2010). Estas sustancias son compuestos extracelulares anfipáticos, en su estructura presentan grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, los cuales brindan la capacidad de modificar la tensión superficial (Cortes et al., 2013). Algunos de ellos, también poseen actividad antimicrobiana, ya que pueden penetrar la membrana plasmática alterando su integridad estructural o la permeabilidad generando la lisis celular (Thimon et al., 1995).

### **5.3- Mejoramiento de la respuesta inmune**

Como en otros vertebrados, los peces presentan dos tipos de mecanismo de defensa, la inmunidad innata y la adaptativa (Ellis, 1999). Se ha evaluado, mediante diversos modelos animales, la interacción entre probióticos y células inmunes, demostrando que dichas interacciones son vitales para la homeostasis del tejido de la mucosa intestinal y la inmunidad innata (Patel et al., 2015). Los probióticos pueden reforzar la inmunidad innata y actuar sobre los mecanismos inmunológicos en la restauración de la mucosa y la eliminación de patógenos (Patel et al., 2015).

Diferentes estudios han demostrado, en distintas especies de peces, que los probióticos tienen la capacidad de modular tanto el sistema inmune innato como el específico aumentando la actividad fagocítica en leucocitos (Irianto y Austin, 2003; Balcázar et al., 2007a; Pirarat et al., 2011), favoreciendo el estallido respiratorio en leucocitos (Nikoskelainen et al., 2003; Zhou et al., 2010), aumentando la lisozima (Kim y Austin, 2006; Balcázar et al., 2007b), la actividad del complemento (Salinas et al., 2008) y la producción de inmunoglobulinas (Nikoskelainen et al., 2003; Song et al., 2006).

#### **5.4- Mejoramiento de la calidad del agua de cultivo**

El uso de probióticos ha demostrado su eficacia para mejorar la calidad del agua de cultivo de peces y crustáceos. Esto se debe a que mejoran la descomposición de la materia orgánica (Rengpipat et al., 1998; Verschuere et al., 2000a), reducen las concentraciones de nitrógeno y fósforo en los sedimentos (Wang et al., 2005) y mejoran la calidad del agua al reducir el número de bacterias patógenas (Dalmin et al., 2001; Hai, 2015).

#### **6- Criterios de selección de cepas probióticas**

Los criterios utilizados para el aislamiento y la selección de microorganismos son críticos para lograr probióticos eficientes. Este proceso debe incluir rigurosas evaluaciones de microorganismos en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

El proceso de selección de microorganismos probióticos es multidisciplinar (Verschuere et al., 2000a). Dentro de los criterios de selección más utilizados está la capacidad de los microorganismos de producir sustancias antimicrobianas. Pero también, se debe tener en cuenta otros criterios de gran importancia que consideran la seguridad microbiológica y las

propiedades fisiológicas tales como tolerancia a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (TGI) y la capacidad de adhesión a superficies mucosas.

Dentro de las propiedades a evaluar para la selección de potenciales cepas probióticas, hay una que es esencial, la seguridad microbiológica, el resto son características deseables y muy favorables (Merrifield et al., 2010a). A continuación, se describen dichas propiedades probióticas.

### **6.1- Seguridad de las cepas probióticas**

Los candidatos probióticos deben estar exentos de patogenicidad y resultar seguros no sólo para las especies hospedadoras sino también para los animales acuáticos en general y para los humanos (Irianto y Austin, 2002; Merrifield et al., 2010a). En consecuencia, la evaluación de la seguridad de las cepas debe ser abordada mediante diferentes ensayos, entre los que se destacan la actividad hemolítica y la resistencia a antibióticos. En Argentina la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (ANMAT, 2007) en el Código Alimentario Argentino, (CAA) en el artículo 1389, exige la realización de pruebas de inocuidad que incluyen la resistencia a antibióticos y la capacidad hemolítica (Sica, 2013).

**Actividad hemolítica.** Las bacterias hemolíticas tienen la capacidad de sintetizar exotoxinas que provocan la lisis de los eritrocitos de la sangre de diferentes animales. Estas proteínas dañan la membrana plasmática del glóbulo rojo y lisan las células provocando la muerte celular (Madigan et al., 2009). Estas toxinas se conocen con el nombre de hemolisinas porque su acción se puede observar fácilmente mediante la prueba de hemólisis (Madigan et al., 2009). La capacidad hemolítica entonces se relaciona con la posible patogenicidad de las cepas (Zamora-Rodríguez, 2003). Por este motivo, se considera esencial que la cepa seleccionada no posea actividad hemolítica.

**Resistencia a antibióticos.** La baja resistencia a antibióticos es uno de los requisitos que debe cumplir un candidato probiótico. Esto se debe a la seria preocupación que existe en el mundo sobre la aparición de resistencia a los

antibióticos (Vizoso-Pinto et al., 2006) y a que las cepas probióticas, así como las bacterias utilizadas en los alimentos, puedan albergar genes de resistencia que pueden transferirse a bacterias patógenas (Teuber et al., 1999; Mathur y Singh, 2005). Por lo tanto, las consideraciones de seguridad en los estudios de probióticos incluyen la confirmación de que las posibles cepas probióticas no sean resistentes a los antibióticos (Shahid et al., 2016).

## **6.2- Actividad antimicrobiana contra patógenos**

Como se mencionó anteriormente, la producción de compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, es uno de los principales modos de acción para explicar los efectos beneficiosos de los probióticos. Por lo tanto, se utiliza la evaluación de esta propiedad, contra patógenos de usual frecuencia en acuicultura, como criterio para la selección de potenciales bacterias probióticas para su utilización en sistemas acuícolas (Verschuere, 2000a).

## **6.3- Resistencia al pH y a bilis**

En acuicultura, los probióticos generalmente se administran con la alimentación y es el TGI la ruta de entrada al huésped. En consecuencia, es importante que los probióticos sean resistentes a la bilis de los peces y a condiciones de bajo pH para sobrevivir en su paso por el estómago y colonizar la superficie intestinal (Nikoskelainen et al., 2001b; Balcázar et al., 2008; Pérez-Sánchez et al., 2011).

La tolerancia al pH ácido y a la bilis ha sido explicada por diferentes mecanismos con los que cuentan algunas bacterias para eliminar factores de estrés relacionados con estos compuestos (Lebeer et al., 2008). Algunos de estos mecanismos son por ejemplo la presencia de ATPasas que facilitan la salida de protones del citoplasma, de transportadores para exportar bilis y de

hidrolasas de sales biliares, éstas últimas se han encontrado principalmente en microorganismos aislados del TGI (Lebeer et al., 2008).

#### **6.4- Capacidad de adhesión**

Una eficiente adherencia de bacterias probióticas a las células epiteliales intestinales podría reducir o prevenir la colonización del TGI por patógenos oportunistas (Vine et al., 2004; Kesarcodi-Watson et al., 2008). Por lo tanto, la habilidad que presentan algunas bacterias de adherirse a diferentes superficies, incluyendo capas de mucus, es considerada un buen criterio para la preselección de bacterias probióticas (Verschuere et al., 2000a). Por tal motivo, los potenciales probióticos deberían ser evaluados, también, por su capacidad de colonizar y persistir en el organismo hospedador o en su ambiente.

#### **7- Utilización de *Artemia* como modelo invertebrado para el estudio de probióticos**

*Artemia* es el alimento vivo que más se utiliza en larvicultura, ya que por su tamaño es adecuada para las larvas, tiene un alto valor nutricional y es fácil de digerir (Sorgeloos et al., 1986; Kolkovski et al., 2004). Existen varias especies de artemias, las más conocidas son *Artemia franciscana* y *Artemia salina*. *Artemia* posee varias características que le permiten un uso como modelo de investigación, entre ellas se destaca que es un organismo de tamaño pequeño por lo que puede ser cultivado fácilmente usando sistemas de cultivos sencillos, y también que posee un tiempo de generación corto, alta resistencia a la temperatura, a la deshidratación y a los radicales libres (Clegg y Trotman, 2002). También, como es un organismo filtrador no selectivo puede ser alimentado utilizando distintas fuentes de alimentos como microalgas, bacterias y detritus.

*Artemia* es un organismo modelo particularmente adecuado para estudiar las interacciones microbio-huésped en condiciones gnotobióticas (Verschuere et al., 2000b; Marques et al., 2004; Gunasekara et al., 2011). Este crustáceo puede ser cultivado en condiciones axénicas (libre de gérmenes) y gnotobióticas (microbiota conocida) con buen rendimiento y con equipamiento básico (Verschuere et al., 1999, 2000a), ya que el alimento necesario para su cultivo y desarrollo puede ser fácilmente obtenido en las mismas condiciones.

Otra ventaja fundamental que posee *Artemia* es que puede emplearse como vector o transportador de bacterias probióticas ya que las puede incorporar mediante un proceso llamado bioencapsulación (Makridis et al., 2000). En acuicultura, la bioencapsulación se emplea para enriquecer alimentos vivos como *Artemia*, rotíferos y cladóceros, mediante la incorporación de sustancias o microorganismos, y de esta forma funcionan como vectores que facilitan la administración de tales componentes (Dey et al., 2015; Vázquez-Silva et al., 2016).

Debido a las interesantes características que presenta este modelo, varios autores han evaluado el potencial probiótico de distintos microorganismos utilizando bioensayos con *Artemia* spp. Por ejemplo, Verschuere et al. (2000b) observaron que 9 cepas bacterianas lograron proteger a *Artemia* sp. de la infección con *Vibrio proteolyticus*. Otros, han realizado ensayos de desafíos con *Artemia* sp. gnotobiótica (Orozco-Medina et al., 2002; Marques et al., 2005, 2006). Respecto a las BAL, Villamil et al. (2003) estudiaron la influencia de seis especies de bacterias lácticas y la del ácido láctico, uno de sus principales productos metabólicos, sobre la carga bacteriana presente en el cultivo de *Artemia* sp. y determinaron que el tratamiento con *Lactobacillus brevis* ( $1 \times 10^8$  bacterias/ml) eliminó a *V. alginolyticus* del cultivo de *Artemia*. Por otra parte, Lamari et al. (2014) evaluaron 4 especies de *Lactobacillus* y una de *Leuconostoc* y comprobaron que la cepa *L. casei* X2 fue capaz de mejorar el crecimiento de *Artemia* sp. en presencia o ausencia del patógeno *V. alginolyticus*.

## 8- Pez cebra como modelo vertebrado para acuicultura

El pez cebra (*Danio rerio*) presenta múltiples atributos que lo hacen excelente como especie modelo para investigar la interacción probiótico/huésped/ patógeno (Ribas y Piferre, 2014). Estos atributos incluyen alta fecundidad, rápido crecimiento, rápida obtención de las ovas y tejidos transparentes en los estadios tempranos de desarrollo. También, el pez cebra ofrece otras interesantes características como por ejemplo el conocimiento completo de su genoma, una amplia variedad de herramientas moleculares y bioinformáticas y un rápido desarrollo embrionario bien caracterizado (Kimmel et al., 1995; Ulloa et al., 2011). Además, se necesita un reducido espacio y un bajo costo para las instalaciones de investigación (Ribas y Piferre, 2014). Con esas ventajas y como un modelo experimental, el pez cebra cumple con las características necesarias para ser empleado como organismo modelo para investigaciones en acuicultura de peces (Sullivan y Kim, 2008; Rendueles et al., 2012; Ribas y Piferre, 2014; Gioacchini et al., 2014; Rurangwa et al., 2015).

Un claro ejemplo es la propuesta realizada por Ulloa et al. (2014), quienes proponen emplear al pez cebra como modelo para estudiar cómo mejorar los procesos de producción acuícola. Ellos proponen utilizar el pez cebra como plataforma para evaluar cómo diferentes ingredientes nutricionales pueden afectar la expresión génica e inmunológica. De esta manera, pudieron realizar importantes aportes a la genómica nutricional y la inmunidad nutricional, para luego seleccionar aquellos ingredientes con el mayor potencial para ser aplicados a peces de relevancia comercial (Ulloa et al., 2014). Otro trabajo interesante relacionado a la nutrición ha sido el de Rurangwa et al. (2015), en el que han evaluado el impacto de un nuevo alimento proteico sobre la fisiología y la microbiota intestinal del pez cebra.

En los últimos años, el pez cebra ha sido utilizado para evaluar enfermedades infecciosas producidas por diferentes patógenos acuáticos pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Mycobacteria*, *Streptococcus* y *Vibrio* (Rowe et al., 2014). También, se ha empleado para investigar el efecto y modo de acción de los probióticos (Rendueles et al., 2012;

Gioacchini et al., 2014, Caruffo et al., 2015; Qin et al., 2017; Girija et al., 2018). Entre los probióticos bacterianos ensayados en pez cebra se destaca *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup>, el cual ha sido extensamente estudiado (Gioacchini et al., 2010a y b; Giorgini et al., 2010; Avella et al., 2012; Gioacchini et al., 2012; Gioacchini et al., 2014, Falcinelli et al., 2015). Estos trabajos han demostrado que este probiótico es capaz de modular la microbiota intestinal y producir varios beneficios en el hospedador. Por otra parte, algunas levaduras aisladas de intestino de peces sanos, *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*, han demostrado tener potencialidad probiótica reduciendo la mortalidad de larvas de pez cebra ocasionada por el patógeno *V. anguillarum* (Caruffo et al., 2015). Otros trabajos han demostrado que el efecto beneficioso ha sido producido por compuestos expresados por diferentes bacterias, algunos de ellos liberados extracelularmente. Así, recientemente Girija et al. (2018) han demostrado que el sobrenadante de la cepa probiótica *Bacillus licheniformis* Dahb1 previno la infección producida por el patógeno *V. parahaemolyticus* Dahv2, y mejoró la supervivencia y el crecimiento del pez cebra, aunque aún no han podido identificar el agente causante de dicho efecto. En otro trabajo, un complejo exopolisacárido-proteína (EPSP) extraído de una cepa probiótica, *Lactobacillus casei* BL23, fue el responsable de aumentar significativamente la supervivencia de larvas libre de gérmenes de pez cebra luego de una infección producida por el patógeno *Aeromonas veronii* (Qin et al., 2017). Se demostró que el efecto protector de dicho compuesto (EPSP) estuvo mediado por una respuesta inmune (Qin et al., 2017).

## **9- Probióticos para acuicultura en Patagonia**

Frente al escenario mundial donde el crecimiento acelerado e intensivo de la acuicultura se ve limitado por mortandades impredecibles, debidas a interacciones negativas entre los peces y bacterias patógenas, y frente a las restricciones actuales en el uso de antibióticos; hoy en día existe una concreta y creciente demanda del sector acuícola por el empleo de probióticos. La contribución beneficiosa de las bacterias probióticas a la salud de los animales

acuáticos ha sido ampliamente descrita, y actualmente estas bacterias son demandadas por este sector para el control de las enfermedades de manera amigable con el ambiente y para la promoción del crecimiento. Debido a que los probióticos comerciales son poco eficaces en peces, principalmente porque la mayoría de ellos incluyen cepas que no provienen de organismos acuáticos y carecen de la capacidad de sobrevivir y permanecer viables en el ambiente intestinal de los mismos, se vuelve necesario estudiar microorganismos autóctonos como probióticos putativos, que están más adaptados a residir en el tracto gastrointestinal de los peces.

En Argentina, el estudio de bacterias con propiedades probióticas para su uso en acuicultura comenzó solo hace unos años (Pasteris et al., 2009, 2011; Sequeiros et al., 2010, 2015; Sica et al. 2012; Garcés et al., 2015; López Cazorla et al. 2015, Sequeiros et al., 2016). Los datos que existen sobre aislamientos de bacterias con actividad antimicrobiana provenientes de peces que pueblan los ríos y costas de la región patagónica argentina surgen de los estudios realizados por Sequeiros et al. (2010, 2015) y de la presente tesis doctoral (Garcés et al., 2015; Sequeiros et al., 2016). Patagonia cuenta con ambientes prístinos y casi sin explorar, los cuales constituyen un reservorio de microorganismos con posibles nuevas propiedades biotecnológicas que pueden ser útiles en la producción acuícola.

## OBJETIVO GENERAL

Aislar cepas autóctonas de ambientes acuáticos de la región patagónica y estudiar sus propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo*, para evaluar su potencial utilidad en acuicultura.

**Hipótesis general:** en los organismos acuáticos y en su entorno están presentes de forma natural microorganismos que pueden conferir beneficios a la salud del hospedador cuando son administrados periódicamente. Dichos microorganismos denominados probióticos pueden ser utilizados en acuicultura ya que al ser suministrados en forma periódica actuarían modulando la microbiota intestinal y mejorando el cultivo de especies acuáticas.

## **CAPÍTULO II**

### **Materiales y métodos**

## 1-Sitios de muestreo y ejemplares analizados

Las muestras analizadas fueron recolectadas entre mayo del año 2010 y julio del 2013 a partir de organismos acuáticos de la región patagónica. Los ejemplares incluyeron 8 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes del río Santa Cruz (Santa Cruz) y 3 del Centro de Salmonicultura Bariloche (Río Negro) (Fig. 3), 1 trucha marrón (*Salmo trutta*) del río Santa Cruz, 1 mero (*Acanthistius patachonicus*) y 1 turco (*Pinguipes brasilianus*) de arrecifes ubicados la zona de Puerto Lobos (Chubut) (Fig. 3), 1 escrófalo (*Sebastes oculatus*) de Punta Este (Chubut) y 1 pulpo (*Enteroctopus megalocyathus*) de Cerro Avanzado (Chubut) (Fig. 3). Las muestras se recolectaron en frascos estériles, se mantuvieron y transportaron refrigeradas en conservadora (8 °C) y procesadas dentro de las 24 h del muestreo.

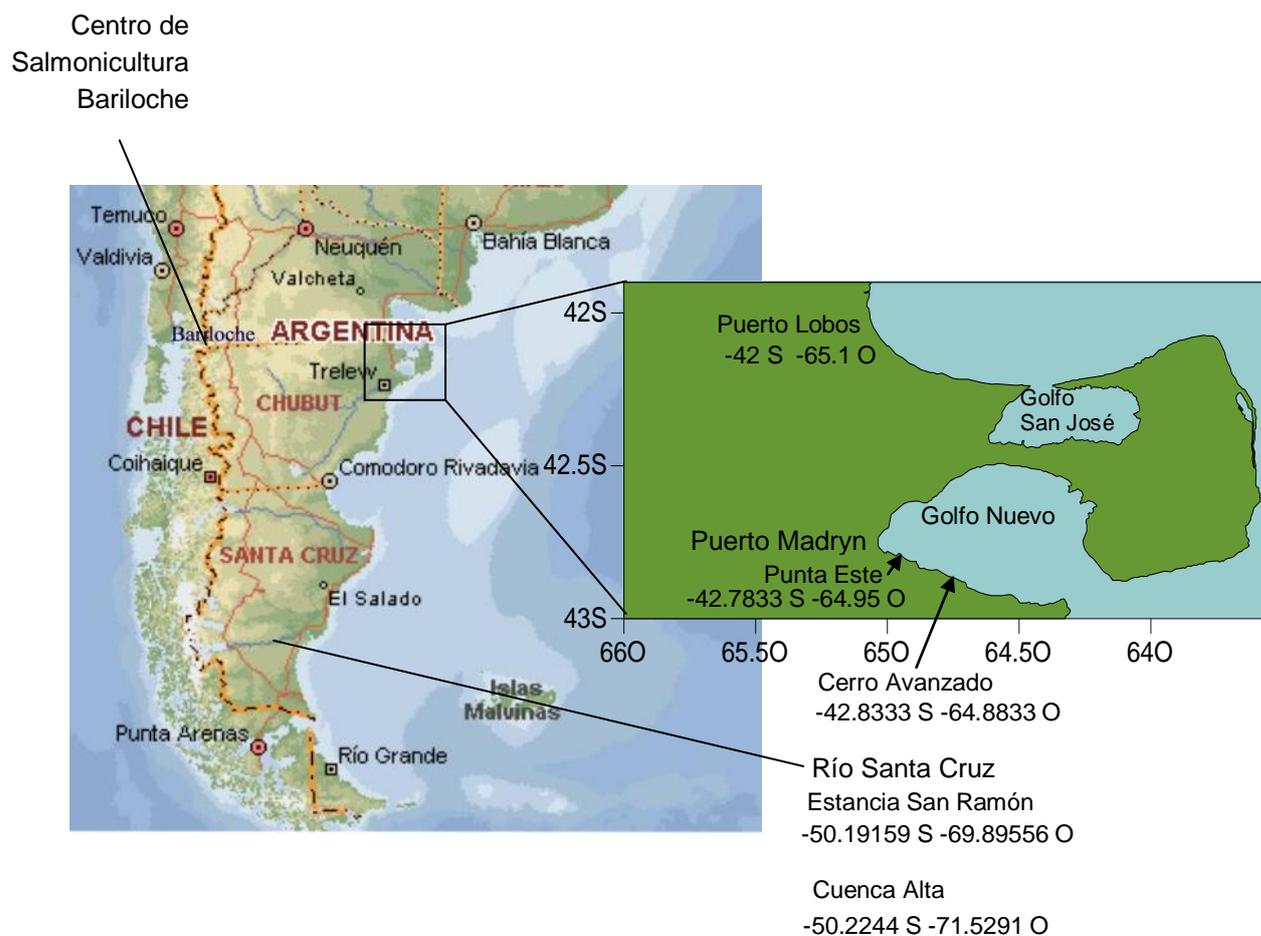


Figura 3: Sitios de muestreos

## 2- Medios de cultivo y condiciones de aislamiento

Cada ejemplar se diseccionó en condiciones de esterilidad utilizando material quirúrgico estéril. Las muestras de intestino o parte de él, en el caso de peces, o el sistema digestivo en el caso del pulpo, se trituraron y homogenizaron con 5 ml de solución fisiológica o solución salina marina estériles (0,9 o 2 % p/v de NaCl, respectivamente) de acuerdo a la procedencia del organismo acuático, agua dulce o de mar, respectivamente. A partir de estas muestras, se realizaron diluciones seriadas, y se sembraron 100 µl de cada dilución con espátula de Digralsky en placas de Petri conteniendo medio sólido De Man Rogosa and Sharpe (MRS, Britania) y Tripticasa Soja (TS, Britania). Para las muestras provenientes de organismos marinos los medios de cultivo fueron suplementados con 2 % p/v de NaCl. Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C. Una vez crecidas las colonias se eligieron al azar, se repicaron y organizaron sobre una placa de TSA o MRS de acuerdo al medio en que se aislaron. Luego de 24-48 h de incubación a 25 °C, de cada placa se realizaron réplicas mediante la técnica de la réplica en placa utilizando sellos con terciopelo (Roberts, 1959). Se presionó el sello estéril cubierto de terciopelo sobre la placa con colonias crecidas y, luego, para obtener las réplicas se presionó el sello sobre la superficie de placas de Petri nuevas y estériles. Las réplicas se incubaron a 25 °C durante 24-48 h. Para seleccionar aquellas colonias con actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de la doble capa descrita por Dopazo et al. (1988). Una vez crecidas las colonias, cada réplica fue cubierta con 10 ml de agar blando (0,8 % p/v de agar) previamente inoculado con el patógeno indicador para llegar a una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Los patógenos utilizados como cepas indicadoras en esta etapa de selección fueron: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *L. garvieae* 03/8460, *Y. ruckeri* ATCC 29473 y *C. piscicola* 4020. Cada patógeno fue previamente cultivado en los medios y temperaturas indicadas en la Tabla 2. Una vez armada la doble capa, las placas se dejaron 1 h en heladera para que las sustancias inhibitorias difundan a través del agar. Luego de un período de incubación de 24-48 h todas las colonias que presentaron halo de inhibición notorio contra alguna de las cepas indicadoras fueron seleccionadas para posteriores estudios. Las colonias

bacterianas que presentaron actividad antimicrobiana se purificaron mediante repiques sucesivos en los medios correspondientes en las que fueron aisladas y se conservaron a -80 °C en caldo de cultivo con glicerol (concentración final 20 % v/v).

La cepa H16 perteneciente a la colección bacteriana del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología (IPEEC-CONICET) se incorporó al trabajo realizado en la presente tesis. Esta cepa fue aislada del tracto intestinal de merluza (*Merluccius hubbsi*) de igual modo al descrito anteriormente. Las condiciones de cultivo de H16 son caldo o agar MRS suplementado con 1,5 % p/v de NaCl a una temperatura de 25 °C.

Patógeno	Medio de cultivo	Temperatura de incubación (°C)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	TS	25
<i>L. garvieae</i> 03/8460	MRS	30
<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	TS	30
<i>C. piscicola</i> 4020	MRS	30
<i>L. piscium</i> 23.3.92	MRS	25
<i>S. iniae</i> 2378	MRS	30
<i>V. anguillarum</i> 1603	TS 2 % NaCl	30
<i>V. alginolyticus</i> 03/8525	TS 2 % NaCl	30
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	TS 2 % NaCl	30
<i>V. harveyi</i> ATCC 14126	TS 2 % NaCl	30

**Tabla 2:** Medios de cultivo y temperatura de incubación de los patógenos utilizados en toda la tesis.

La relación entre la Abs<sub>600nm</sub> y las UFC/ml para todas las cepas utilizadas en esta tesis (bacterias aisladas y patógenas), se obtuvo mediante una curva de Abs<sub>600nm</sub> vs recuento en placa. Para esto, se obtuvo un cultivo de 18 h de cada cepa en el medio y condiciones de cultivo indicado anteriormente y se realizó una dilución hasta un valor de Abs<sub>600nm</sub> de 0,01. Luego, esta dilución se inoculó al 1% en erlenmeyers con 50 ml de medio de cultivo fresco. Se incubó a temperatura adecuada para cada cepa y cada 2 h hasta el inicio de la fase exponencial y cada una hora durante la fase exponencial, se tomaron muestras para medir Abs<sub>600nm</sub> y para realizar el recuento en placa mediante la técnica de la microgota (Nievas et. al., 2006). Este procedimiento se realizó por triplicado. De la curva de Abs<sub>600nm</sub> vs recuento (UFC/ml), durante la fase exponencial, se obtuvo la ecuación de la recta para calcular dicha relación.

## **2.1- Actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en agar**

Las cepas que presentaron actividad antimicrobiana por la técnica de la doble capa fueron cultivadas en 10 ml de caldo MRS o TS (según el medio en el que fueron aisladas) durante 24 h a 25 °C. Los cultivos obtenidos fueron centrifugados (7.000 g, 15 min) y los sobrenadantes libres de células analizados mediante la técnica de difusión en agar (Tagg et al., 1976).

El procedimiento consistió en preparar diferentes placas de Petri, cada una con una cepa indicadora (*L. garvieae* 03/8460, *Y. ruckeri* ATCC 29473 y *C. piscicola* 4020) sembrada en profundidad con una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Excepto para la cepa *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 que fue sembrada en superficie. El agar utilizado fue el adecuado para cada cepa indicadora según la Tabla 2. En las placas una vez solidificadas, se realizaron pocillos de 6 mm de diámetro con un sacabocado estéril. En cada pocillo se sembraron 50 µl de cada uno de los sobrenadantes libres de células. Las placas se dejaron 1 h en heladera para dejar difundir el agente antimicrobiano. Luego se colocaron en estufa a 25 °C durante 24-48 h. Se consideraron positivos todos aquellos sobrenadantes que

presentaron halo notorio de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora en la placa de agar.

Para ampliar el estudio del espectro antimicrobiano extracelular de las cepas seleccionadas, también se empleó la técnica de difusión en agar con los siguientes patógenos: *Lactococcus piscium* 23.3.92, *S. iniae* 2378, *V. anguillarum* 1603, *V. alginolyticus* 03/8525, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. harveyi* ATCC 14126, los medios y condiciones se describen en la Tabla 2.

## **2.2- Procedimientos y disposición de residuos peligrosos y patogénicos**

Los procedimientos para la disposición de residuos peligrosos y patogénicos se realizaron de acuerdo a los Instructivos de Gestión Interna de Residuos Peligrosos (GIRP) y a las Normas para la disposición de Residuos Patogénicos (RP) vigentes en la Institución, y elaboradas por el Comité de Seguridad Laboral y Bioseguridad (COSELABI) del CCT CONICET- CENPAT.

## **3- Caracterización de las cepas seleccionadas**

En la presente Tesis se estudiaron bacterias que fueron aisladas durante la etapa de búsqueda y selección (sección 2) como las cepas T4, T15 y M5; además, debido a la escasa cantidad y diversidad de bacterias encontradas con actividad antimicrobiana extracelular, se incorporaron al estudio dos cepas con interesantes propiedades que fueron previamente aisladas y parcialmente caracterizadas por nuestro grupo de investigación. Dichas cepas fueron H16 con capacidad de inhibir patógenos Gram negativos (sección 2) y *Lactococcus lactis* TW34 capaz de producir una de las pocas bacteriocinas aprobadas para su aplicación en alimentos (sección 5). Por este motivo y de acuerdo al grado de caracterización previo que presentó cada una es que fueron incorporadas en diferentes etapas de la presente Tesis. Las cepas T4, T15 y M5 fueron

aisladas de trucha arcoíris (Tabla 4), H16 de merluza y *L. lactis* TW34 de pejerrey (*Odontesthes platensis*).

### **3.1- Tinción de Gram**

Para realizar la tinción de Gram se tomó una colonia de la cepa bacteriana con un ansa y se extendió sobre un portaobjetos (frotis). Luego se fijó a la llama del mechero. Para la tinción de Gram se utilizó el kit de Gram (Britania, Argentina) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el frotis se observó al microscopio.

### **3.2- Prueba de la catalasa**

Se tomó una colonia con ansa estéril, se la colocó en un portaobjetos y se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (30 %) sobre la colonia, usando un gotero. La prueba se consideró positiva al observar de inmediato la formación de burbujas (Mac Faddin, 2003).

### **3.3- Identificación molecular**

El ADN de las 4 cepas seleccionadas (T4, T15, M5 y H16) se extrajo a partir de cultivos en caldo MRS utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ), usando los cebadores universales para procariotas 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' y 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3', según lo descrito en DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales del Laboratorio de Identificación Genética IdeGEN (IDEAus-CONICET). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) y con la base de datos EzTaxon-extended (Kim et al., 2012). Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank, registradas con los números de acceso KC921993 para H16 y MH350426 para T4 (las secuencias de ARNr 16S de las cepas T15 y M5 presentaron 100 % de homología con la secuencia de T4).

### **3.4- Capacidad hemolítica y susceptibilidad a los antibióticos**

#### ***Capacidad hemolítica***

La actividad hemolítica fue determinada de acuerdo a Cowan y Steel (1993). Se emplearon placas con agar base (Britania) suplementado con 5% de sangre humana. La sangre, obtenida de donadores sanos, fue previamente defibrinada con perlas de vidrio en condiciones estériles y agregada al agar base (Bøyum, 1976). Las cepas se cultivaron en caldo MRS y se incubaron 48 h a 25 °C. Posteriormente, y a partir de esos cultivos, se realizó una estría de cada cepa BAL en las placas de agar sangre. *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 fue empleado como control positivo. Luego de la incubación (48 h a 25°C), se consideró como hemolíticas a aquellas cepas que presentaron halos verdes y/o incoloros alrededor de las colonias.

#### ***Susceptibilidad a los antibióticos***

La susceptibilidad a los antibióticos fue evaluada por el método de difusión en discos en agar Mueller-Hinton utilizando el método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) y siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico (NCCLS, 2000). Se preparó una suspensión de cada cepa en buffer fosfato salino (PBS: NaCl 150 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, pH=7) tomando entre 3 y 5 colonias, y se ajustó a una densidad óptica final equivalente a 0,5 de la escala Mac Farland. Hisopos embebidos en estas suspensiones se utilizaron para diseminar las cepas sobre la superficie del agar Mueller-Hinton. Los discos de antibióticos utilizados (Laboratorios Britania SA, Argentina) contenían: penicilina (10 U), oxacilina (1

µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), trimetoprima /sulfametoxazol (1,25 / 23,75 µg), vancomicina (30 µg), levofloxacin (5 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), minociclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg) y teicoplanina (30 µg). Los discos de antibióticos se colocaron en la superficie del agar (6 discos en cada placa) y las placas se incubaron durante 24 h a 35 °C. Una vez finalizado este periodo se llevo a cabo la medición de los halos de inhibición, y los antibiogramas fueron interpretados de acuerdo con el Comité Nacional de Estándares para el laboratorio clínico (NCCLS, 2000). Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como sensible, resistente y resistencia intermedia.

#### **4- Producción del agente causante de la actividad antimicrobiana y su caracterización**

##### **4.1- Curva de crecimiento bacteriano y producción del agente antimicrobiano de las cepas T4, T15 y M5**

Las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *Carnobacterium* sp. T15, *Carnobacterium* sp. M5 fueron cultivadas en caldo MRS inoculado al 1 % con un cultivo overnight con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, e incubadas a 25 °C durante 50 h. A las 0, 4, 12, 24 y 48 h se tomaron muestras de cada cultivo para evaluar el crecimiento microbiano midiendo absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) y para cuantificar la actividad antimicrobiana según el protocolo descrito en la sección 4.3-. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

##### **4.2- Curva de crecimiento bacteriano y producción del agente antimicrobiano de la cepa H16**

H16 fue cultivada en caldo MRS inoculado al 1 % con un cultivo overnight con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, e incubada a 25 °C durante 36 h. A las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 23, 27, 33 y 36 h se tomaron muestras del cultivo

para evaluar el crecimiento microbiano midiendo absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) y la producción de antimicrobianos asociada al pH del sobrenadante del cultivo. También, se midió la actividad antimicrobiana del sobrenadante contra *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 y *V. alginolyticus* 03/8525 mediante la técnica de difusión en agar (sección 2.1-). Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.3- Cuantificación de actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células**

Se realizaron diluciones seriadas al medio (1/2) de los sobrenadantes de los cultivos de T4, T15, M5 y H16 en agua estéril, posteriormente se cuantificó la actividad inhibitoria mediante la prueba de difusión en agar (sección 2.1-), sembrando 50  $\mu\text{l}$  de cada dilución. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias /ml (Sequeiros et al., 2010). Las unidades arbitrarias (UA) equivalen a la inversa de la mayor dilución con actividad antimicrobiana (halo de inhibición), dividido por los mililitros sembrados ( $\text{UA}=\text{dilución}^{-1}/ 0,050 \text{ ml}$ ).

#### **4.4- Evaluación de ácidos orgánicos y proteínas de alto peso molecular**

Las cepas T4, T15, M5 y H16 fueron cultivadas en caldo MRS, durante 24 h a 25 °C. Luego los cultivos fueron centrifugados (7.000 g, 15 min). Los sobrenadantes libres de células se fraccionaron en 3 alícuotas, la primera se denominó “crudo”, la segunda a la que se le ajustó el pH a un valor de 6,5 con NaOH (0,5 M) se denominó “alcalinizado” y a la tercera, que además de alcalinizarla, fue sometida a un calentamiento a 100 °C por 5 min se la denominó “calentado”. Luego, estos sobrenadantes fueron evaluados mediante la técnica de difusión en agar (sección 2.1-). La neutralización tuvo como propósito eliminar la posible actividad bactericida o bacteriostática de los ácidos

orgánicos y el calentamiento a 100 °C de inhibir la posible actividad antimicrobiana de proteínas de alto peso molecular (Sequeiros et al., 2010).

#### **4.5- Sensibilidad a la catalasa**

Este ensayo se realizó con el fin de analizar si el agente causante de la actividad antimicrobiana fue el peróxido de hidrógeno (Sorroza 2012). Se cultivaron T4, T15, M5 y H16 en MRS durante 24 h a 25 °C. Se obtuvieron los sobrenadantes libres de células los cuales fueron neutralizados. Luego, a 250 µl de cada sobrenadante se adicionó 200 µl de buffer fosfato 0,05 M pH=7 y 50 µl de catalasa a una concentración de 50 mg/ml (50 mg de catalasa disueltos en 1 ml de buffer fosfato 0,05 M pH 7) (Gilliland, 1969). Como control positivo se utilizó una alícuota de sobrenadante neutralizado y diluido, y como control negativo la enzima más el buffer. Las muestras fueron incubadas por 1 h a 25 C° y la actividad antimicrobiana residual fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar contra *C. pisciola* 4020 para las cepas T4, T15 y M5; y contra *V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 para H16.

#### **4.6- Sensibilidad a la tripsina**

Para determinar si el agente antimicrobiano era de naturaleza proteica se determinó la sensibilidad a tripsina (Sequeiros et al., 2010). Se cultivaron las cepas T4, T15 y M5 en MRS durante 24 h a 25 °C y se obtuvieron los sobrenadantes libres de células. El pH de estos sobrenadantes fue ajustado a 6,5 con NaOH 0,5 M. Se preparó la mezcla de reacción tomando 250 µl de sobrenadante de cada cepa y adicionando 50 µl de un stock de tripsina (conteniendo 10 mg de tripsina (Sigma)/ml de buffer Tris-HCl 0,15 M pH=8 con CaCl<sub>2</sub> 40 mM), 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y 100 µl de agua estéril. Como control positivo se utilizó una alícuota de 250 µl sobrenadante neutralizado y diluido con 250 µl agua estéril, y como control negativo 50 µl de enzima más 450 µl del

buffer. Las mezclas fueron incubadas por 3 h a 25 °C y la actividad antimicrobiana residual fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar contra *C. piscicola* 4020 (sección 2.1-).

#### **4.7- Identificación de bacteriocinas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS)**

Se cultivaron las cepas T4, T15 y M5 en MRS durante 48 h a 25 °C. Se obtuvieron los sobrenadantes libres de células, éstos fueron calentados a 100 °C por 5 min con el fin de inactivar enzimas hidrolíticas. Se tomaron 9 ml de cada sobrenadante y se adicionó 1 ml de NaCl 3,4 M con el fin de minimizar interacciones iónicas entre polipéptidos altamente cargados (como suele pasar con una gran mayoría de bacteriocinas), se homogeneizó y luego se volvió a centrifugar (10.000 g, 15 min) con el objetivo de eliminar cualquier precipitado proteico. Con el fin de purificar parcialmente las bacteriocinas de otras proteínas de mayor peso molecular se utilizaron unidades de filtración para centrífuga CENTRICON Ultracel YM-10 (Millipore), conteniendo una membrana filtrante de celulosa regenerada con un límite nominal de peso molecular (NMWL) de 10 kDa. Los sobrenadantes de cada una de las cepas fueron colocados en las unidades de filtración y se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, con el fin de corroborar dónde se encontraban las bacteriocinas se evaluó la actividad antimicrobiana en ambos compartimentos de la unidad de filtración, en el retenido y en el filtrado, utilizando la técnica de difusión en agar con la cepa indicadora *C. piscicola* 4020. Las tres cepas T4, T15 y M5 mostraron actividad antimicrobiana solamente en el retenido.

Posteriormente, cada fracción retenida fue liofilizada y enviada al Servicio de espectrometría de masas del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) en la Universidad de Buenos Aires (UBA - CONICET) para su análisis. Las muestras fueron resuspendidas en buffer bicarbonato de amonio 50 mM pH=8, reducidas con DTT 20 mM durante 45 min a 56 °C y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM

durante 45 min en oscuridad. Luego, cada muestra se digirió con tripsina durante toda la noche. Los digeridos con tripsina se limpiaron con Zip-Tip C18 para extraer sales. Las muestras se analizaron por nanoHPLC (Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000) acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap (masa exacta), que permitió la separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de cada muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realizó por electrospray y el análisis de los datos obtenidos con el programa Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Las búsquedas en la base de datos se realizaron usando el motor de búsqueda SEQUEST, contra bases de datos de secuencias de proteínas de *Carnobacterium* sp. y de bacteriocinas en general en UniProt (UniProt, 2016), y bases de datos armadas con las secuencias de las bacteriocinas de *Carnobacterium* encontradas hasta el momento. Se aplicaron los siguientes parámetros de búsqueda; enzima: tripsina; sitios de escisión faltantes: 2; tolerancia de masa para precursor: 10 ppm, tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da; Modificaciones dinámicas: oxidación (M); modificaciones fijas: carbamidometilo (C). De acuerdo a las indicaciones del CEQUIBIEM las proteínas se consideraron con impacto significativo si cumplieron con la tasa de falso descubrimiento menor al 1 % y la identificación de al menos dos péptidos de alta confianza diferentes.

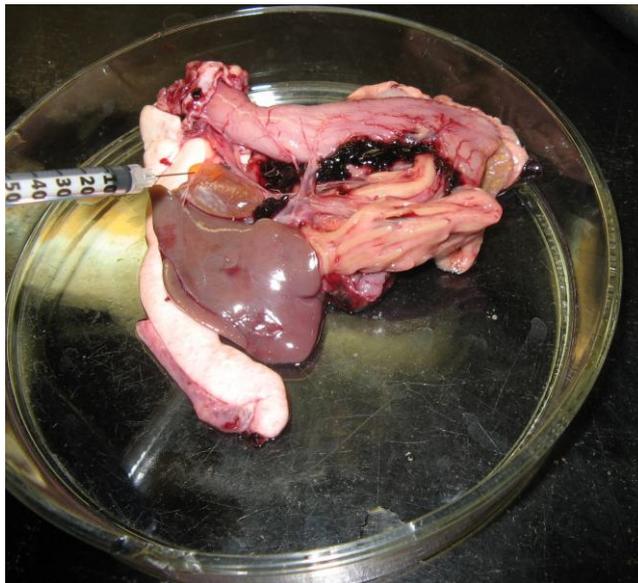
## **5- Propiedades Probióticas**

La cepa *Lactococcus lactis* TW34 perteneciente a la colección bacteriana de los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología (IPEEC-CONICET) y de Bioquímica (CESIMAR-CONICET) fue incorporada al desarrollo de la presente tesis para evaluar sus propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo*. Esta cepa fue aislada del intestino de pejerrey (*Odontesthes platensis*) y posee una importante actividad antimicrobiana contra el patógeno *L. garvieae* 03/8460, baja resistencia a antibióticos y no es hemolítica (Sequeiros et al., 2010). Esta cepa con potencial probiótico pertenece a un género distinto de las cepas mencionadas anteriormente y es productora de la

bacteriocina nisina Z, única bacteriocina aprobada para aplicaciones alimentarias (Sequeiros et al., 2015). Las condiciones de cultivo de TW34 fueron caldo o agar MRS a una temperatura de 25 °C.

### 5.1- Resistencia a la bilis

Para obtener la bilis se sacrificaron 5 ejemplares de trucha arcoíris sanas, de aproximadamente 300 g, usando triclaína (1 mg/ml) por 15 min (Underwood et al., 2013). Los peces fueron procesados 72 h después de la última comida. Se realizó la disección en forma aséptica y se extrajo la bilis mediante punción de la vesícula biliar (Fig. 4). La bilis fue almacenada en recipientes estériles a -20 °C hasta el momento de su uso.



**Figura 4:** Obtención de bilis de trucha arcoíris.

El ensayo de resistencia a bilis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Nikoskelainen et al. (2001b). T4, H16 y TW34 fueron cultivadas en caldo MRS a 25 °C durante 24 h. Las células se recogieron por centrifugación (7.000 g, 15 min), se lavaron dos veces en buffer fosfato salino

(PBS: NaCl 150 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, pH=7,2) y se resuspendieron en el mismo buffer. La densidad óptica de las suspensiones se ajustó a un valor de absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) igual a 0,250 que corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Se distribuyeron 500  $\mu\text{l}$  de las suspensiones en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron (7.000 g, 15 min), se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de buffer PBS estéril (control) o 500  $\mu\text{l}$  PBS estéril conteniendo bilis de trucha arcoíris al 10 % (v/v). Las muestras se incubaron durante 90 min a 30 °C. Después del período de incubación se realizaron diluciones seriadas en buffer PBS estéril y se realizaron los recuentos de viables en placas de agar MRS. Los resultados se expresaron como el logaritmo en base 10 de las UFC/ml. La exposición a la bilis se ensayó por triplicado.

## **5.2- Resistencia al pH**

Se obtuvieron suspensiones celulares de cada una de las cepas (T4, H16 y TW34) como se indicó en la sección 5.1-, utilizando buffer PBS a pH 2, 3 y 6,5 (ajustado con HCl 1N) y como control pH 6,5. Se tomaron muestras de 1 ml a tiempo 0 y luego de 90 min de incubación a 25 °C. Se realizaron diluciones seriadas al décimo en buffer PBS y se realizó el recuento en placa en agar MRS. Los resultados se expresaron como el logaritmo en base 10 de las UFC/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## **5.3- Capacidad de adhesión**

### **5.3.1- Test de hidrofobicidad**

La hidrofobicidad de la superficie de las células bacterianas se evaluó según lo descrito por Pérez-Sánchez et al. (2011). Las cepas T4, H16 y TW34 fueron cultivadas en caldo MRS a 25 °C durante 48 h. Estos cultivos se centrifugaron (7.000 g, 15 min), se lavaron tres veces con PBS y se

suspendieron en el mismo buffer. La densidad óptica de las suspensiones se ajustó a una absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) de 1,0. Se colocaron 3 ml de la suspensión bacteriana en un tubo y se agregaron 600 $\mu\text{l}$  de tolueno, se mezcló en vórtex a máxima velocidad durante 2 min y se dejó reposar la mezcla hasta la completa separación de las dos fases. Luego se extrajo cuidadosamente la fase acuosa y se leyó la absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ). El porcentaje de hidrofobicidad (H %) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$H \% = [(Abs_i - Abs_f) / Abs_i] \times 100$$

Donde  $Abs_i$  y  $Abs_f$  son la absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) de la suspensión original y luego de la exposición al tolueno, respectivamente. El ensayo fue realizado por triplicado. La clasificación fue realizada de acuerdo a Mattos-Guaraldi et al. (1999) (Tabla 3).

<b>Clasificación</b>	<b>Porcentaje de hidrofobicidad</b>
Hidrofílica	< 20 %
Moderadamente hidrofóbica	20-50 %
Hidrofóbica	> 50 %

**Tabla 3:** Clasificación de las cepas bacterianas en base al porcentaje de hidrofobicidad.

### 5.3.2- Adhesión selectiva al mucus de trucha arcoíris

#### *Obtención de suspensiones celulares*

Para la obtención de las suspensiones celulares las cepas T4, TW34 y H16 se cultivaron en caldo MRS durante 48 h a 25 °C. A continuación, los cultivos se centrifugaron (7.000 g, 15 min) y las células se lavaron dos veces con buffer PBS. Finalmente, éstas se suspendieron en buffer PBS hasta una absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) de 0,250 (aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml), y luego cada suspensión se diluyó a  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Sica, 2013).

### ***Obtención de mucus***

El mucus se obtuvo a partir de la superficie del cuerpo de trucha arcoíris sana inmediatamente después de ser sacrificada, raspando cuidadosamente la piel con una espátula de goma (Fig. 5). El mucus se recogió en un pequeño volumen de buffer PBS y luego se centrifugó (3.500 g, 5 min) para eliminar las partículas y el resto de material celular. Las suspensiones de mucus se homogeneizaron y la concentración de proteína se ajustó a 0,5 mg/ml (Sica et al., 2012). Las proteínas se determinaron utilizando el método de Bradford (1976). Se empleó albúmina de suero bovino (Sigma) para realizar la curva patrón. Las suspensiones de mucus se almacenaron en alícuotas de 1 ml a -80 °C hasta su uso.



**Figura 5:** Obtención de mucus de trucha arcoíris.

### **Adhesión al mucus**

La adhesión de las cepas T4, TW34 y H16 al mucus de trucha arcoíris se evaluó de acuerdo al protocolo descrito por Sica et al. (2012). Brevemente, para inmovilizar el mucus de trucha arcoíris previamente preparado, se colocaron 100  $\mu$ l del mismo sobre un cubreobjeto de vidrio, limpio y estéril, y se incubó durante 18 h a 4 °C. El exceso de mucus se eliminó mediante 2 lavados sucesivos con 150  $\mu$ l de buffer PBS estéril. Se añadió una alícuota de 100  $\mu$ l de la suspensión celular, obtenida como fue detallado al comienzo de esta sección, a cada cubreobjeto que contenía el mucus inmovilizado. Se repitió este procedimiento para cada cepa. Después de la incubación durante 1 h a 18 °C, los cubreobjetos se lavaron dos veces con 250  $\mu$ l de buffer PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Para evaluar si la adhesión al mucus de las cepas se debía a una adhesión no específica, también se midió su adhesión al vidrio (Sica et al., 2012), para lo cual se procedió de igual modo, pero los vidrios no estuvieron en contacto con mucus. La adhesión se evaluó mediante microscopía óptica (Estándar RA, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) después de la tinción de Gram (sección 3.1-) con un kit (Britania). Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron como el logaritmo en base 10 del número de células por  $\text{cm}^2$  después de contar al menos 20 campos con un cubreobjetos.

#### **5.3.3- Ensayo de exclusión competitiva contra patógenos de peces**

Se evaluó la capacidad que presentó H16, por ser la única que presentó adhesión específica a mucus, de evitar la adhesión de *V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 al mucus de trucha arcoíris. Se preparó la suspensión de H16 y el mucus de trucha arcoíris como se describió en la sección 5.3.2-. *V. alginolyticus* se cultivó en caldo de TS con 2 % p/v de NaCl y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en TS, ambos a 25 °C

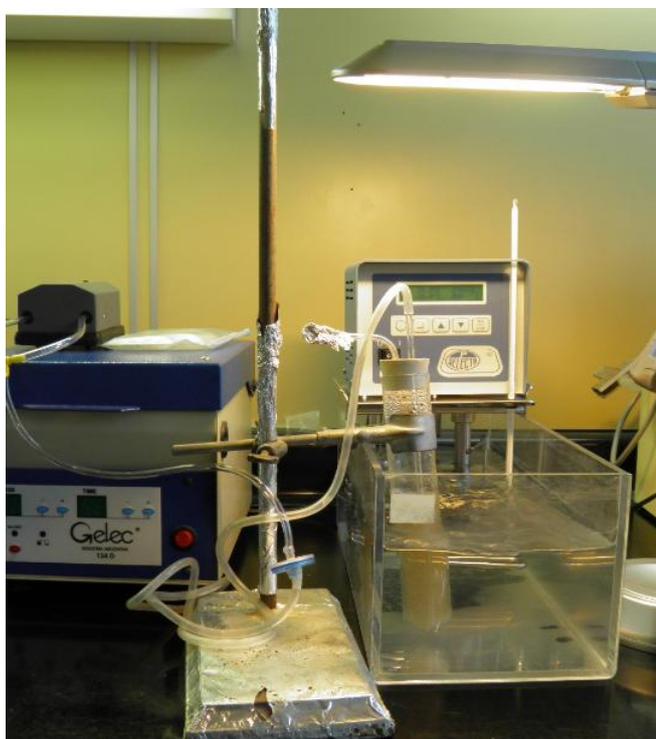
durante 48 h. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con buffer PBS y se ajustaron a una absorbancia ( $\lambda=600\text{nm}$ ) de 0,250 en PBS (aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml). La suspensión de H16 se mezcló con cada suspensión de patógenos (1: 1) y se añadieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  sobre el mucus inmovilizado sobre el cubreobjetos. Después de la incubación durante 1 h a 18 °C, los cubreobjetos se lavaron dos veces con 250  $\mu\text{l}$  de buffer PBS para eliminar las bacterias no adheridas (Sica, 2013). La adherencia se evaluó mediante microscopía óptica como se indicó en la sección **5.3.2-**. Dado que H16 es una cepa Gram positiva, se distinguió de los patógenos Gram negativos sobre la base de la tinción de Gram. Los resultados de tres repeticiones independientes se expresaron como el número de patógenos adheridos por  $\text{cm}^2$  y se compararon con la adhesión del patógeno sin la adición de H16 (control).

#### **5.3.4- Evaluación de sustancias tensioactivas**

Se evaluó la capacidad que presentó H16, por ser la única que presentó adhesión específica a mucus, de producir sustancias tensioactivas. Se cultivó H16 en agar MRS con 1,5 % p/v de NaCl durante 48 h a 25 °C. Se recuperaron las células de la placa (~ 30 mg de peso seco) teniendo cuidado de no recoger medio sólido, se lavaron dos veces con solución salina y se resuspendieron en 15 ml de solución salina tamponada con PBS pH 7,2. Las suspensiones se agitaron en un agitador orbital a 120 rpm y 25 °C durante 2 h para promover la liberación de las sustancias tensioactivas (biosurfactante). Las bacterias se eliminaron por centrifugación (7.000 g, 10 min) y se determinó la tensión superficial con un tensiómetro de anillo Du Noüy (Decalab) a 25 °C. También, H16 se cultivó en caldo MRS con 1,5 % p/v de NaCl a 25 °C durante 48 h, y se determinó la tensión superficial de los sobrenadantes del cultivo y de los controles sin inóculo con el fin de evaluar la producción extracelular de biosurfactante.

## 6- Obtención de *Artemia franciscana* axénica

Con el fin de obtener quistes de *Artemia franciscana* estériles y posteriormente nauplios de *Artemia* estériles o axénicos, se pesaron 0,2 g de quistes y se hidrataron durante 60 min en agua estéril. Inmediatamente después se removieron sus cápsulas utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 50 % (partiendo de 60 g/l de cloro activo) durante 35 segundos, y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril (Garcés et al., 2015). Finalmente, los quistes se desinfectaron en una solución de cloruro de benzalconio al 0,1 % v/v por 15 segundos para eliminar las bacterias asociadas y se enjuagaron con agua destilada estéril (Garcés et al., 2015). Luego, los quistes fueron colocados en un tubo eclosionador estéril con 100 ml de agua de mar estéril, con aireación estéril (para lo cual se utilizó un filtro de 0,20  $\mu\text{m}$ ) y se incubaron durante 19 h a 28 °C con luz artificial (Fig. 6).



**Figura 6:** Eclosión de *Artemia*: tubo eclosionador sumergido en baño termostático a 28 °C, con aireación estéril y luz artificial.

A fin de constatar la ausencia de bacterias sobre los nauplios de *Artemia*, se realizó el recuento de viables presentes en los nauplios recién eclosionados. Para esto, se recolectaron 100 nauplios y se colocaron en 1 ml de agua de mar estéril. Luego se homogeneizaron con un micropistilo estéril, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar TS.

### **6.1- Efecto de *V. alginolyticus* y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* sobre nauplios de *Artemia franciscana***

Para evaluar el efecto de cada patógeno sobre nauplios de *A. franciscana*, primero se obtuvieron nauplios de *Artemia* axénicos como se describió en la sección 6-. Luego, se prepararon nueve recipientes con tapa con 100 ml agua de mar estéril y se colocaron 100 nauplios axénicos en cada uno. A tres recipientes se le agregó un inóculo conteniendo  $5,3 \times 10^5$  UFC/ml del patógeno *V. alginolyticus* 03/8525. Otros tres recipientes fueron inoculados con  $4 \times 10^8$  UFC/ml *A. salmonicida* ATCC 33658 y tres recipientes fueron empleados como control, conteniendo sólo nauplios axénicos. Luego de 48 h de incubación a 28 °C se registró la supervivencia de los nauplios contando el número de nauplios vivos.

### **6.2- Bioencapsulación de H16 en *Artemia franciscana***

Se obtuvieron nauplios de *Artemia* axénicos como se describió en la sección 6-. Por otro lado, se prepararon suspensiones de H16 como se describió en la sección 5.3.2-. Los nauplios se cosecharon y se distribuyeron a una densidad de 100 nauplios por tubo con 10 ml de agua de mar estéril. Inmediatamente, los tubos se inocularon con la cepa H16, en las concentraciones finales  $1 \times 10^5$ ;  $0,5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  UFC/ml de agua de mar. Los controles se realizaron con agua de mar estéril y nauplios axénicos sin la adición de H16. Se realizaron triplicados de cada tratamiento. Luego de incubar los tubos a 28 °C durante 24 h, se realizó el recuento de H16 bioencapsulado

en *Artemia*. Los 100 nauplios de cada tubo fueron lavados a fondo con agua de mar estéril para remover bacterias no adheridas a *Artemia*. Luego, los nauplios se homogeneizaron en forma estéril con un micropistilo, se realizaron diluciones seriadas y se sembró en agar MRS. Los resultados fueron expresados como UFC/nauplio de *Artemia* (Garcés et al., 2015).

### **6.3- Desafío *in vivo* de *Artemia franciscana* enriquecida con H16 frente a la acción de *V. alginolyticus***

Se realizaron dos experimentos de desafío usando nauplios de *A. franciscana* infectados con *V. alginolyticus* 03/8525 para evaluar la actividad probiótica de H16 *in vivo*. Se obtuvieron nauplios axénicos como se describió en la sección 6-. Después de 19 h de incubación de los quistes a 28 °C, se distribuyeron 100 nauplios axénicos en 100 ml de agua de mar estéril en recipientes estériles con tapa.

En el primer experimento de desafío se realizaron tres tratamientos, por triplicado, utilizando los recipientes con nauplios axénicos antes mencionados. El primer tratamiento consistió en inocular los recipientes con H16 de manera de obtener una concentración final de  $4,6 \times 10^5$  UFC/ml de agua de mar. En el segundo tratamiento, los recipientes fueron inoculados con *V. alginolyticus* 03/8525 con una concentración final de  $5,3 \times 10^5$  UFC/ ml de agua de mar. En el tercer tratamiento los recipientes fueron inoculados simultáneamente con H16 y *V. alginolyticus* 03/8525, usando las concentraciones finales antes mencionadas. Ambas cepas, H16 y *V. alginolyticus* se inocularon inmediatamente después de distribuir los nauplios en los recipientes, en una sola dosis. Luego de 48 h de incubación a 28 °C, se registró la tasa de supervivencia de los nauplios.

En el segundo experimento de desafío, se evaluó el efecto de la inoculación de H16 previamente a la infección por *V. alginolyticus*. En este caso también se realizaron tres tratamientos, por triplicado, con nauplios axénicos en agua de mar estéril. El primer tratamiento consistió en inocular los recipientes,

inmediatamente después de distribuir los nauplios, con H16 (concentración final  $4,6 \times 10^5$  UFC/ml agua de mar). En el segundo tratamiento, los recipientes fueron inoculados con *V. alginolyticus* 03/8525 (concentración final  $5,3 \times 10^5$  UFC/ml agua de mar), después de 24 horas de incubación del recipiente con los nauplios axénicos. En el último tratamiento los recipientes fueron inoculados, inmediatamente después de distribuir los nauplios, con H16 ( $4,6 \times 10^5$  UFC/ml agua de mar) y 24 h después fueron inoculados con el patógeno *V. alginolyticus* 03/8525 ( $5,3 \times 10^5$  UFC/ml agua de mar). Los inóculos H16 y *V. alginolyticus* se administraron en una sola dosis. La duración del ensayo fue de 72 h y luego se registró la tasa de supervivencia de los nauplios.

En ambos experimentos, se usaron como control tres recipientes estériles con nauplios axénicos en agua de mar estéril.

## **7- Conservación de las cepas probióticas para los ensayos *in vivo***

Con el fin de conservar la viabilidad de las cepas probióticas hasta el momento de su incorporación en el alimento, se realizaron ensayos de congelación y almacenamiento a  $-20$  y  $-80$  °C. Se evaluó la supervivencia de las cepas a las 24 h y a los 60 y 90 días de almacenamiento a dichas temperaturas. Para este fin, se prepararon las suspensiones celulares de T4, H16 y TW34 como se describió en la sección **5.3.2**-. Los pellets celulares una vez centrifugados (7.000 g, 15 min) y lavados 3 veces con PBS estéril, fueron resuspendidos en leche descremada estéril al 10 % p/v. Estas suspensiones fueron fraccionadas de a 500  $\mu$ l, congeladas a  $-20$  y  $-80$  °C y almacenadas por 90 días. Se realizaron recuentos a tiempo cero (antes de congelarlas), a las 24 h para evaluar el proceso de congelamiento, y a los 60 y 90 días para evaluar el almacenamiento. A los diferentes tiempos se descongelaron las suspensiones celulares, se lavaron 2 veces con buffer PBS, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron sobre placas de agar MRS que fueron incubadas a  $25$  °C por 24 h. Los resultados se expresaron como el porcentaje de viabilidad respecto al tiempo cero.

## **8- Ensayos *in vivo* empleando el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental vertebrado**

Para realizar los ensayos *in vivo*, como parte fundamental del desarrollo de la presente tesis, utilizando como modelo de experimentación al pez cebra fue necesario diseñar, construir y optimizar un bioterio para dicho pez en las instalaciones del acuario experimental del CCT CONICET- CENPAT. El diseño y la optimización del bioterio se encuentran detallados en el Anexo de la presente tesis.

Los procedimientos para el cuidado y uso del pez cebra se realizaron conforme a la guía del cuidado y uso de animales de laboratorio (NAS, 2010).

### **8.1- Diseño experimental: ensayo de colonización y ensayo de crecimiento**

En los dos ensayos *in vivo* realizados (ensayo de colonización y persistencia y ensayo para evaluar los parámetros de crecimiento del pez) se utilizaron 4 sistemas independientes con recirculación de agua, con tres peceras cada uno (ver Anexo). Cada pecera se consideró una unidad experimental. Uno de los sistemas de recirculación se usó como control sin probiótico y los otros tres fueron usados para evaluar los diferentes probióticos T4, H16 y TW34, uno por sistema.

En ambos ensayos se utilizaron individuos juveniles de pez cebra, de 4 meses de edad para el ensayo de colonización y de 2 meses para el ensayo que estudió los efectos de los probióticos sobre los parámetros de crecimiento.

En cada pecera se colocaron 30 individuos de pez cebra para el ensayo de colonización y 18 individuos para el ensayo de crecimiento, todos ellos obtenidos y criados en nuestro laboratorio/bioterio (ver Anexo). Los peces se alimentaron con una ración diaria de alimento comercial (TetraMin) correspondiente al 4 % de su peso corporal. Esta ración de alimento se dividió en dos fracciones iguales que se administraron dos veces al día (una por la

mañana y otra por la tarde), durante 14 días para el ensayo de colonización y durante 90 días para el ensayo de crecimiento.

En los tratamientos con probióticos el alimento comercial fue suplementado con T4, H16 o TW34 en una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento. Para la preparación del alimento con cada probiótico, las cepas almacenadas a  $-80$  °C fueron descongeladas diariamente y lavadas dos veces con PBS estéril antes de ser incorporadas al alimento. La mezcla de cada cepa individual con el alimento se realizó en el momento de suministrar el alimento. El grupo control se alimentó con el alimento comercial con el agregado de un volumen de buffer PBS estéril, igual al volumen que se utilizó en la preparación de los probióticos. Al momento de alimentar los peces, cada sistema de recirculación fue detenido, la pecera abierta y se esperó que los peces consumieran todo el alimento. Luego, se realizó la limpieza diaria y se acondicionó cada pecera para volver a conectar la recirculación.

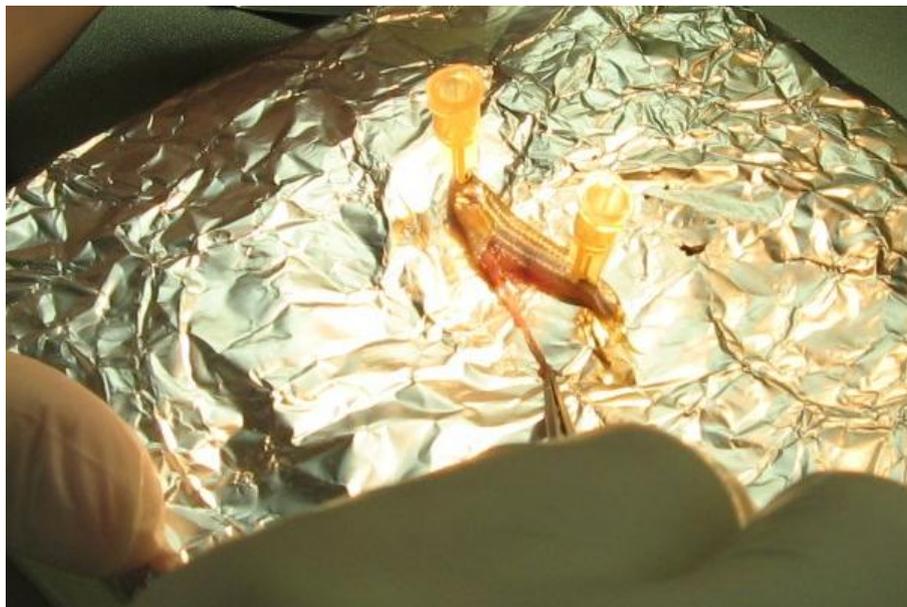
Con el fin de evaluar la persistencia de las cepas probióticas en el tracto intestinal del pez cebra, en el ensayo de colonización a partir del día 14 todos los grupos fueron alimentados con alimento comercial (sin probióticos) hasta el día 16, último día del ensayo.

Los peces fueron mantenidos a una temperatura de  $28,5$  °C  $\pm$   $0,5$  °C, con fotoperíodo 12:12 y óptima calidad de agua siguiendo los protocolos sugeridos por Westerfield (2000) y [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html).

### **8.1.1- Análisis de la microbiota intestinal**

La evaluación de la microbiota intestinal de los peces, tanto en el ensayo de colonización como en el de crecimiento, se realizó según el protocolo que se describe a continuación. A los 2, 7, 14 y 16 días del ensayo de colonización y a los 90 días del ensayo de crecimiento, 3 peces por pecera (unidad experimental) para el ensayo de colonización y 5 peces para el ensayo de crecimiento fueron sacrificados con Triclaína (500 mg/ml) (Underwood et al., 2013). Antes de proceder a su disección, cada pez fue lavado mediante tres

inmersiones en diferentes recipientes con agua estéril. Luego, el pez fue colocado sobre una esponja (envuelta en papel aluminio y previamente esterilizada), fijado a la misma mediante agujas estériles y el intestino completo fue extraído en condiciones de esterilidad (Fig. 7).



**Figura 7:** Disección del pez cebra y extracción del intestino.

El contenido intestinal se removió haciendo presión, para luego enjuagar dos veces el intestino con buffer PBS estéril. Luego, se realizó un pool de 3 intestinos por microtubo (2 ml), provenientes de tres peces de la misma pecera para minimizar la variación intra-individuo para el ensayo de colonización, mientras que se usaron 5 peces para realizar el pool en el ensayo de crecimiento.

El microtubo con los intestinos fue pesado para calcular por diferencia de peso los gramos de intestino. A continuación, la muestra fue homogeneizada con 800  $\mu$ l de buffer PBS estéril con un micropistillo estéril. Finalmente, mediante diluciones seriadas se realizó el recuento en placa de bacterias viables en diferentes medios: bacterias totales en medio TSA (Britania), bacterias ácido lácticas en agar MRS (Britania), bacterias del género *Vibrio* en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS, Biokar) y enterobacterias en agar

bilis rojo violeta glucosado (VRBG, Biokar). La preparación de cada medio se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las placas se incubaron a 25 °C por 72 h. Los recuentos se expresaron como el logaritmo en base 10 de las UFC/g de intestino.

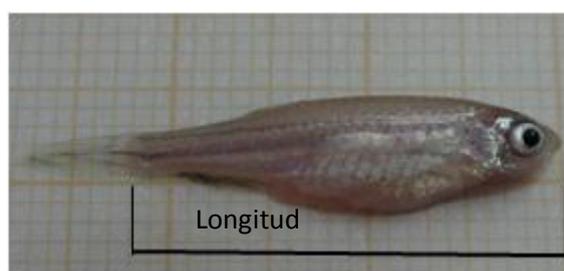
### **8.1.2- Detección de las cepas probióticas en el intestino de los peces**

La detección de los probióticos administrados se realizó analizando la actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras específicas de cada probiótico en placas con agar MRS. Para detectar la presencia de T4 se empleó *C. piscicola* 4020 como cepa indicadora, para H16 se empleó *V. alginolyticus* 03/8525 y para TW34 *L. garvieae* 03/8460.

Las diluciones seriadas de cada muestra intestinal obtenidas como se describió en la sección **8.1.1-**, a los 2, 7, 14 y 16 días del ensayo de colonización, como así también a los 90 días del ensayo de crecimiento, para cada tratamiento probiótico, se sembraron en placas de Petri con medio MRS. Luego, las placas se cultivaron por 24-48 h a 25 °C. Las placas con recuentos entre 30 y 300 colonias fueron evaluadas mediante la técnica de la doble capa descrita por Dopazo et al. (1988) y detallada en la sección **2-** con el fin de detectar la actividad antimicrobiana específica de cada probiótico en las cepas provenientes del intestino. Para el grupo control donde hubo que analizar la actividad antimicrobiana contra las tres cepas indicadoras, como medida de la actividad antimicrobiana debida a las cepas propias del intestino de los peces, se utilizó la técnica de réplica en placa con sello de terciopelo, detallada en la sección **2-**. Las réplicas se incubaron 24-48 h a 25 °C y se procedió de la misma manera que para los tratamientos. Los recuentos se expresaron como el logaritmo en base 10 de las UFC/g de intestino.

## 8.2- Parámetros medidos durante el ensayo de crecimiento

Durante el ensayo de crecimiento (sección 8.1-) los peces fueron pesados a los 0, 15, 30, 60 y 90 días usando una balanza con una precisión de 0,001 g. También, se midió su longitud (mm) desde el extremo anterior del hocico hasta la base de la aleta caudal (largo estándar) usando fotografía digital y el software de análisis de imágenes TPSdig2 v2. 12 (Ulloa et al., 2013) (Fig. 8).



**Figura 8:** Medición del largo corporal.

A partir de dichas mediciones se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento:

$$\text{Ganancia de peso corporal } (\Delta p) \text{ (mg)} = P_f - P_i$$

$$\text{Ganancia de longitud } (\Delta l) \text{ (mm)} = L_f - L_i$$

$$\text{Factor de condición } (k) = (P \times 100) / L^3$$

$$\text{Tasa de crecimiento específica (TCE)} = 100 \times [(\ln P_f - \ln P_i) / T]$$

$$\text{Factor de conversión de alimento (FCA)} = AC / (P_f - P_i)$$

Donde P es el peso del pez; L es largo del pez;  $P_f$  y  $P_i$  son los pesos promedio final e inicial, respectivamente; T, duración de la alimentación en días; AC es el peso de alimento consumido en el período.

### **8.3- Desafío de larvas de pez cebra con patógenos de peces**

Para determinar el efecto de los patógenos, *V. alginolyticus* 03/8525, *C. piscicola* 4020, *L. garvieae* 03/8460 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, en la supervivencia de las larvas de pez cebra se procedió de acuerdo a Caruffo et al. (2015). Se obtuvieron larvas de pez cebra como se encuentra detallado en el Anexo de la presente tesis. A los 5 dpf (días post fecundación), se distribuyeron 20 larvas por pocillo (en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos) en presencia de embriomedio (E3) (ver Anexo).

Los patógenos de peces se cultivaron como se detalló en la sección 2-, luego se centrifugaron (7.000 g, 15 min), se resuspendieron en E3 estéril (Anexo) y se transfirieron a cada pocillo en una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC/ml de E3, máxima concentración usada habitualmente para ensayos de desafío en larvas de pez cebra (Caruffo et al., 2015). Las larvas se expusieron por inmersión a los patógenos durante 20 h a 28 °C, luego se lavaron con E3 estéril, se colocaron en pocillos con E3 nuevo y estéril para observación por un período de una semana. Las larvas del control fueron mantenidas siempre con E3. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de supervivencia a los 7 días post infección.

### **9- Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  un error estándar, se consideraron como resultados estadísticamente significativos aquellos con un nivel de confianza igual o mayor al 95 % ( $p < 0,05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos SPSS 7.0 para Windows (Norusis, 1997).

Se realizó Test de Student

a) Para determinar diferencias significativas entre el recuento de las bacterias expuestas a pH 6,5 y pH3.

b) Para comparar la supervivencia de las cepas bacterianas almacenadas a -20 y -80 °C.

c) Para comparar los recuentos de bacterias totales, bacterias del género *Vibrio*, enterobacterias y BAL a los 14 y 16 días en el ensayo de colonización.

Previamente fue analizada la distribución normal de los datos (prueba de Shapiro-Wilks) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). De no cumplirse los supuestos del Test de Student las comparaciones se realizaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Esta prueba se aplicó para analizar la tolerancia a bilis, la adhesión a mucus y vidrio de las cepas probióticas y para ensayo de exclusión competitiva sobre mucus.

Se realizó Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor:

a) Para evaluar la supervivencia de las cepas probióticas a distintos tiempos de almacenado a -20 °C y a -80 °C.

b) Para evaluar el efecto de las cepas probióticas en los recuentos de bacterias totales, bacterias del género *Vibrio*, enterobacterias y BAL a los 2, 7, 14 y 16 días en el ensayo de colonización.

c) Para evaluar el efecto de las cepas probióticas en los recuentos de bacterias totales, bacterias del género *Vibrio*, enterobacterias y BAL a los 90 días del ensayo de crecimiento del pez cebra.

d) Para evaluar el efecto de las cepas probióticas en los parámetros de crecimiento: ganancia de peso, ganancia de largo, K y TEC a los 90 días del ensayo de evaluación de las cepas probióticas como promotoras del crecimiento del pez cebra.

En todos los casos se chequearon los supuestos del ANOVA, para lo cual previamente fue analizada la distribución normal de los datos (prueba de Shapiro-Wilks) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene). Cuando el análisis mostró significancia estadística se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey.

De no cumplirse los supuestos del ANOVA, las comparaciones se realizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Mediante esta prueba se analizaron los ensayos de bioencapsulación y los desafíos con *Artemia franciscana*, FCA y los desafíos con larvas de pez cebrá.

## **CAPÍTULO III**

# **Aislamiento y selección de bacterias con potencial probiótico de la región patagónica**

## 1- Introducción

Los primeros probióticos orientados al cultivo de organismos acuáticos fueron preparaciones comerciales diseñadas para organismos terrestres. Sin embargo, por su origen, muchas veces éstos han sido relativamente ineficaces para la acuicultura debido a que no son capaces de sobrevivir y/o permanecer viables en la concentración óptima en el intestino de los animales acuáticos (Gatesoupe, 1999; Nayak, 2010). Por el contrario, cuando los probióticos provienen de los propios animales o del ambiente acuático que los rodea pueden ser más eficaces, ya que poseen mayor probabilidad de competir con los microorganismos residentes en el tracto intestinal de los organismos acuáticos, de llegar a ser predominantes dentro de un período corto de ingesta y de persistir durante algún tiempo después de la supresión de su administración (Carnevali et al., 2004; Nayak, 2010). Además, ofrecen varias ventajas, especialmente en algunas cuestiones biotecnológicas como son la temperatura, salinidad y la adaptación al medio ambiente (Zorriehzahra et al., 2016).

Uno de los criterios más utilizados para la selección de microorganismos probióticos es su capacidad de producir sustancias antimicrobianas, la cual puede ser evaluada *in vitro* exponiendo a los candidatos probióticos a patógenos (Sotomayor y Balcázar, 2003; Vine et al., 2004; Balcázar et al., 2006; Sha et al., 2016). Otra de las características indispensables que debe poseer un probiótico es no sólo no ser patogénico con respecto a la especie huésped sino también con respecto a los animales acuáticos en general y los seres humanos, consumidores de los productos acuícolas (Merrifield et al., 2010a). Por eso, uno de los primeros pasos en la selección de un microorganismo probiótico es evaluar su inocuidad analizando la producción de hemolisinas y la resistencia antibiótica de las cepas seleccionadas.

El objetivo del presente capítulo fue aislar y seleccionar bacterias, provenientes del tracto intestinal de organismos acuáticos de la región patagónica, por sus características probióticas mediante ensayos *in vitro* que

contemplaron el estudio de la actividad antimicrobiana frente a patógenos y la seguridad microbiológica de las cepas.

**Hipótesis:** Las bacterias aisladas de los organismos acuáticos de la región patagónica presentan actividad antimicrobiana contra patógenos de usual ocurrencia en acuicultura.

## **2- Resultados y discusión**

### **2.1- Aislamiento y selección de bacterias con potencial probiótico**

Se aislaron 149 cepas bacterianas a partir de diferentes organismos de agua dulce y de mar de la región patagónica. La Tabla 4 presenta el origen, el medio de cultivo y la actividad antimicrobiana contra patógenos de cada uno de esos aislamientos. También, se incorporó a este estudio la cepa H16 correspondiente a la colección bacteriana del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología (IPEEC-CONICET), aislada previamente del tracto intestinal de merluza (*Merluccius hubbsi*) (Olivera et al., 2012).

En una primera etapa, se preseleccionaron los aislamientos con actividad antimicrobiana utilizando la técnica de la doble capa con patógenos como indicadores. Así se obtuvieron 58 aislamientos con diferente intensidad de inhibición contra alguno de los 4 patógenos testeados (Tabla 4). El 25,5 % de los aislamientos inhibió a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, el 26,8 % a *L. garvieae* 03/8460, el 14,1 % a *Y. ruckeri* ATCC 29473 y el 29,5 % a *C. piscicola* 4020.

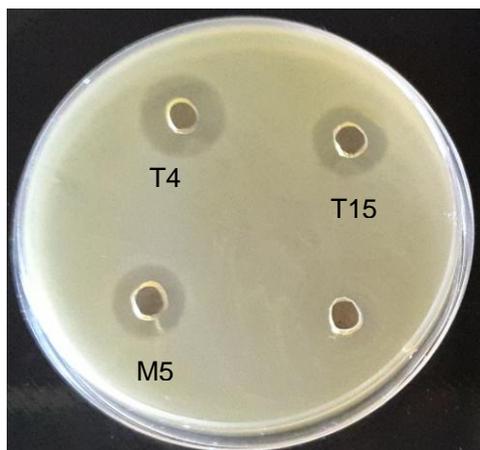
Procedencia	Fecha	Origen	Medio	Aislamiento	<i>A. salmonicida</i>		<i>L. garvieae</i>		<i>Y. ruckeri</i>		<i>C. piscicola</i>	
					subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	DC	DA	03/8460	DC	DA	ATCC 29473	DC
Río Santa Cruz- Estancia San Ramón Latitud: -50.19159 Longitud: -69.89556	2010-mayo	Trucha arcoíris	TS	T1 a T3	-	-	-	-	-	-	-	-
			TS	T4	-	-	-	-	-	+	+	
			TS	T5 a T8	-	-	-	-	-	-	-	-
			MRS	M1 y M2	-	-	-	-	-	-	-	-
Río Santa Cruz -cuenca alta Latitud:-50.2244 Longitud: -71.5291	2010-junio	Trucha marrón	TS	T9 a T14	-	-	-	-	-	-	-	
Río Santa Cruz- Estancia San Ramón Latitud: -50.19159 Longitud: -69.89556	2010 septiembre	Trucha arcoíris	TS	T15	-	+	-	-	-	+	+	
				T16	-	+	-	-	-	+	-	
				T17 y T18	-	-	-	-	-	-	-	
				T19 y T20	-	+	-	-	-	+	-	
				T21 a T23	-	-	-	-	-	-	-	
		TS	T24 a T27	-	+	-	-	-	+	-		
		Trucha arcoíris	MRS	T28	-	-	-	-	-	-	-	
				M3	-	+	-	-	-	-	-	
				M4	-	-	-	-	-	-	-	
				M5	-	-	-	-	-	+	+	
				M6	-	-	-	-	-	-	-	
				M7	-	+	-	-	-	+	-	
				M8	-	-	-	-	-	-	-	
				M9	-	-	-	-	-	+	-	
M10	-			-	-	-	-	-	-			
M11 a M14	-	+	-	-	-	+	-					

Puerto Lobos Latitud : -42 Longitud : -65.1	2012 marzo	Mero	TS	T29	-	-	-	-	+	-		
				T30	-	+	-	-	+	-		
			MRS	M15	+	-	+	-	+	-	+	-
		M23 a M28		+	-	+	-	+	-	+	-	
		Turco	TS	T32, T33 y T37	+	-	+	-	-	-	+	-
				MRS	M16 a M22	+	-	+	-	+	-	+
Centro de Salmonicultura Bariloche	2013-julio	Trucha arcoíris	TS	TI a TXIV	-	-	-	-	-	-		
				MRS	ME1	+	-	+	-	+	-	+
			ME3, ME18 y ME28		-	-	-	-	-	-	-	-
			ME4		-	-	-	-	-	-	-	-
			ME14		+	-	+	-	-	-	-	-
			Punta Este Latitud: -42.7833 Longitud: -64.95	2013-julio	Escrófalo	TS	ET1 a ET13	-	-	-	-	-
ET14	-	-					-	-	-	+	-	
ET15	-	-					-	-	-	-	-	
ET16	+	-					-	-	-	-	-	
ET17 y ET18	-	-					-	-	-	-	-	
ET19	+	-					-	-	-	-	-	
ET20 a ET25	-	-					-	-	-	-	-	
ET26 y ET27	+	-					-	-	-	-	-	
ET28	-	-				-	-	-	-	-		
MRS	EM4 a EM11	-				-	-	-	-	-	-	
	EM12 a EM17	+	-	+	-	+	-	+	-			
Cerro Avanzado Latitud: -42.8333 Longitud: -64.8833	2013-julio	Pulpo	TS	PT1 a PT14	-	-	-	-	-			
				PM1, PM3 y PM4	-	-	-	-	-			
			MRS	PM2	+	-	-	-	-	-	+	-
				PM19 a PM26	+	-	-	-	-	-	-	

**Tabla 4:** Origen y análisis cualitativo de la actividad antimicrobiana de los aislamientos obtenidos a partir de organismos de agua dulce y de mar de la región patagónica. Trucha arcoíris (*O. mykiss*), trucha marrón (*S. trutta*), mero (*A. patachonicus*) turco (*P. brasiliensis*), escrófalo (*S. oculatus*) y pulpo (*E. megalocyathus*). DC= doble capa, DA= difusión en agar. TS= Tripticasa Soja, MRS=De Man Rogosa and Sharpe.

La actividad antimicrobiana extracelular, presente en los sobrenadantes libres de células, de los 58 aislamientos preseleccionados fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar (Tabla 4). Solo las cepas T4, T15 y M5 presentaron actividad antimicrobiana extracelular y las tres lo hicieron contra el patógeno *C. piscicola* 4020 (Fig. 9). Con el fin de ampliar el estudio del espectro antimicrobiano extracelular de estas cepas, también fueron evaluados los siguientes patógenos: *L. piscium* 23.3.92, *S. iniae* 2378, *V. anguillarum* 1603, *V. alginolyticus* 03/8525, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. harveyi* ATCC 14126. Los aislamientos T4, T15 y M5 no presentaron actividad contra ninguno de ellos.

Estas tres cepas con actividad antimicrobiana extracelular (T4, T15 y M5) representaron el 2 % del total de los aislamientos. En coincidencia con otros estudios, la ocurrencia de aislamientos bacterianos con actividad antimicrobiana extracelular contra patógenos de usual frecuencia en acuicultura fue baja (Hjelm et al., 2004a y b; Ravi et al., 2007; Thankappan et al., 2015). Lin et al. (2013) observaron que de un total de 194 aislamientos solamente 4 presentaron actividad antimicrobiana extracelular frente al menos a una cepa indicadora, lo cual representó un 2 % del total. Un porcentaje similar obtuvieron Vine et al. (2004) al analizar la actividad antimicrobiana extracelular de aproximadamente 3.700 aislamientos obtenidos del intestino del pez payaso, contra los patógenos *V. alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*. También se han encontrado bajos porcentajes (4,4 %) de aislamientos bacterianos con actividad inhibitoria extracelular contra el patógeno *V. anguillarum* en el intestino de trucha arcoíris (Spanggaard et al., 2001).



**Figura 9:** Ensayo de difusión en agar del sobrenadante libre de células de T4, T15 y M5 contra *C. piscicola* 4020.

Las cepas T4, T15 y M5 correspondieron a bacilos Gram positivos, catalasa negativos. Las tres se afiliaron al género *Carnobacterium* con un 99,93 % de homología, en la secuencia casi completa del gen que codifica ARNr 16S, con *Carnobacterium maltaromaticum* DSM 20345(T). A su vez, el porcentaje de homología entre las secuencias de ARNr 16S de T4, T15 y M5 fue del 100%. *Carnobacteriaceae* es probablemente la familia más común en el TGI de peces (Gatesoupe et al., 2008). El género *Carnobacterium* es parte de la microbiota intestinal de distintos peces como por ejemplo la trucha arcoíris (Starliper et al., 1992; Huber et al., 2004), la trucha marrón (González et al., 2000) y el salmón del atlántico (Jöborn et al., 1999), siendo *C. maltaromaticum* predominante en salmónidos (Balcázar et al., 2007c). Existen antecedentes que demuestran que cepas de *Carnobacterium* tienen la capacidad de inhibir patógenos *in vitro* y proteger a la trucha arcoíris en desafíos *in vivo* (Irianto y Austin, 2003; Kim y Austin, 2006) y, por otro lado, que sobrenadantes libres de células de cepas pertenecientes al género *Carnobacterium*, también, producen inhibición del crecimiento de la cepa patógena *C. piscicola* CCUG34645 (Ringø, 2008). Esta inhibición no es inusual ya que algunas bacteriocinas producidas por BAL inhiben especies estrechamente relacionadas (Tagg et al., 1976).

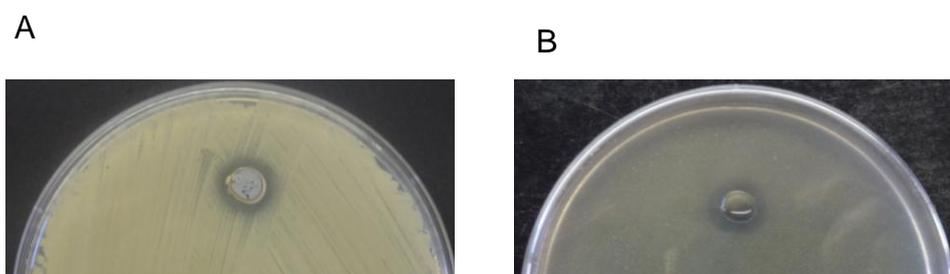
La estrecha relación filogenética entre las cepas T4, T15 y M5 y la especie *C. maltaromaticum* también podría ser positiva en cuanto a la seguridad de su aplicación en acuicultura. Varias cepas de la especie *C. maltaromaticum* tales como CB1, CB2, CB3, LV17, UAL26, ATCC 35586 y

ATCC43225 han sido reconocidas como bacterias GRAS (por sus siglas en inglés, generalmente reconocidas como seguras) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, 2005). Además, en el año 2012, tres especies del género *Carnobacterium* (entre ellas *C. maltaromaticum*) fueron incorporadas a la lista autorizada de microorganismos con uso documentado en alimentos (Bourdichon et al., 2012), originalmente publicada en el año 2002 como resultado de un proyecto conjunto entre la Federación Internacional de Lechería (IDF) y la Asociación Europea de Alimentos y Cultivos Alimentarios (EFFCA) (Mogensen et al., 2002).

Otra de las cepas con actividad antimicrobiana fue H16, un bacilo Gram positivo catalasa negativo, que presentó 100 % de homología en la secuencia casi completa del gen que codifica ARNr 16S con *Lactobacillus pentosus* JCM 1558(T). Las especies miembros del género *Lactobacillus* son generalmente reconocidas como seguras (GRAS-status) ya que tienen una larga historia de uso en alimentos fermentados (Korhonen, 2010). El género *Lactobacillus* incluye 82 especies en la lista autorizada de microorganismos con beneficios tecnológicos entre los que se encuentra *L. pentosus* (Bourdichon et al., 2012). Numerosos estudios han aislado *L. pentosus* de varios nichos ambientales como lácteos, vegetales, carnes, así como también del TGI y urogenital de humanos y animales terrestres (Liu et al., 2008; Jensen et al., 2012; Lee et al., 2012; Anukam et al., 2013). Sin embargo, los estudios sobre cepas salvajes de *L. pentosus* procedentes de fuentes marinas son escasos (Lee et al., 2010). En acuicultura la mayoría de los estudios que han probado cepas del género *Lactobacillus* como probióticos han utilizado cepas no marinas. No obstante, las cepas marinas pueden presentar la ventaja de estar adaptadas a la salinidad y competir con cepas patógenas en la piscicultura eurihalina y la maricultura.

El sobrenadante libre de células de *L. pentosus* H16 inhibió el crecimiento de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 (Fig. 10A). Solamente existe un registro de 3 cepas de *L. pentosus* con actividad inhibitoria sobre dicho patógeno, las cuales fueron aisladas de sedimentos del estuario de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires (Sica et. al, 2010). Al ampliar el

espectro antimicrobiano con otros patógenos de organismos acuáticos como *L. piscium* 23.3.92, *S. iniae* 2378, *V. anguillarum* 1603, *V. alginolyticus* 03/8525, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *V. harveyi* ATCC 14126, se observó que *L. pentosus* H16 logró inhibir a *V. alginolyticus* (Fig. 10B). La procedencia de H16, intestino de merluza, puede resultar ventajosa para la utilización como probiótico para acuicultura por su adaptación al tracto intestinal del pez. Además, su actividad inhibitoria sobre *V. alginolyticus* es otra propiedad interesante dado que las enfermedades causadas por *Vibrio* spp. están comúnmente relacionadas con episodios de mortalidad de animales marinos cultivados (Toranzo et al., 2005; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Grzeńkowiak et al., 2012).

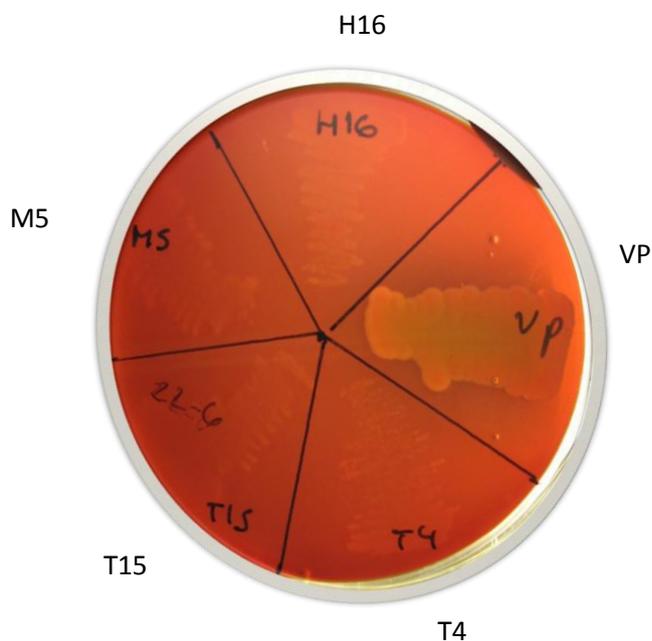


**Figura 10:** Ensayo de difusión en agar del sobrenadante libre de células de *L. pentosus* H16 contra A) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 y B) *V. alginolyticus* 03/8525.

## 2.2- Capacidad hemolítica y susceptibilidad a los antibióticos

Las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *Carnobacterium* sp. T15, *Carnobacterium* sp. M5 y *L. pentosus* H16 no produjeron halo de lisis de células sanguíneas en placas de agar sangre (Fig. 11). Evaluar la capacidad hemolítica es muy importante en el proceso de selección de probióticos ya que la hemolisina es un factor de virulencia muy común entre patógenos que frecuentemente causan anemia y edema en el huésped y, por lo tanto, las

cepas hemolíticas deberían ser descartadas como posibles probióticos (Ouwehand et al., 2005; Nandi et al., 2017).



**Figura 11:** Prueba de hemólisis en agar sangre de las cepas T4, T15, M5 y H16. Como control positivo se utilizó la cepa *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (VP).

Las cepas *Carnobacterium* sp. T4 y T15 fueron sensibles a 9 de los 12 antibióticos evaluados, siendo solamente resistentes a oxacilina, clindamicina y gentamicina (Tabla 5). La cepa *Carnobacterium* sp. M5 fue sensible a 10 de los antibióticos, mostrando sensibilidad intermedia a oxacilina y resistencia a gentamicina (Tabla 5). La baja resistencia antibiótica de las cepas T4, T15 y M5 podría deberse al origen de las mismas, ambientes naturales y con baja intervención humana. Por el contrario, *C. maltaromaticum* B26 y *Carnobacterium divergens* B33 aisladas de trucha arcoíris provenientes de una piscicultura presentaron sensibilidad a solamente 4 de los 14 antibióticos evaluados (Kim y Austin, 2008). La multiresistencia antibiótica en las pisciculturas está relacionada con el excesivo uso de antibióticos (Cabello et al., 2013).

*L. pentosus* H16 fue resistente a teicoplanina, penicilina, oxaciclina, vancomicina y levofloxacina (Tabla 5). Los lactobacilos parecen ser intrínsecamente resistentes a vancomicina (EFSA, 2008; Jose et al., 2015) y a las quinolonas, como la levofloxacina (Hummel et al., 2007; Egervärn, 2009). Un estudio que evaluó la susceptibilidad a los antibióticos de 59 cepas de *L. pentosus* mostró que un alto porcentaje presentó resistencia a 7 de los 15 antibióticos testados, tales resistencias resultaron de un mecanismo intrínseco, no transferible o no adquirido (Casado Muñoz et al., 2014). La mayoría de los genes de resistencia a los antibióticos de los lactobacilos son intrínsecos e inherentes, lo que significa que no son transferibles a través de la transferencia genética horizontal (Seale y Millar, 2013) y no representarían una amenaza para la seguridad alimentaria ni para el consumidor (Jose et al., 2015).

Antibiótico	Susceptibilidad a los antibióticos			
	T4	T15	M5	H16
Penicilina 10 U	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
Oxacilina 1 µg	Resistente	Resistente	Intermedio	Resistente
Eritromicina 15 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Clindamicina 2 µg	Resistente	Resistente	Sensible	Sensible
Trimetropina 1,25 µg- sulfometoxazol 23,75 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Vancomicina 30 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
Levofloxacina 5 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente
Gentamicina 10 µg	Resistente	Resistente	Resistente	Sensible
Rifampicina 5 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Minociclina 30µg	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Cloranfenicol 30 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Teicoplanina 30 µg	Sensible	Sensible	Sensible	Resistente

**Tabla 5:** Susceptibilidad a los antibióticos de las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *Carnobacterium* sp. T15, *Carnobacterium* sp. M5 y *L. pentosus* H16.

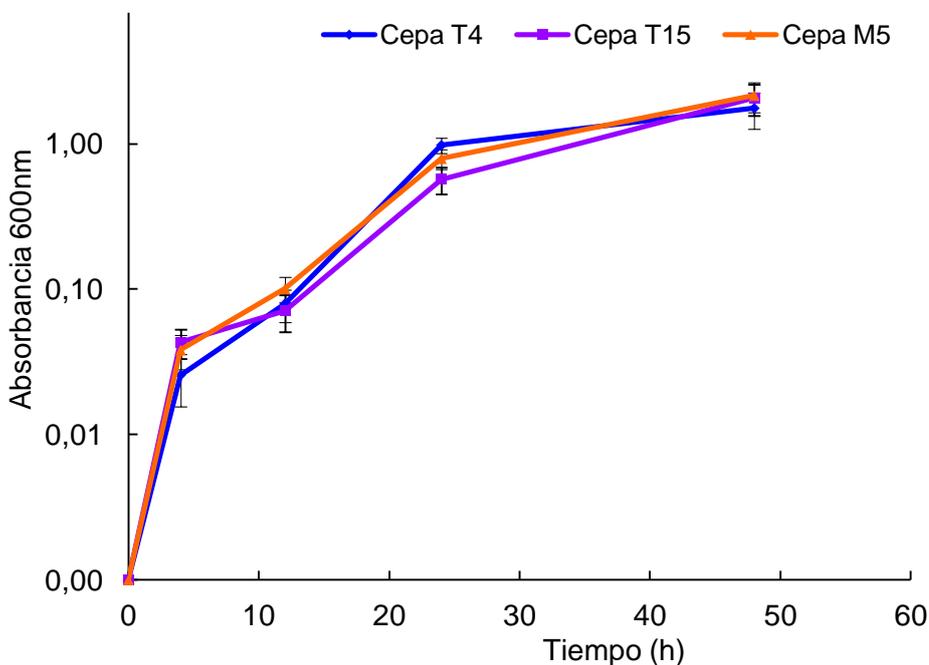
Según la patente *Lactic Acid Bacteria for the Treatment of Food* (Stiles et al., 2007) los principales antibióticos que comúnmente se asocian con elementos genéticos transferibles en bacterias comensales Gram positivas son eritromicina, cloranfenicol y tetraciclina. Las 4 cepas preseleccionadas (T4, T15, M5 y H16) fueron sensibles a los dos primeros y a monociclina, que pertenece al grupo de las tetraciclinas. Si bien actualmente, en las pisciculturas se ha comenzado a restringir el uso de antibióticos para evitar y/o detener brotes infecciosos, éstos han sido a lo largo del tiempo incorrectamente utilizados ocasionando graves problemas de resistencia bacteriana (Romero et al., 2012; Cabello et al., 2013). Por este motivo es recomendable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos utilizados en las pisciculturas, de esta manera se evita el riesgo de transferir genes de resistencia a bacterias patógenas o potencialmente patógenas. En este sentido, las cepas preseleccionadas fueron sensibles a trimetoprima/sulfametoxazol uno de los pocos antibióticos permitidos en acuicultura en países como Canadá y Estados Unidos en los cuales el uso de antibióticos es muy restringido (Cabello et al., 2013).

## **2.3- Producción y caracterización del agente causante de la actividad antimicrobiana**

### **2.3.1- *Carnobacterium* sp. T4, T15 y M5**

Si bien *Carnobacterium* sp. T4, T15 y M5 han sido cultivadas bajo las mismas condiciones y con la misma concentración de inóculo inicial (Fig. 12), T4 fue la primera en producir el agente antimicrobiano, detectándose a las 4 h de incubación, seguido por T15 a las 12 h y luego *Carnobacterium* sp. M5 a las 24 h de incubación (Tabla 6). Luego de 24 h de incubación los títulos de la actividad antimicrobiana fueron de 40.960; 5.110 y 40 UA ml<sup>-1</sup> para T4, T15 y

M5, respectivamente (Tabla 6). La cepa T4 fue la que presentó el mayor título de actividad antimicrobiana (327.680 UA/ml) luego de 48 h de incubación.



**Figura 12:** Curva de crecimiento de las cepas T4, T15 y M5 en medio líquido MRS a 25 °C.

Cepa	Actividad antimicrobiana (UA/ml) a distintos tiempos (h)				
	0	4	12	24	48
T4	0	40	320	40960	327680
T15	0	0	80	5120	40960
M5	0	0	0	40	160

**Tabla 6:** Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células de las cepas T4, T15 y M5 a distintos tiempos de cultivo en MRS a 25 °C.

La actividad antimicrobiana producida por T4, T15 y M5 no se debió a la producción de ácidos orgánicos ni a proteínas de alto peso molecular debido a que los diámetros de los halos de inhibición, contra el patógeno indicador *C.*

*piscicola* 4020, se mantuvieron constantes después de neutralizar (pH 6,5) y calentar (100 °C por 5 minutos) sus sobrenadantes (Tabla 7). Además, dichos sobrenadantes mantuvieron su actividad antimicrobiana luego del tratamiento con catalasa indicando que la inhibición que producen no es debida a la producción de peróxido de hidrógeno.

Cepa	Sobrenadante	Halo (mm)
T4	Extracto crudo	20,5
	Neutralizado	20,5
	Calentado a 100°C 5'	20,5
T15	Extracto crudo	18,5
	Neutralizado	18,5
	Calentado a 100°C 5'	18,5
M5	Extracto crudo	19,5
	Neutralizado	19,5
	Calentado a 100°C 5'	19,5

**Tabla 7:** Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de cultivos provenientes de las 3 cepas preseleccionadas.

Estos resultados sugirieron que la actividad antimicrobiana presentada por dichas cepas podría deberse a la producción de péptidos antimicrobianos. La actividad antimicrobiana producida por T4, T15 y M5 fue completamente inhibida por tripsina confirmando que el agente causante de la actividad antimicrobiana, en los tres casos, podría ser un péptido antimicrobiano o bacteriocina.

Con el fin de identificar péptidos antimicrobianos en los sobrenadantes de las cepas, éstos fueron analizados mediante LC-MS/MS. En el sobrenadante de la cepa T4 se identificaron 4 péptidos con un nivel de confianza alto, pertenecientes a bacteriocinas de Clase IIa (Tabla 8). Los 4 péptidos identificados abarcaron casi la totalidad de la secuencia de la bacteriocina divercin V41 (Metivier et al., 1998), (Fig. 13). Uno de los 4 péptidos identificados, que contiene la secuencia consenso YGNGVXC típica de la

porción N-terminal de las bacteriocinas de Clase IIa, es compartido por otras 2 bacteriocinas como divergicin M35 (Tahiri et al., 2004) y bavaricin-MN (Kaiser y Montville, 1996) (Tabla 8, Fig. 13). A partir del sobrenadante de la cepa T15 se identificaron 2 péptidos con alta confianza, también pertenecientes a bacteriocinas de Clase IIa, ambos compartidos entre las bacteriocinas divercin V41, divergicin M35 y bavaricin-MN (Tabla 8 y Fig. 13). Ningún péptido fue identificado para la muestra perteneciente a la cepa M5.

Cepa	Descripción	Código de acceso	Organismo	Nº de péptidos	Péptidos identificados por LC-MS/MS
<b>T4</b>	Divercin V41	Q9Z4J1	<i>C. divergens</i>	4	KCWVDWGQASGCIGQTVVGGWLGGAI PGKC CWVDWGQASGCIGQTVVGGWLGGAI PGKC CWVDWGQASGCIGQTVVGGWLGGAI PGK <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>
	Divergicin M35	P84962	<i>C. divergens</i>	1	<b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>
	Bavaricin-MN	P80493	<i>L. sakei</i>	1	<b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>
<b>T15</b>	Divercin V41	Q9Z4J1	<i>C. divergens</i>	2	TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b> TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>
	Bavaricin-MN	P80493	<i>L. sakei</i>	2	TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b> TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>
	Divergicin M35	P84962	<i>C. divergens</i>	2	TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b> TKY <b>YGN<span style="background-color: yellow;">GVYCNSK</span></b>

**Tabla 8:** Péptidos identificados por LC-MS/MS para las cepas T4 y T15. En negrita se resalta la secuencia consenso YGNGVYCNSK típica de las bacteriocinas de Clase IIa. C.: *Carnobacterium*; L.: *Lactobacillus*.

Divercin V41      TK**YGNGVYCNSK**KCWVDWGQASGCIGQTVVGGWLGGAI PGKC  
 Bavaricin-MN    TK**YGNGVYCNSK**KCWVDWGQAAGGIGQTVVXGWLGGAI PGK-  
 Divergicin M35   TK**YGNGVYCNSK**KCWVDWGTAAQGCID--VVIGQLGGGI PGKGGK

**Figura 13:** Secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas maduras divercin V41, bavaricin-MN y divergicin M35. Los péptidos identificados por LC-MS/MS para la cepa T4 se muestran resaltados en amarillo y verde. Los péptidos identificados para la cepa T15 se muestran subrayados. Los aminoácidos resaltados en gris señalan aquellos diferentes, que presentan bavaricin-MN y divergicin M35, respecto a divercin V41.

Las bacteriocinas divercin V41 (Metivier et al., 1998) y divergicin M35 (Tahiri et al., 2004) son producidas por la especie *C. divergens* y la bacteriocina bavaricin-MN es producida por *Lactobacillus sakei* (Kaiser y Montville, 1996). Ninguno de los péptidos encontrados en el sobrenadante de las cepas T4 y T15 han sido descritos hasta el momento en la especie más relacionada filogenéticamente con ellas que fue *C. maltaromaticum*.

Se ha observado que varias cepas de BAL de diferente origen, género y especie pueden producir la misma bacteriocina de Clase IIa (Ennahar et al., 2000). Por ejemplo, la bacteriocina Leucocin A/B producida por la cepa *Leuconostoc gelidum* UAL187, aislada en Canadá de carne envasada al vacío (Hastings y Stiles, 1991), es igual en su secuencia a la bacteriocina producida por *Leuconostoc carnosum* Ta11a aislada de carne procesada y envasada al vacío en Sudáfrica (Felix et al., 1994). Otro ejemplo es la bacteriocina Pediocin PA-1 producida por *Pediococcus parvulus* ATO34/ATO77 aislada de achicoria (Bennik et al., 1994), la cual presenta la misma secuencia aminoacídica que Pediocin AcH producida por *Pediococcus acidilactici* H (Bhunja et al., 1987) y por *Lactobacillus plantarum* WHE 92 (Ennahar et al., 1996), dos cepas de diferente género aisladas de dos tipos de alimento, un embutido y un queso respectivamente. Estas observaciones sugieren que la producción de bacteriocinas de Clase IIa, limitadas a BAL, parece ser un rasgo bastante móvil y ninguna estructura primaria de Clase IIa sería distintiva de un género o especie de BAL en particular (Ennahar et al., 2000).

Respecto al modo de acción, se estima que las bacteriocinas de Clase IIa actúan principalmente mediante la permeabilización de las membranas de microorganismos susceptibles, probablemente mediante dos pasos (Drider et al., 2006). En el primer paso, la bacteriocina parece interactuar con la membrana y/o alguna molécula receptora, cuya unión puede estar influenciada por la composición y la carga de la membrana, así como por la presencia y disponibilidad de esta molécula diana que actuaría de receptor (Drider et al., 2006). En el segundo paso, la bacteriocina permeabiliza la membrana a través de la formación de poros, este paso probablemente dependa de la composición de la membrana, de la porción C-terminal de la bacteriocina que está involucrada en la permeabilización de la membrana y de la presencia de

proteínas inmunitarias (Drider et al., 2006). La formación de poros causa la disipación de la fuerza protomotriz provocando un desequilibrio iónico, la fuga de fosfato inorgánico (Ennahar et al., 2000) y la reducción del ATP intracelular (Drider et al., 2006).

### **2.3.2- *Lactobacillus pentosus* H16**

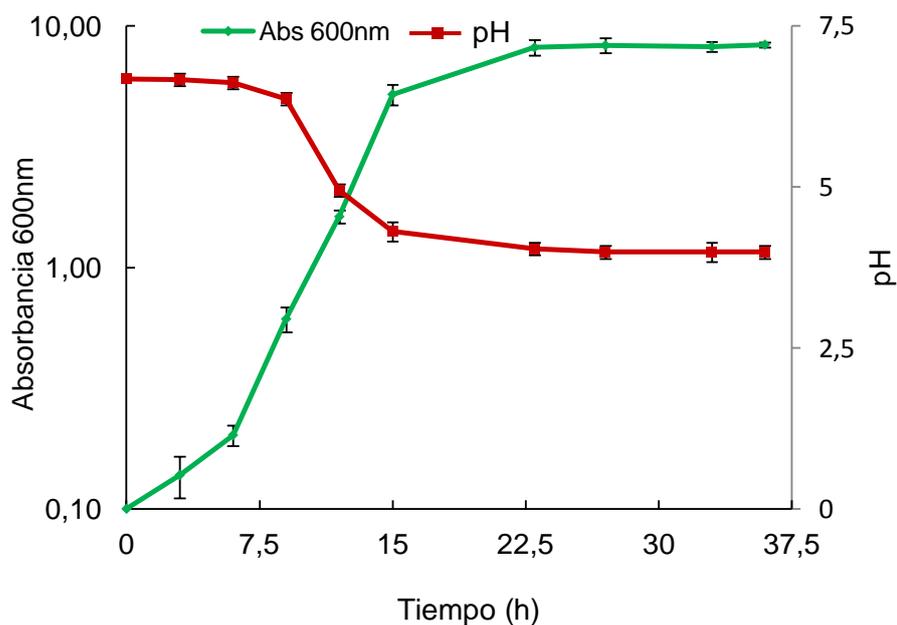
Luego de la neutralización, el sobrenadante de *L. pentosus* H16 perdió su actividad antimicrobiana (Tabla 9), sugiriendo que el principio activo estaría relacionado con la producción de ácidos orgánicos característicos del metabolismo de las BAL. La cepa H16 pertenece al género *Lactobacillus* el cual es estrictamente fermentativo, productor de grandes cantidades de ácido láctico y pequeñas cantidades de otros ácidos orgánicos como resultado del metabolismo de carbohidratos (Hammes y Hertel, 2006). La producción de ácido reduce el pH del medio y suprime el crecimiento de muchas otras bacterias (Hammes y Hertel, 2006). *Lactobacillus pentosus* K34, aislado del intestino delgado de pollo, mostró una fuerte actividad antimicrobiana, frente a las bacterias patógenas gastrointestinales, atribuida a la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, ácido oleico, ácido succínico, ácido pirúvico y ácido fenilacético (Lee et al., 2012). Coincidentemente, los ácidos láctico y acético fueron los responsables del efecto antimicrobiano, de varias BAL aisladas de la leche y el queso, sobre bacterias patógenas de peces (Vázquez et al., 2005). Los ácidos orgánicos débiles no disociados pueden atravesar las membranas y disociarse dentro de la célula, causando acidificación intracelular y promoviendo la expulsión de los iones  $H^+$  de la célula y el desacoplamiento de la bomba  $Na^+-K^+$  (ATPasa) (Huang et al., 1986; Vázquez et al., 2005). Este modo de acción es dependiente del pH porque las formas no disociadas son frecuentes cuando el valor de pH está por debajo del pKa del ácido orgánico (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Arena et al., 2016). Además, se ha demostrado que el ácido láctico también funciona como un permeabilizante de la membrana externa de las especies Gram negativas ya que actúa como un agente desintegrador de la misma causando la liberación

de lipopolisacáridos y potenciando los efectos de otras sustancias antimicrobianas (Alakomi et al., 2000).

Cepa	Sobrenadante	Halo (mm)
H16	Extracto crudo	11,5
	Neutralizado	-

**Tabla 9:** Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células del cultivo proveniente de la cepa H16.

Con respecto a la producción del agente antimicrobiano por la cepa H16, se observó que cuando comienza la fase de crecimiento exponencial también empieza a disminuir el pH, registrándose un valor mínimo de 3,99 en la fase estacionaria (Fig. 14). Coincidentemente, la actividad antimicrobiana contra los patógenos *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 y *V. alginolyticus* 03/8525 comienza a detectarse a las 12 h de incubación (fase de crecimiento exponencial) y se mantiene durante la fase estacionaria con halos de inhibición de 11 y 14 mm, respectivamente (Tabla 10). La actividad antimicrobiana de H16 no pudo ser cuantificada por el método de las diluciones seriadas debido a que en la primera dilución ya no se detectó actividad antimicrobiana.



**Figura 14:** Curva de crecimiento bacteriano y cambios de pH en el sobrenadante de *L. pentosus* H16 cultivado en medio líquido MRS a 25 °C.

Tiempo (h)	Halo en mm	
	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	<i>V. alginolyticus</i> 03/8525
0	0	0
3	0	0
9	0	0
12	10	11
27	11	14
36	11	14

**Tabla 10:** Actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células proveniente del cultivo de la cepa H16 en MRS a 25 °C a distintos tiempos de cultivo.

### 3- Conclusión

Algunos organismos acuáticos de la región patagónica presentaron bacterias con actividad antimicrobiana contra patógenos de usual ocurrencia en acuicultura. Estas bacterias ejercieron su acción inhibitoria mediante la producción de diferentes agentes antimicrobianos. Las cepas *Carnobacterium* sp. T4, T15 y M5 produjeron bacteriocinas y la cepa *L. pentosus* H16 produjo ácidos orgánicos. Se preseleccionaron estas cuatro cepas debido a que estos agentes antimicrobianos podrían ejercer su acción inhibitoria dentro del intestino y ayudar a colonizar el tracto gastrointestinal de peces y de otros organismos acuáticos, y proteger al huésped ante la presencia de patógenos oportunistas de relevancia en acuicultura.

Debido a que T4, T15 y M5 pertenecieron al mismo género y presentaron actividad antimicrobiana contra el mismo patógeno se decidió elegir sólo una de ellas para la siguiente etapa. Dado las características relacionadas a la producción temprana del agente antimicrobiano y su mayor título de inhibición, la cepa T4 fue la elegida entre los *Carnobacterium* para proseguir con el estudio de otras propiedades probióticas para evaluar su utilización en acuicultura.

La cepa *L. pentosus* H16 también fue seleccionada para continuar la evaluación de sus propiedades probióticas ya que presenta actividad antimicrobiana extracelular contra dos patógenos de peces Gram negativos, *A. salmonicida* y *V. alginolyticus*.

## **CAPÍTULO IV**

### **Evaluación de las propiedades probióticas de *Carnobacterium* sp. T4, *Lactobacillus pentosus* H16 y *Lactococcus lactis* TW34**

## 1- Introducción

Los microorganismos con potencial probiótico deberían satisfacer una serie de requisitos para poder ser utilizados como tales. Uno de ellos es que presenten la capacidad de ser resistentes a las condiciones adversas del TGI del hospedador para poder alcanzar el intestino en forma viable y colonizarlo, al menos en forma transitoria (Tuomola et al., 2001). Para muchas bacterias la bilis es tóxica ya que puede desnaturalizar proteínas y dañar el ADN, actuar como detergente provocando cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y afectar la homeostasis bacteriana, siendo letal para muchos microorganismos (Suárez, 2013). Algo similar sucede con el pH ácido presente en el TGI, el cual podría afectar la viabilidad de las cepas probióticas. Si bien en Argentina no existen pautas nacionales específicas sobre la evaluación de los probióticos destinados a la acuicultura, hay recomendaciones internacionales (Organización Mundial de la Salud, FAO/WHO 2002) y nacionales (CAA, 2011) para la evaluación de probióticos en los alimentos. Dentro del protocolo de evaluación *in vitro*, el CAA (Capítulo XVII, Alimentos de régimen o dietéticos, artículo 1.389) establece la evaluación de la capacidad del probiótico para sobrevivir a las condiciones gástricas y a la bilis. Estas pruebas permitirán conocer si las cepas tienen posibilidades de resistir el tránsito gastrointestinal para luego colonizar el intestino (Nikoskelainen et al., 2001b; Irianto y Austin, 2002; Balcázar et al., 2008).

La capacidad de adhesión de los microorganismos probióticos a las capas de mucus que recubren los epitelios de los peces, las cuales contribuyen a proteger la superficie de la piel, las branquias y el TGI también es considerado otro requisito favorable previo a la colonización (Collado et al., 2007; Grześkowiak et al., 2012; Jensen et al., 2012). Cuando las bacterias probióticas presentan la capacidad de adherirse a superficies mucosas, éstas pueden competir con patógenos por los sitios de adhesión evitando la etapa inicial de una infección bacteriana (Balcázar et al., 2006; Vine et al., 2006).

En la evaluación de las propiedades probióticas, también es valioso utilizar organismos modelo que permitan analizar los mecanismos de acción de las cepas probióticas, especialmente cuando se encuentran en presencia del patógeno. Para estudiar la interacción probiótico-patógeno en acuicultura frecuentemente se recurre al crustáceo *Artemia*. Este modelo invertebrado es fácil de cultivar y obtenerlo en condiciones gnotobióticas para desarrollar ensayos experimentales. Además, este mini crustáceo es muy utilizado como alimento vivo de larvas de peces y otros crustáceos (Verschuere et al., 2000b, Gunasekara et al., 2011).

En el capítulo anterior se seleccionaron 2 cepas que cumplieron con los requerimientos de seguridad y con la capacidad de producir actividad antimicrobiana extracelular. Una de ellas fue *Carnobacterium* sp. T4, aislada de trucha arcoíris y productora de una bacteriocina con actividad antimicrobiana contra el patógeno *C. piscicola*, y la otra, *L. pentosus* H16 aislada de merluza y productora de ácidos orgánicos capaz de inhibir el crecimiento de *A. salmonicida* y *V. alginolyticus*. En el presente capítulo se incorporó a la cepa *L. lactis* TW34 para, también, evaluar sus propiedades probióticas ya que presenta actividad antimicrobiana contra un patógeno diferente a las dos anteriores. TW34 fue previamente aislada del intestino de pejerrey (*Odontesthes platensis*) y es productora de la bacteriocina nisina Z que posee potente actividad inhibitoria contra el patógeno *L. garvieae*, baja resistencia a antibióticos y no es hemolítica (Sequeiros et al., 2010).

Los objetivos de este capítulo fueron analizar las propiedades probióticas de T4, H16 y TW34 relacionadas con la capacidad de colonizar el TGI de los organismos acuáticos y, además, evaluar para la cepa que presentó mayor adhesión específica a mucus de trucha arcoíris el posible efecto protector contra *V. alginolyticus* y el mecanismo de acción en un ensayo de desafío utilizando *A. franciscana*.

**Hipótesis 1:** Las cepas T4, H16 y TW34 poseen propiedades probióticas favorables para sobrevivir y colonizar el TGI de organismos acuáticos.

**Hipótesis 2:** Las cepas con adhesión específica a mucus de trucha arcoíris y capacidad de desplazar patógenos *in vitro*, brindan protección frente a desafíos *in vivo*.

## **2- Resultados y discusión**

### **2.1- Propiedades probióticas relacionadas con la capacidad de sobrevivir y colonizar el tracto intestinal de organismos acuáticos**

#### **2.1.1- Resistencia a la bilis y al pH ácido**

Los recuentos de bacterias viables para la cepa *L. lactis* TW34 disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) luego de la exposición de la misma tanto a bilis de trucha arcoíris (10 % p/v) como a pH ácido (pH 3), (Tabla 11). El recuento de *Carnobacterium* sp. T4 y *L. pentosus* H16 aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) luego de su exposición a bilis de trucha arcoíris (Tabla 11). Varias bacterias gastrointestinales son capaces de tolerar y crecer en presencia de sales biliares (Vinderola y Reinheimer, 2003; Pennacchia et al., 2004). Los ácidos biliares presentes en la bilis pueden ser hidrolizados por enzimas bacterianas como las hidrolasas de sales biliares (Moser y Savage, 2001). Estas enzimas son producidas por bacterias gastrointestinales de varios géneros, incluidos *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* entre otras (Tanaka et al., 1999; Moser y Savage, 2001). Aún no está clara la función ecológica de estas enzimas, se cree que, estas hidrolasas darían una ventaja nutricional a las cepas productoras ya que los compuestos liberados podrían usarse como fuentes de carbono, nitrógeno y energía (Begley et al., 2005). Los resultados obtenidos para T4 y H16 podrían estar relacionados con el origen de ambos debido a que provienen de intestino de trucha arcoíris y merluza, respectivamente; y podrían estar adaptadas a crecer en presencia de sales biliares. Esto debería ser probado utilizando cepas de la misma especie pero de otro origen como control para analizar si la respuesta es específica de la

especie. Por otra parte, al igual que sucedió con TW34, el recuento de T4 disminuyó al descender el pH en aproximadamente 3 órdenes de magnitud ( $p < 0,05$ ) (Tabla 11). *Lactobacillus pentosus* H16 mostró una reducción del recuento menor a 2,5 unidades logarítmicas (Tabla 11). Esta mayor tolerancia a pH ácido de H16 respecto de las otras dos cepas coincide con otros estudios que demuestran una alta tolerancia de los lactobacilos al pH ácido (Balcázar et al., 2008; Pérez-Sánchez et al., 2011; Sica et al., 2012). Tanto la mayor tolerancia de H16 al pH ácido como no verse afectada negativamente por la bilis de trucha podría relacionarse con que muchos de los mecanismos de adaptación a bilis son comunes a los de resistencia al pH (Lebeer et al., 2008). La forma protonada de las sales biliares presenta toxicidad a través de la acidificación intracelular de modo similar a la de los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, producido por los mismos lactobacilos (Begley et al., 2005; Lebeer et al., 2008).

Cepas	Tolerancia a bilis $\log_{10}$ UFC /ml		Tolerancia a bajo pH $\log_{10}$ UFC /ml	
	Control (s/bilis)	Bilis 10 % v/v	Control (pH=6,5)	pH=3
TW34	10,28 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	9,51 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	7,72 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	4,44 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
T4	7,47 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	7,66 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	7,48 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	4,10 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
H16	8,16 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	8,72 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	7,77 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	5,46 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

**Tabla 11:** Resistencia a bilis de trucha arcoíris y a valores de pH ácido de *L. lactis* TW34, *Carnobacterium* sp. T4 y *L. pentosus* H16. Los resultados están expresados en  $\log_{10}$  UFC /ml y corresponden a la media  $\pm$  1 error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ ) la letra “a” indica el menor valor y la “b” el mayor valor.

Los resultados para estas cepas muestran que, aunque algunas hayan disminuido su viabilidad, serían capaces de sobrevivir con un recuento de al menos  $10^4$  UFC/ml en condiciones hostiles, similares a las del TGI. Además, como las bacterias probióticas generalmente son suministradas mezcladas con

el alimento, la acción del pH ácido y la bilis no impactaría en forma tan directa como *in vitro* (Nikoskelainen et al., 2001b; Sorroza et al., 2012).

## 2.1.2 Capacidad de adhesión

### 2.1.2.1 Test de hidrofobicidad y de adhesión

De acuerdo a Mattos-Guaraldi et al. (1999) las cepas se consideran fuertemente hidrofóbicas cuando los porcentajes de hidrofobicidad son superiores al 50 %, moderadamente hidrofóbicas cuando se encuentran en el rango entre 50 y 20 %, e hidrofílicas cuando el valor es inferior a 20 %. Las cepas *L. lactis* TW34 y *Carnobacterium* sp. T4 resultaron moderadamente hidrofóbicas y la cepa *L. pentosus* H16 hidrofílica (Tabla 12). Estos resultados coinciden con otros estudios que han descripto bajos porcentajes de hidrofobicidad para cepas con potencial probiótico para acuicultura, también, aisladas de organismos y ambientes acuáticos (Balcázar et al., 2008; Pasteris et al., 2009; Pérez-Sánchez et al., 2011; Sica et al., 2012; Montel Mendoza et al., 2012).

Cepa	% Hidrofobicidad	Adhesión (células/cm <sup>2</sup> )	
		Vidrio	Mucus
TW34	22,56 ±1,63	1,64 × 10 <sup>5</sup> ± 6,32 × 10 <sup>3</sup> b	8,42 × 10 <sup>4</sup> ± 7,56 × 10 <sup>3</sup> a
T4	20,34 ±1,10	3,16 × 10 <sup>5</sup> ± 1,43 × 10 <sup>4</sup> b	1,16 × 10 <sup>5</sup> ± 9,97 × 10 <sup>3</sup> a
H16	19,15 ±1,32	3,80 × 10 <sup>4</sup> ± 3,90 × 10 <sup>3</sup> a	1,20 × 10 <sup>5</sup> ± 8,00 X 10 <sup>3</sup> b

**Tabla 12:** Hidrofobicidad de la superficie celular y adhesión a vidrio y a mucus de trucha arcoíris de *L. lactis* TW34, *Carnobacterium* sp. T4 y *L. pentosus* H16. Los valores corresponden a la media ± 1 error estándar. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre la adhesión al vidrio y al mucus (p<0,05) la letra “a” indica el menor valor y la “b” el mayor valor.

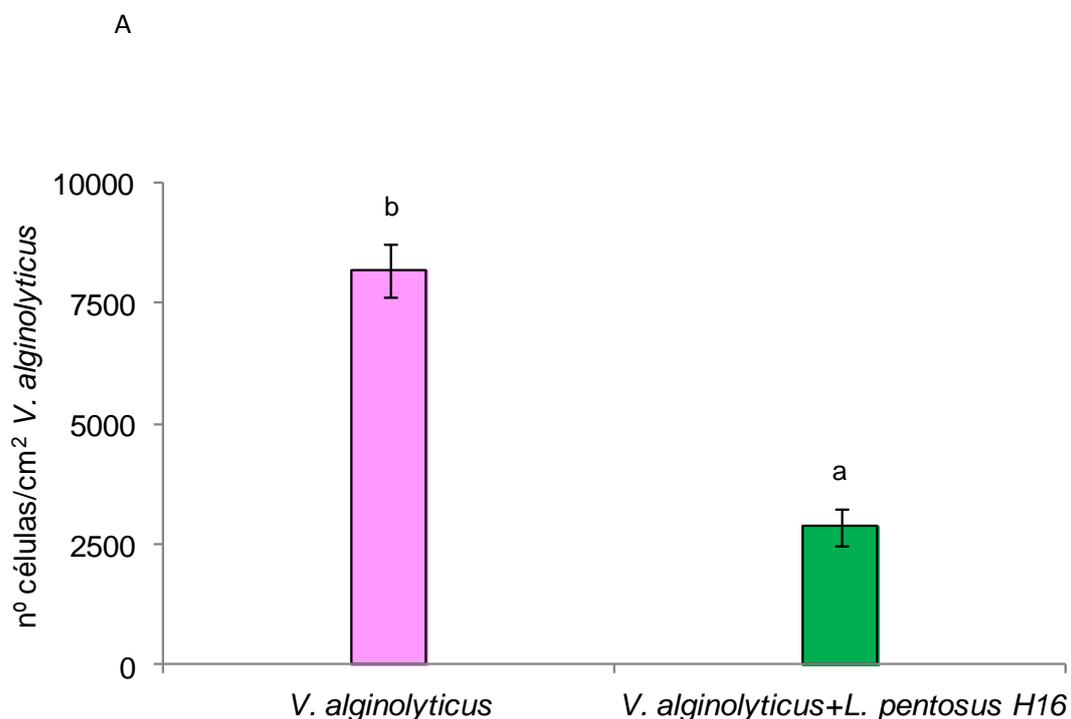
La adhesión de TW34 y T4 fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en las superficies de vidrio que en mucus (Tabla 12). Estos resultados sugieren que el tipo de interacciones que podrían predominar en estas cepas son aquellas de carácter inespecífico mediada por uniones más lábiles, como por ejemplo puente de H, fuerzas de Van der Waals, e interacciones hidrofóbicas, éstas últimas en congruencia con la hidrofobicidad presentada por TW34 y T4 (Tabla 12).

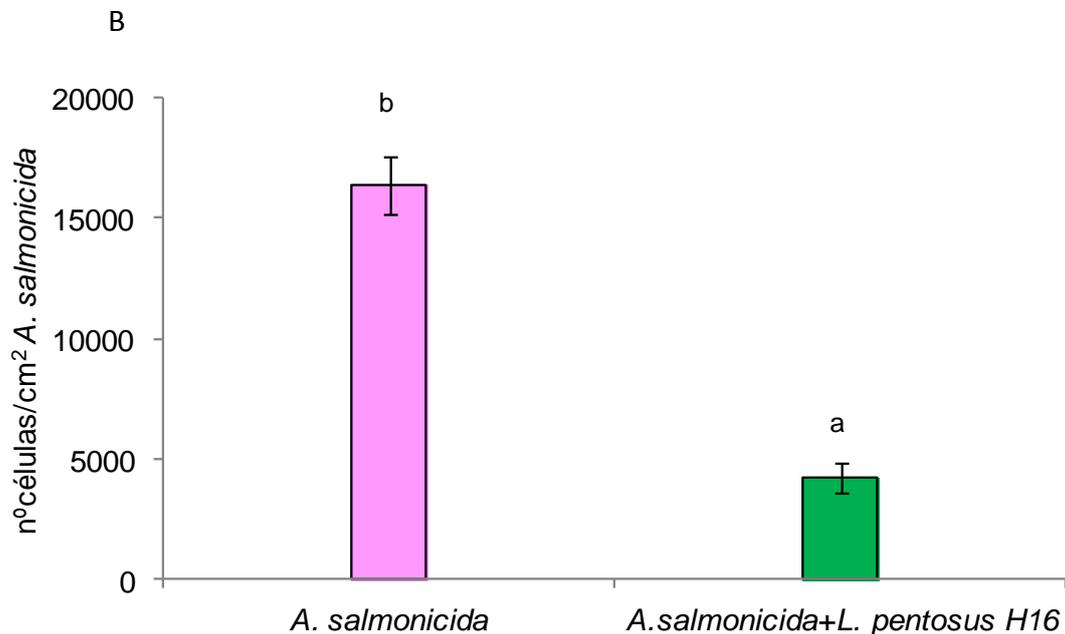
En contraste, *L. pentosus* H16 se adhirió selectivamente ( $p < 0,05$ ) al mucus de piel de trucha arcoíris (Tabla 12). Este resultado podría estar indicando la presencia de moléculas, en la superficie celular de H16, con cierta especificidad por el mucus. Diferentes aislamientos de *L. pentosus* de distintas procedencias mostraron que sólo ciertas cepas de esta especie poseen capacidad de adherirse selectivamente al mucus, tal fue el caso de *L. pentosus* S19 aislada de sedimentos estuariales (Sica et al., 2012) y *L. pentosus* PL11 proveniente de anguilas (*Anguilla japonica*) de un criadero comercial (Lee et al., 2015). Algunos autores han asociado este comportamiento diferencial entre las cepas con la naturaleza de las moléculas que se encuentran en la superficie celular, las cuales son responsables de la capacidad de adhesión específica al mucus y que sería diferente entre cepas de una misma especie (Sorongon et al., 1991; Sica et al., 2012). Abriouel et al. (2017) secuenciaron el genoma *L. pentosus* MP10, detectando *in silico* varias proteínas de superficie y proteínas de secreción que podrían estar involucradas en la adhesión al huésped. Entre ellas, se encuentran las proteínas del dominio MucBP que son proteínas bacterianas de unión a peptidoglucano implicadas en los mecanismos de adhesión al huésped, de autoagregación y/o de co-agregación con bacterias patógenas (Pérez Montoro et al., 2016). También, la proteína A de superficie de *Lactobacillus* (LspA) que ha sido definida como una proteína de unión al mucus en *L. salivarius* UCC118 (van Pijkeren et al., 2006), y otras como la proteína de unión al colágeno y el factor de elongación Tu (Abriouel et al., 2017). También, se ha descrito que moléculas de superficie como pili (o fimbria) en *Lactobacillus rhamnosus* GG y otras proteínas con estructuras altamente repetitivas en *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 estuvieron involucradas en la adhesión al mucus (Lebeer et al., 2010). Proteínas relacionadas con las

anteriormente mencionadas podrían estar presentes en H16 y participar en su mecanismo de adhesión al mucus.

### 2.1.2.2. Exclusión competitiva sobre mucus de trucha arcoíris

Debido a la adhesión específica presentada por *L. pentosus* H16 al mucus de trucha arcoíris, se evaluó mediante un ensayo de exclusión competitiva la capacidad de esta cepa de inhibir la adhesión de los patógenos *V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658. La capacidad de adhesión al mucus de estas cepas patógenas disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando fueron co-incubadas con *L. pentosus* H16 (Fig. 15 A y B).





**Figura 15:** Adhesión a mucus de trucha arcoíris: (A) *V. alginolyticus* 03/8525 en ausencia y presencia de H16, (B) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 en ausencia y presencia de H16. Los datos corresponden al valor medio y las líneas verticales indican un error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios ( $p < 0,05$ ) la letra “a” indica el menor valor y la “b” el mayor valor.

La capacidad que presentó H16 de inhibir la adhesión de *V. alginolyticus* al mucus es algo novedoso. Si bien se ha evaluado la capacidad de distintas cepas de *L. pentosus* de inhibir la adhesión al mucus de distintos patógenos que afectan organismos acuáticos como *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* (Sica et al., 2012), *Edwardsiella tarda* (Lee et al., 2015) y *V. parahaemolyticus* (Sha et al., 2016), hasta la fecha no había registro de la inhibición de *V. alginolyticus* por cepas de la especie *L. pentosus*.

La capacidad de H16 de atenuar la adherencia de *V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 a mucus sugiere un mecanismo de exclusión competitiva que involucraría tanto el impedimento estérico como la competencia por los sitios de adhesión (McGroarty, 1993). En el impedimento estérico, el tamaño o la gran cantidad de células del probiótico

ocupa los sitios de unión de forma inespecífica (McGroarty, 1993). Mientras que en la competencia por sitios de interacción específica, el probiótico ocupa sitios de adhesión específica que de otra forma estarían disponibles para los patógenos (McGroarty, 1993; Balcázar et al., 2008; Lee et al., 2015). Otros factores que podrían haber colaborado en disminuir la adhesión de estos patógenos al mucus son la actividad antimicrobiana que presentó H16 contra ellos (Fig. 10) y la capacidad que posee H16 de producir sustancias tensioactivas (biosurfactantes) (Olivera et al., 2012). Luego de suspender las células de H16 en buffer salino (PBS) e incubarlas para promover la liberación de sustancias tensioactivas, la tensión superficial del buffer descendió de  $71,5 \pm 0,3$  a  $46,4 \pm 0,4$  mN m<sup>-1</sup>. Estos resultados indican que H16 produce biosurfactantes asociados a la célula (extraíbles en PBS). Por el contrario, no se observó descenso de la tensión superficial de los sobrenadantes de cultivos de H16 en medio MRS, confirmando que no produce biosurfactantes extracelulares. La cepa *L. pentosus* CECT4023T es la única que se ha reportado como productora de un biosurfactante asociado a la célula que podría ser una glicoproteína o un glicopéptido (Moldes et al., 2013; Bustos et al., 2018). Los biosurfactantes pueden actuar en los procesos de adhesión y desorción microbiana, y han demostrado contribuir a la prevención de la colonización de los tractos urogenital y gastrointestinal por microorganismos patógenos (Reid, 2000; Gudiña et al., 2010).

## **2.2- Desafío *in vivo* de *Artemia franciscana* enriquecida con *L. pentosus* H16 frente a la acción de *V. alginolyticus***

Los resultados obtenidos para la cepa H16 mostraron que ésta fue capaz de desplazar ambos patógenos (*V. alginolyticus* y *A. salmonicida*) del mucus, por este motivo se decidió probar su acción en un modelo sencillo *in vivo*. Para realizar el desafío *in vivo* utilizando *A. franciscana*, previamente se evaluó si los patógenos inhibidos por H16 (*V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658) afectaban la supervivencia de los nauplios de *Artemia*. La supervivencia de *A. franciscana* sólo se vio

afectada por *V. alginolyticus*. Este patógeno es ubicuo en los ambientes y organismos marinos y está asociado a enfermedades oportunistas debido a su capacidad de adhesión a mucus (Thompson y Austin, 2006), factor crucial en su mecanismo de virulencia (Luo et al., 2016; Fernández Espinel et al., 2017). *Vibrio alginolyticus* puede causar una importante disminución en la tasa de crecimiento y de supervivencia de *Artemia* durante el proceso de producción como alimento vivo, ocasionando importantes pérdidas económicas para el sector acuícola (Rico-Mora y Voltolina 1995; Verschuere et al., 1999).

El siguiente paso fue evaluar si H16 era capaz de bioencapsularse en los nauplios de *A. franciscana*. Los resultados mostraron que *L. pentosus* H16 bioencapsuló exitosamente en *A. franciscana* después de 24 h de exposición y que la bioencapsulación aumentó al incrementar el tamaño del inóculo (Tabla 13). Además, es importante remarcar que la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* fue del 100 % luego de la exposición a H16 durante 24 h, período frecuentemente aplicado en la técnica de bioencapsulación, demostrando que no causa efectos negativos sobre este crustáceo (Makridis et al., 2000; Sorgeloos et al., 2001). En cambio, Van Hai et al. (2010) observaron, utilizando otras cepas probióticas con igual concentración ( $10^5$  UFC/ml) y durante el mismo período de tiempo, que los nauplios de *A. franciscana* alcanzaron un porcentaje de supervivencia entre el 84 y el 86 %.

Los valores de bioencapsulación obtenidos para H16 estuvieron en el rango de los encontrados en otros estudios ( $2,4 \times 10^3$  a  $1,2 \times 10^5$  UFC/*Artemia*), (Campbell et al., 1993; Gómez-Gil et al., 1998; Makridis et al., 2000; Van Hai et al., 2010). La cantidad de probiótico bioencapsulado en los nauplios de *Artemia* depende de las diferentes cepas bacterianas, concentraciones, tiempos de exposición y estado (vivo o muerto) del microorganismo (Gómez-Gil et al., 1998; Makridis et al., 2000).

Inóculo H16 (UFC/ml)	UFC por nauplio de <i>Artemia</i>
$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^2$ <sup>a</sup>
$0,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^2$ <sup>b</sup>
$1,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^3 \pm 5,7 \times 10^2$ <sup>c</sup>

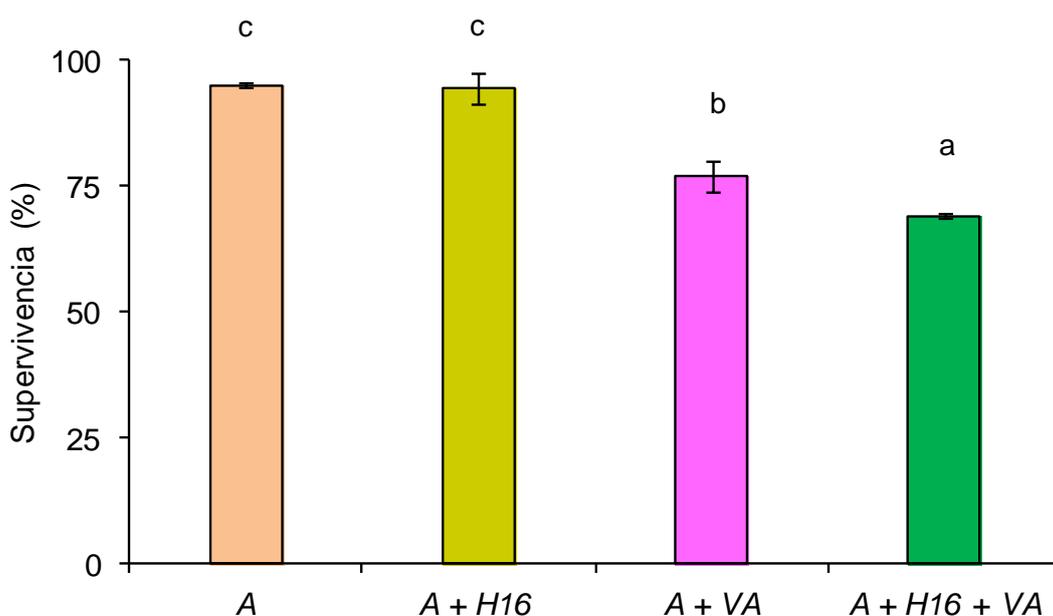
**Tabla 13:** Bioencapsulación de *L. pentosus* H16 en nauplios de *Artemia franciscana* (media  $\pm$  1 error estándar). Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto protector de *L. pentosus* H16 sobre *A. franciscana*, sus nauplios fueron desafiados con el patógeno *V. alginolyticus* 03/8525 inmediatamente después (0 h) (Fig. 16) y luego de 24 h (Fig. 17) de la administración de *L. pentosus* H16. En ambos casos los resultados fueron leídos 48 h después de la administración del patógeno, por lo que en la Figura 17 las lecturas fueron tomadas a las 72 h de comenzado el ensayo. Por este motivo, se observa una disminución en el porcentaje de supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* en el control de la Figura 17, respecto al control de la Figura 16.

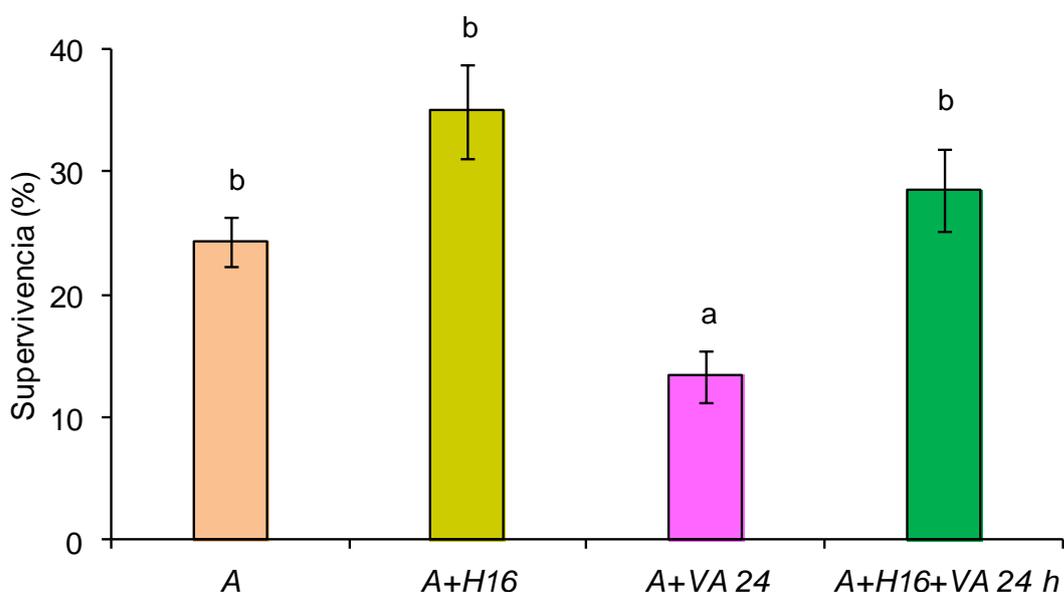
El porcentaje de mortalidad de un cultivo de *Artemia*, producida por una infección causada por *V. alginolyticus* depende de la variedad de *Vibrio* y de las diferentes especies de *Artemia*. Algunos autores han informado un 100 % de mortalidad de *A. franciscana* luego de 24 a 48 h de la administración de *V. alginolyticus* (Rico-Mora y Voltolina, 1995; Mahdhi et al., 2011a; Lamari et al., 2014), mientras que otros estudios no revelaron mortalidad durante el mismo período en contacto con otras cepas de *V. alginolyticus* (Gómez-Gil et al., 1998). En este caso, *V. alginolyticus* 03/8525 redujo significativamente la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* después de 48 y 72 h de la administración (Fig. 16 y 17, respectivamente), mientras que la colonización previa de los nauplios con la cepa probiótica H16 aumentó la supervivencia de los mismos brindando un efecto protector (Fig. 17). Por el contrario, cuando se administró *L. pentosus* H16 junto con *V. alginolyticus* 03/8525 (Fig. 16), H16 no

fue efectivo en proteger a los nauplios de *A. franciscana*. Esto sugiere que la colonización y persistencia de la cepa *L. pentosus* H16 en el TGI de *Artemia* son necesarias para una acción probiótica.

El efecto protector de H16 sobre *Artemia* se podría explicar sobre la base de las propiedades que demostró tener la cepa. Tanto la adhesión específica al mucus, como la capacidad de bioencapsulación y de producir biosurfactante estarían contribuyendo a la rápida colonización del TGI de *A. franciscana*. Asimismo, la actividad antimicrobiana que presentó H16, también podría estar inhibiendo el crecimiento del *V. alginolyticus*. Cabe destacar que hasta la fecha no existe ningún estudio que haya evaluado el efecto de *L. pentosus* sobre la protección de *Artemia* spp. contra la infección por *V. alginolyticus*.



**Figura 16:** Efecto de la co-inoculación de *L. pentosus* H16 y de *V. alginolyticus* 03/8525 en la supervivencia de los nauplios de *Artemia* luego de 48 h de la administración. *Artemia* estéril control (A), *Artemia* más *L. pentosus* H16 (A + H16), *Artemia* más *V. alginolyticus* (A + VA), *Artemia* co-inoculada con H16 y *V. alginolyticus* (A + H16 + VA). Los datos corresponden al valor medio y las líneas verticales indican un error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios ( $p < 0,05$ ) la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor.



**Figura 17:** Efecto de la administración de *L. pentosus* H16, 24 h antes de la inoculación de *V. alginolyticus* 03/8525, en la supervivencia de los nauplios de *Artemia*. *Artemia* estéril control (A), *Artemia* más *L. pentosus* H16 (A + H16), *Artemia* más *V. alginolyticus* después de 24 h de incubación (A + VA 24), *Artemia* inoculada con H16 al inicio del experimento y *V. alginolyticus* después de 24 h de incubación (A + H16 + VA 24 h). La duración de las pruebas fue de 72 h. Los datos corresponden al valor medio y las líneas verticales indican un error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios ( $p < 0,05$ ) la letra “a” indica el menor valor y la “b” el mayor valor.

En la mayoría de los estudios que han evaluado el efecto protector de BAL sobre *Artemia* spp. contra *V. alginolyticus* han utilizado concentraciones más altas de la cepa probiótica que del patógeno, en un rango de  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml para el probiótico y  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml para *V. alginolyticus* (Mahdhi et al., 2011b; Mahdhi et al., 2012; Ina-Salwany et al., 2015). Por este motivo resulta interesante destacar que la cepa H16 se empleó en menor concentración ( $4,6 \times 10^5$  UFC/ml) que el patógeno ( $5,3 \times 10^5$  UFC/ml). Esto sugiere que, con concentraciones relativamente bajas, H16 tiene la capacidad de proteger a *Artemia* de uno de los patógenos que más afectan su cultivo.

### 3- Conclusión

Las cepas T4, H16 y TW34 podrían sobrevivir al tránsito por el TGI de organismos acuáticos confirmándose la hipótesis planteada (Hipótesis 1). Además, las tres cepas fueron capaces de adherirse a mucus de trucha arcoíris, T4 y TW34 mediante adhesión inespecífica y H16 mediante adhesión específica. La capacidad de tolerar el paso por el TGI, de adherirse a mucus y de producir actividad antimicrobiana que presentaron las tres cepas, las convierte en candidatas interesantes para evaluar su efecto *in vivo* sobre un modelo vertebrado como lo es el pez cebra.

Las cepas *Carnobacterium* sp. T4 y *L. lactis* TW34 se destacan por la fuerte actividad antimicrobiana asociada a la producción de bacteriocinas contra *C. pisciola* 4020 y *L. garvieae* 03/8460, respectivamente. En cambio, *L. pentosus* H16 se destaca por su adhesión específica al mucus de trucha arcoíris, por desplazar a los patógenos *V. alginolyticus* 03/8525 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 *in vitro* y proteger a *A. franciscana* de la mortalidad causada por la infección con *V. alginolyticus* 03/8525 (Hipótesis 2). Por todo esto, H16, una bacteria marina del tracto intestinal de merluza, es un probiótico interesante para el cultivo de *Artemia* y también, podría serlo para otras actividades acuícolas como el cultivo de crustáceos y larvas de peces.

## CAPÍTULO V

**Evaluación del efecto probiótico *in vivo* de *Carnobacterium* sp. T4, *Lactobacillus pentosus* H16 y *Lactococcus lactis* TW34, utilizando el pez cebra como modelo**

## 1- Introducción

La microbiota intestinal tiene una influencia muy importante en los vertebrados, desempeñando un papel fundamental en la nutrición, el desarrollo, la inmunidad y la resistencia a los patógenos invasores (Ley et al., 2005; Sanz et al., 2010; Wang et al., 2017). Los beneficios de los probióticos son impulsados, en gran parte, por la modificación de la microbiota del huésped, siendo la colonización probiótica sobre el TGI uno de los procesos clave responsable de estos beneficios producidos en el huésped (Carnevali et al., 2017).

Los probióticos pueden modular la microbiota intestinal al colonizar la superficie de la mucosa intestinal, dominar la población, reprimir a la población de patógenos y coexistir con comensales beneficiosos (Gisbert et al., 2013; Lazado y Caipang, 2014; Carnevali et al., 2017). Entre los efectos positivos que producen los probióticos como consecuencia de la modulación de la microbiota intestinal se encuentran: la acción protectora en las células de la mucosa intestinal modificando su morfología y estimulando la respuesta inmune innata (Cerezuela et al., 2011; Abid et al., 2013), la estimulación de la función digestiva (Balcázar et al., 2006; Dimitroglou et al., 2011), la resistencia al estrés, la estimulación de la fecundidad (Giorgini et al., 2010; Vílchez et al., 2015), la supervivencia frente a patógenos (Kongnum y Hongpattarakere, 2012; Zheng y Wang, 2017) y la estimulación del crecimiento de los peces (Gisbert et al., 2013; Ramos et al., 2013; Hassaan et al., 2018).

Entre los efectos beneficiosos que pueden producir los probióticos uno de gran interés para la industria acuícola es la mejora en la asimilación del alimento y la promoción del crecimiento (López Cazorla et al., 2015). Entre los parámetros que pueden evaluarse para monitorear el crecimiento de los organismos cultivados se encuentran la tasa de crecimiento específica (TCE), que representa una medida del aumento del peso corporal diario y el factor de conversión alimentaria (FCA), que representa la relación entre la cantidad de alimento consumido y la ganancia de peso. Otros parámetros importantes son

la ganancia de peso corporal y el factor de condición (K), este último es un parámetro que tiene en cuenta el peso y el largo del pez, y representa la condición corporal del pez, se emplea para comparar la condición o bienestar de los peces.

El uso de probióticos en acuicultura ha demostrado mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal y también la disponibilidad y la absorción de nutrientes, produciendo una mayor tasa de crecimiento específica y una reducción del factor de conversión alimentaria (Yanbo y Zirong, 2006; Adineh et al., 2013). Dado que usualmente el alimento representa uno de los mayores costos que tiene la actividad acuícola, leves mejoras en la eficiencia de utilización del alimento pueden traducirse en una importante disminución de los costos de producción (Morales, 2004).

El objetivo del presente capítulo fue analizar la capacidad que presentan *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34 para modificar la microbiota intestinal y promover el crecimiento en ensayos *in vivo* utilizando el organismo modelo pez cebra. Previamente, se evaluaron formas de conservación de estas cepas para adicionarlas al alimento comercial.

**Hipótesis:** Las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34 con diferentes propiedades probióticas poseen la capacidad de modificar la microbiota intestinal y de promover el crecimiento del pez cebra.

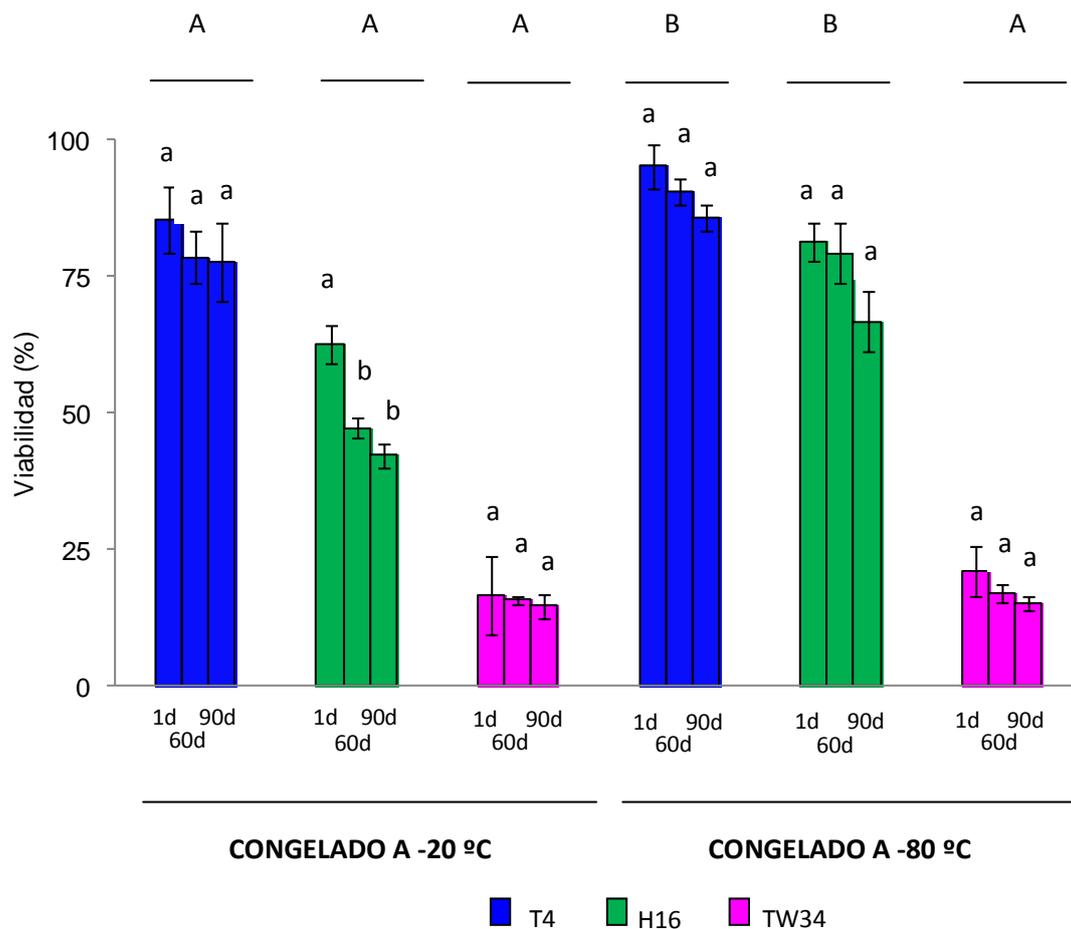
## **2- Resultados y discusión**

### **2.1- Conservación de las cepas probióticas para los ensayos *in vivo***

Un modo básico para disponer de las bacterias probióticas para adicionarlas al alimento es su conservación a bajas temperaturas, sin embargo, el estrés por frío puede afectar la supervivencia de algunas de ellas (Tripathi y Giri, 2014). Así, *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34

fueron conservadas a -20 y -80 °C, y su viabilidad fue evaluada luego de 1, 60 y 90 días de almacenamiento (Fig. 18). T4 fue la cepa menos afectada por el proceso de congelamiento con un 85,3 y 95,1 % de viabilidad a -20 y -80 °C, respectivamente, evaluado a las 24 h (Fig. 18). H16 conservó una mayor viabilidad cuando fue congelada a -80 °C (93,7 %) en comparación con -20 °C (58,3 %), en el mismo período (Fig. 18). TW34 fue la cepa más afectada por el proceso de congelamiento presentando una viabilidad de 16,5 y 21,1 % a -20 y -80 °C, respectivamente (Fig. 18).

Durante 90 días de almacenamiento a -20 °C y -80 °C, la viabilidad de las cepas T4 y TW34 se mantuvo sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; Fig. 18). H16 no presentó diferencias en su viabilidad al ser almacenada a -80 °C, en tanto que la misma disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los días 1 y 60, al ser conservada a -20 °C (Fig. 18). En términos generales, se observó una mayor supervivencia cuando las cepas se almacenaron a menor temperatura, en particular T4 y H16. Estos resultados coincidieron con otros estudios en los que la conservación a -80 °C fue capaz de garantizar la mayor supervivencia de cepas de las especies *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus* (Fonseca et al., 2001; Succi et al., 2007). En concordancia, la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* CRL 1251, *L. acidophilus* CRL 1259, *L. crispatus* CRL 1266, *L. paracasei* CRL 1289, *L. acidophilus* CRL 1294 y *L. salivarius* CRL 1328 fue en promedio un 22 % mayor para el almacenamiento a -70 °C en comparación con -20 °C (Tomas et al., 2004). Particularmente, la mayor tolerancia a las bajas temperaturas demostrada por T4 podría estar asociada con la capacidad que presentan algunas especies del género *Carnobacterium*, como *C. divergens*, *C. maltaromaticum*, *C. alterfunditum* y *C. pleistocenium* de habitar ambientes polares (Leisner et al., 2007). Estos microorganismos también pueden sobrevivir a la congelación durante considerables períodos de tiempo y a numerosos ciclos de congelación-descongelación (Katayama et al., 2007; Walker et al., 2006).



**Figura 18:** Porcentajes de viabilidad de *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34 almacenados a -20 y -80 °C. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las distintas temperaturas de almacenamiento para cada cepa y las minúsculas diferencias significativas entre los períodos de almacenamiento (1, 60 y 90 días) a la misma temperatura. Valores (media  $\pm$  1 error estándar,  $p < 0,05$ ). La letra “A” indica el menor valor y la “B” el mayor valor.

Una baja tolerancia al proceso de congelamiento, también ha sido observada en otras cepas de la misma especie que TW34 (McDonald et al., 1973; Kim et al., 1997). Kim et al. (1998) observaron que sólo un 34 % de células de *L. lactis* subsp. *lactis* LL41-1 sobrevivieron luego de 24 h a -20 °C.

Las diferencias observadas en el comportamiento de las 3 cepas podrían ser explicadas en parte sobre la base de uno de los factores que afecta la supervivencia microbiana durante la congelación, que es el tipo de microorganismo en sí mismo (Johnson y Etzel, 1995). Así, la sobrevivencia a bajas temperaturas de algunos géneros bacterianos respecto a otros se ha

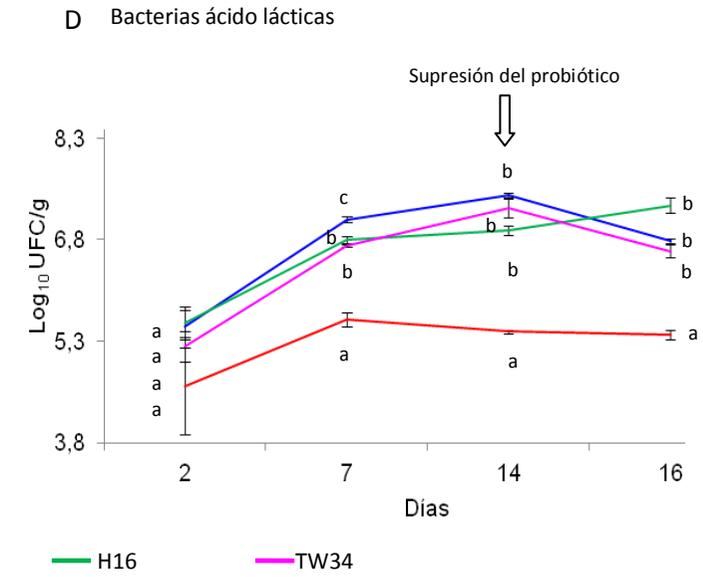
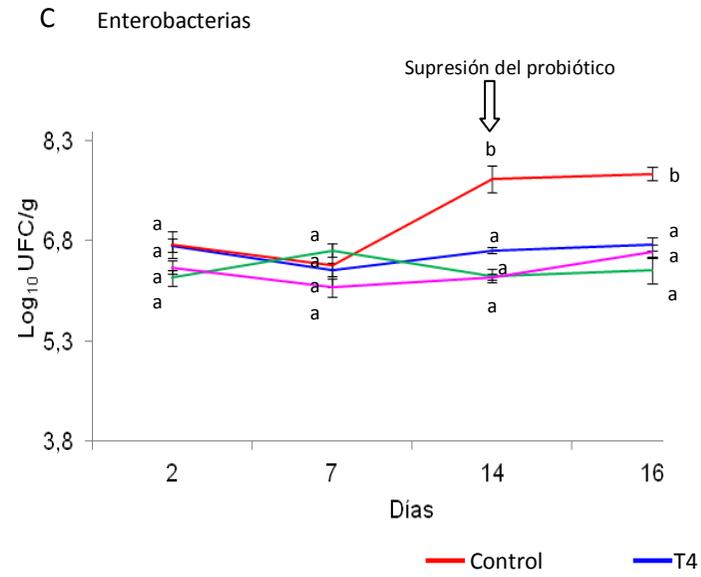
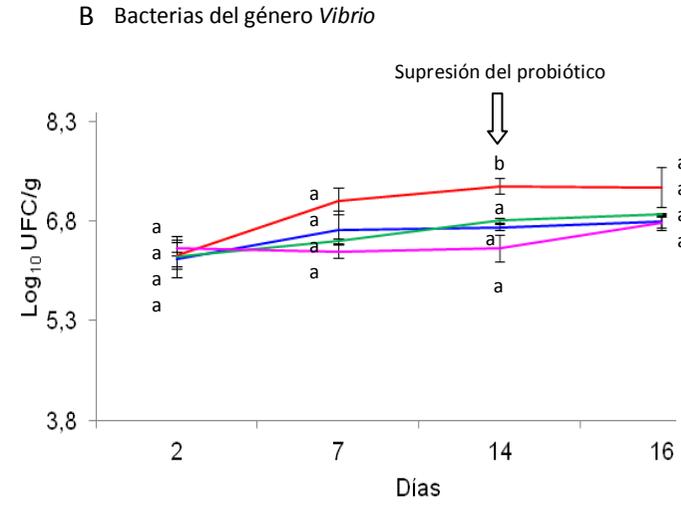
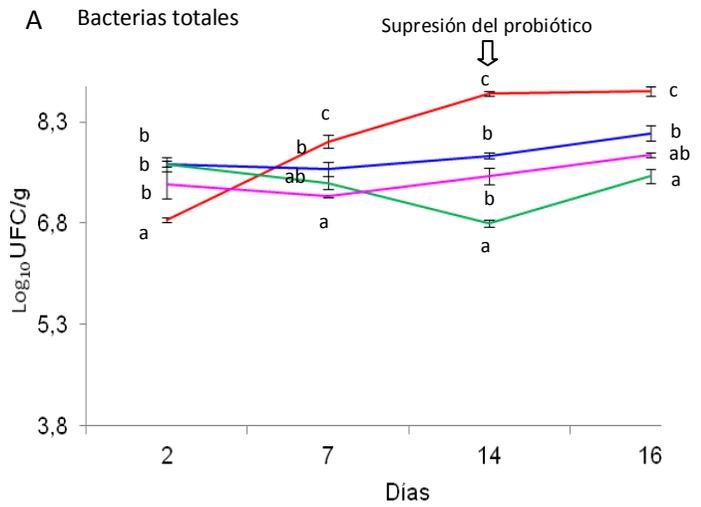
relacionado con diferencias en el tamaño, y en la estructura y composición celular (Klaenhammer et al., 1981; Bozoglu et al., 1987). Se ha demostrado que las cepas que poseen menor tamaño tienen mayor resistencia a la congelación (Mazur 1970, 1977; Bozoglu et al., 1987; Fonseca et al., 2000). Además, la tolerancia a la congelación suele ser mayor en las células bacterianas enriquecidas en componentes de la membrana que aumentan la fluidez de la misma, como ácidos grasos poliinsaturados y esteroides (Tanghe et al., 2003).

## **2.2- Evaluación del efecto de T4, H16 y TW34 sobre la microbiota intestinal del pez cebra, ensayo de colonización**

Peces cebra de 4 meses fueron alimentados diariamente durante 14 días con alimento comercial suplementado con las cepas T4, H16 o TW34 ( $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento), y con alimento comercial sin probiótico. Los días 15 y 16 todos los grupos fueron alimentados solamente con el alimento comercial (sin probiótico). Durante los 16 días que duró el ensayo no se observaron patologías, ni cambios en el comportamiento ni en el estado general de los peces y no se registró ningún pez muerto.

El recuento de bacterias totales en el intestino de los peces al inicio de la experiencia fue significativamente mayor en los tratamientos con T4, H16 o TW34 respecto del control sin probiótico, posiblemente debido a la bioaumentación producida por la adición de estos probióticos (Fig.19 A). Esta tendencia se revirtió durante el resto del experimento dado que los recuentos de bacterias totales en el tratamiento control fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que en los que contenían probióticos (Fig. 19 A). Al menos en parte, los valores más bajos en el recuento de bacterias totales para los grupos tratados con probióticos podrían estar relacionados con la disminución observada en los recuentos de bacterias del género *Vibrio* y de enterobacterias, los cuales presentaron aproximadamente medio orden y un orden de magnitud, respectivamente, por debajo de los recuentos del control (Fig. 19 B y C). En contraste, el recuento de BAL aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ), aproximadamente dos órdenes de magnitud, en todos los grupos

tratados con probióticos en comparación con el control (Fig. 19 D). Este aumento en los recuentos de las BAL probablemente fue debido a los probióticos suministrados diariamente. La disminución de la presencia de bacterias del género *Vibrio* y enterobacterias en los grupos tratados con T4, H16 y TW34 es favorable dado que estos grupos bacterianos son conocidos por ser patógenos oportunistas (Toranzo et al., 2005). Este descenso en el recuento de ciertas bacterias podría estar inducido, entre otras causas, por la actividad antimicrobiana de estas cepas probióticas y su capacidad de adhesión al mucus que puede contribuir a impedir el establecimiento de otras bacterias.



**Figura 19:** Efecto de *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34 sobre la microbiota intestinal del pez cebra. Valores (media  $\pm$  1 error estándar) de: (A) recuento de bacterias totales en medio TS; (B) recuento de bacterias del género *Vibrio* en medio TCBS; (C) recuento de enterobacterias en medio VRBG; (D) recuento de BAL en medio MRS. Los datos corresponden al valor medio y las líneas verticales indican un error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios de los recuentos de bacterias entre los distintos tratamientos en cada tiempo ( $p < 0,05$ ), la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor.

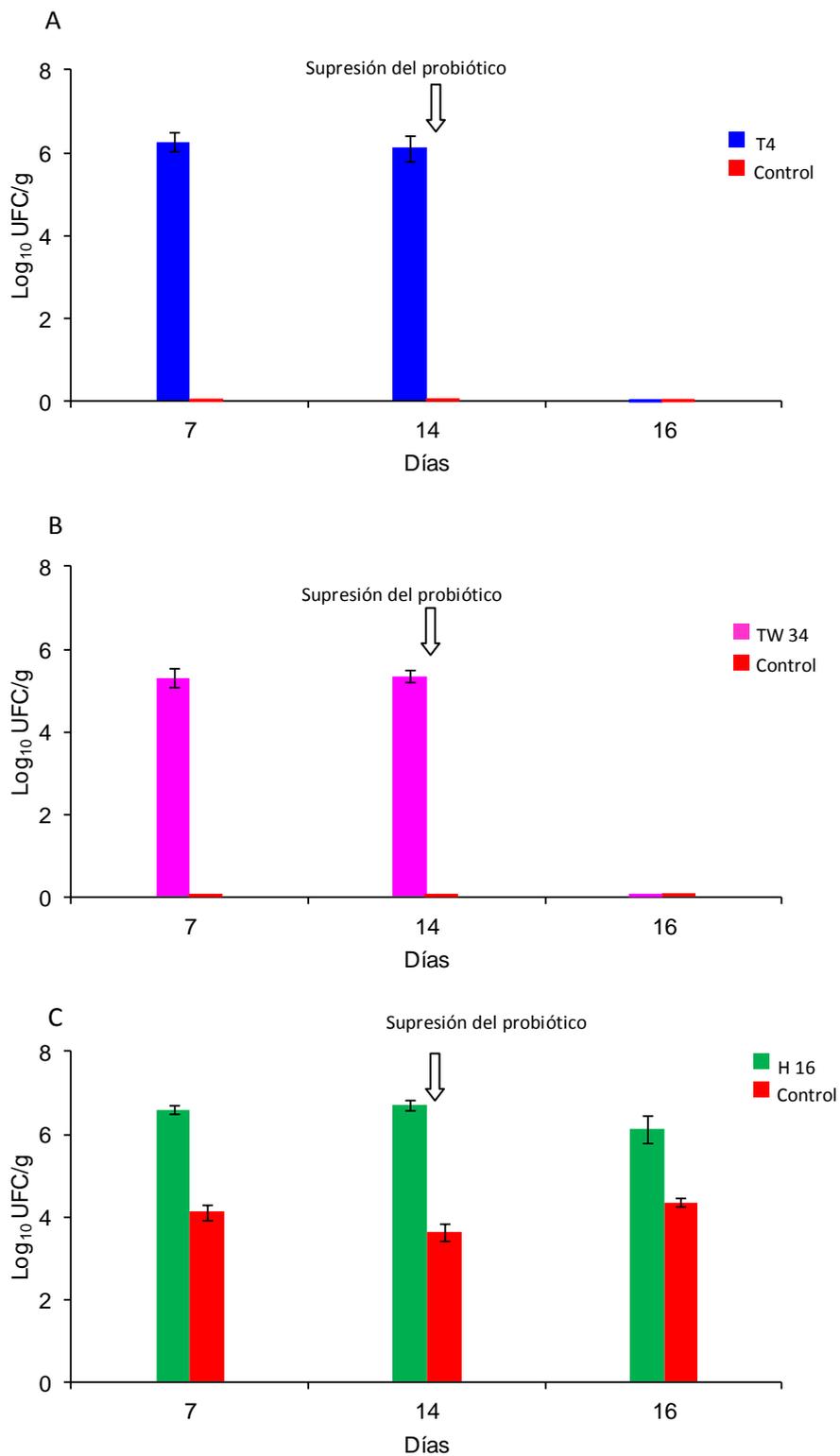
El aumento en los recuentos de BAL observado en el intestino de los peces podría deberse no sólo a los propios probióticos suministrados en la dieta, sino también al aumento de otras BAL como consecuencia de la presencia de los probióticos como ha sido descrito para el caso del probiótico *L. rhamnosus* suministrado a peces cebras (Gioacchini et al., 2012, 2014; Falcinelli et al., 2015). *L. rhamnosus* no sólo fue capaz de colonizar el TGI del pez, sino que además aumentó la abundancia de otras especies indígenas de BAL como la de la especie *S. thermophilus* (Gioacchini et al., 2012). Los autores sugieren que podría haber una relación simbiótica entre las BAL, en el tracto digestivo de pez cebra, tal como ocurre en cultivos iniciadores de productos lácteos con las interacciones entre *S. thermophilus* y lactobacilos, donde *S. thermophilus* proporciona ácido fólico y ácido fórmico a los lactobacilos que a su vez proporcionan una fuente de aminoácidos (Sieuwerts et al., 2010; Gioacchini et al., 2012; Falcinelli et al., 2015).

Los cambios observados en la microbiota intestinal del pez cebra, referidos al aumento de bacterias pertenecientes al grupo de las BAL en desmedro de otros grupos bacterianos luego de la administración del probiótico, también han sido descritos por Falcinelli et al. (2015) y Borrelli et al. (2016), en los cuales *L. rhamnosus* ha sido capaz de modular la microbiota intestinal del pez cebra aumentando el phylum Firmicutes, incluyendo *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp., a expensas de varios representantes del phylum Proteobacteria, entre los que se encontraban *Vibrio* spp. y *Plesiomonas* spp. (Borrelli et al., 2016). La modulación de la microbiota intestinal ha producido diferentes beneficios al hospedador, ya sea en la maduración de folículos, en la respuesta inmune innata intestinal, en la

regulación de moléculas implicadas en el metabolismo de los lípidos y en la modulación de moléculas neuroactivas endógenas del pez cebra (Gioacchini et al., 2012 y 2014; Falcinelli et al., 2015; Borrelli et al., 2016).

A los 2 días de la suspensión del suministro de las cepas probióticas (día 16), los recuentos de bacterias totales no presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al día 14 para el control ni para los tratamientos con T4 y TW34 (Fig. 19A). En cambio, el recuento de bacterias totales aumentó ( $p < 0,05$ ) para el grupo tratado con H16, ya que presentó a los 14 días un recuento de 6,80 Log<sub>10</sub>UFC/g de intestino y 7,50 Log<sub>10</sub>UFC/g de intestino a los 16 días. Este aumento podría relacionarse con el aumento que presentó el recuento de BAL en ese período (de 6,94 a 7,47 Log<sub>10</sub>UFC/g de intestino, entre los 14 y 16 días). En contraste, el recuento de BAL disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los grupos tratados con T4 y TW34 entre los días 14 y 16 (Fig. 19D). En el mismo período, los recuentos de *Vibrio* y enterobacterias no presentaron diferencias significativas en el control ni en los grupos tratados con las cepas probióticas (Fig. 19 B y C).

La capacidad de cada cepa probiótica para permanecer en el intestino fue diferente. T4 y TW34 se recuperaron del intestino sólo durante su administración, presentando un recuento de 6,11 y 5,35 Log<sub>10</sub>UFC/g de intestino a los 14 días, respectivamente (Fig. 20 A y 20 B). Estos resultados sugieren que las cepas no permanecen en el intestino del pez cebra luego de la suspensión de su administración o que su abundancia disminuyó y no pudieron ser detectadas por la técnica utilizada (Davis et al., 2014). No obstante, la representación proporcional de bacterias en una comunidad no necesariamente predice sus capacidades funcionales (Rolig et al., 2015). Así, por ejemplo, *Faecalibacterium prausnitzii* comprende sólo entre el 4 y 6 % de la microbiota asociada a la mucosa del ser humano y, sin embargo, es el que reduce la señalización de citoquinas proinflamatorias y la gravedad de la colitis a través de la secreción de un factor antiinflamatorio (Sokol et al., 2008; Rolig et al., 2015). La ausencia de *F. prausnitzii* directamente causa enfermedad intestinal inflamatoria (Cao et al., 2014).



**Figura 20:** Recuento de (A) *Carnobacterium* sp T4, (B) *L. lactis* TW34 y (C) *L. pentosus* H16, en el tracto intestinal del pez cebra en los grupos tratados y el control. Para la detección de las cepas se empleó la técnica de doble capa. Valores (media  $\pm$  1 error estándar).

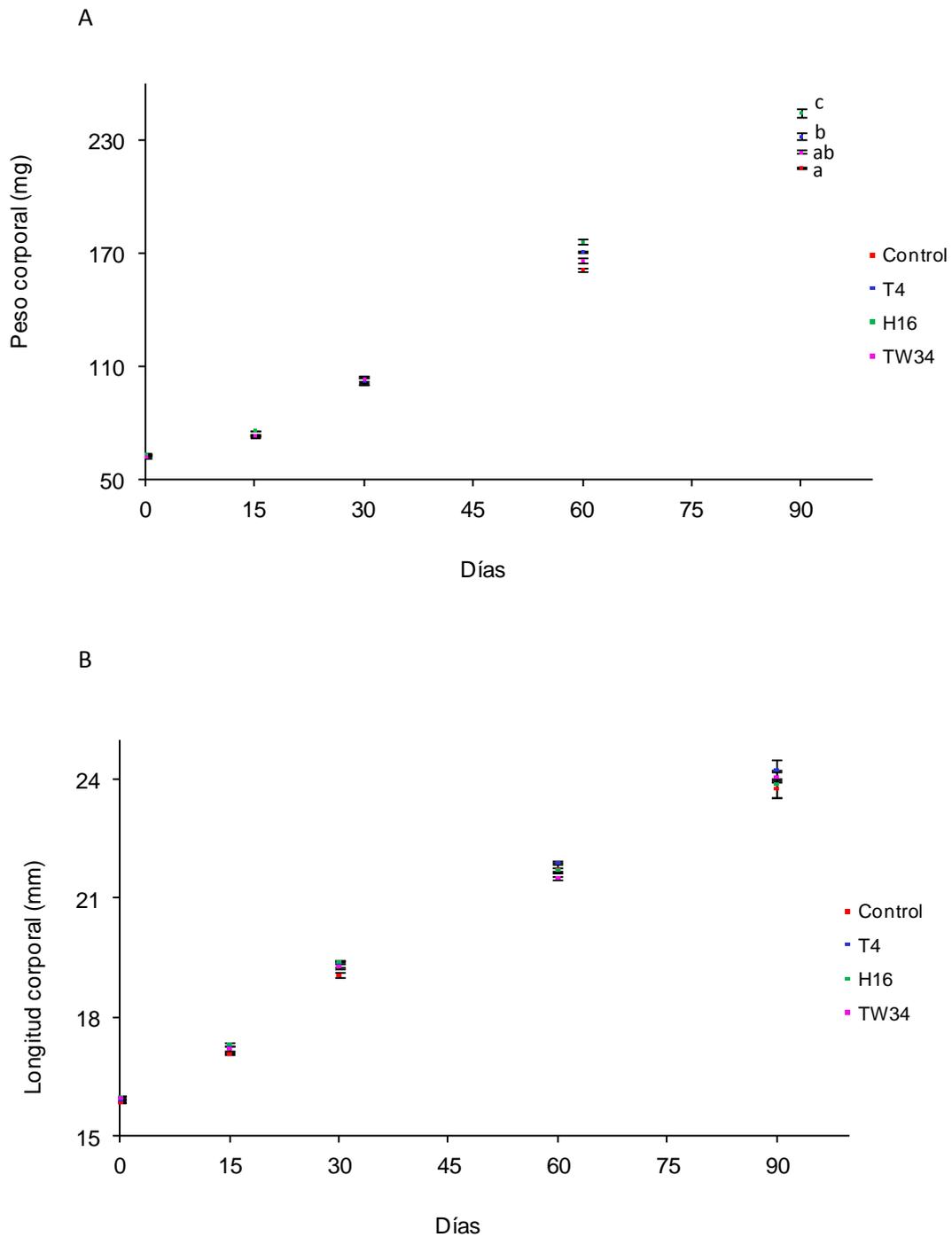
Por el contrario, el probiótico H16 fue recuperado del intestino 48 horas después de la suspensión de su administración (día 16), incluso con una abundancia similar a los valores registrados en el período de administración (6,11 Log<sub>10</sub>UFC/g de intestino) (Fig. 20 C). Esto podría asociarse con la capacidad de H16 de adhesión específica al mucus, lo que podría favorecer su permanencia en el intestino del pez cebra. En este sentido, un estudio que utilizó peces cebras gnotobióticos demostró la importancia de la presencia de factores de adhesión específicos no sólo para el establecimiento de las bacterias probióticas en el intestino, sino también para su efecto protector contra la infección de patógenos (Rendueles et al., 2012). Otras especies de *Lactobacillus* como *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* y *L. casei* también fueron capaces de adherirse y colonizar el intestino del pez cebra (Zhou et al., 2012; Rieu et al., 2014; Russo et al., 2015).

### **2.3- Evaluación de las cepas probióticas como promotoras del crecimiento del pez cebra**

A lo largo de 90 días de administración de los probióticos (T4, H16 o TW34) como suplemento del alimento comercial (1x10<sup>7</sup> UFC/g de alimento), no se observaron anomalías, alteraciones en el comportamiento ni en el estado general de los peces. Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia de los peces entre los grupos tratados y el grupo control sin probiótico ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de supervivencia registrados fueron 96,4; 98,1; 100 y 94,4 % para los tratamientos suplementados con T4, H16, TW34 y para el control, respectivamente.

Los peces de 60 dpf utilizados para este ensayo se encontraban aún en fase de crecimiento, en un estadio juvenil (Reed y Jennings, 2011; Stephen et al., 2015). El peso corporal y el largo de los peces fue medido periódicamente (Fig. 21). Al inicio del ensayo no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el peso corporal de los peces entre los grupos tratados con probióticos y el control. Sin embargo, al final del experimento, los peces alimentados con T4 y H16 presentaron un aumento significativo en el peso corporal respecto a

los peces del grupo control ( $p < 0,05$ ) (Fig. 21 A). Con respecto al largo de los peces, no hubo diferencias significativas al inicio ni al final de la experiencia entre el control y los tratamientos con probióticos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 21 B).



**Figura 21:** Crecimiento del pez cebrá alimentado con una dieta control (■) y suplementada con  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento de: *Carnobacterium* sp. T4 (■), *L. pentosus* H16 (■) o *L. lactis* TW34 (■) durante 90 días. Valores (media  $\pm$  1 error

estándar) de (A) peso corporal y (B) longitud corporal. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios de los tratamientos ( $p < 0,05$ ), la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor. Solamente se colocaron letras cuando hubo diferencias significativas.

Respecto a los diferentes parámetros de crecimiento evaluados, se observó que los peces alimentados con H16 y T4 alcanzaron una mayor ganancia de peso corporal que los que recibieron la dieta control ( $p < 0,05$ ) (Tabla 14). Con respecto al largo ganado, ninguno de los tratamientos presentó diferencias significativas respecto del control ( $p < 0,05$ ) (Tabla 14). La dieta suplementada con H16 fue la única que aumentó significativamente la tasa de crecimiento específica y el factor de condición de los peces respecto del tratamiento control (Tabla 14), éste último estima la condición corporal de los peces. Además, el tratamiento con H16 disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el factor de conversión de alimento (Tabla 14), indicando que los peces tuvieron una mayor ganancia de peso por la misma cantidad de alimento consumido respecto al control.

Parámetros	Control	T4	H16	TW34
Ganancia de peso corporal ( $\Delta p$ ) (mg)	152,51 $\pm$ 3,57 <sup>a</sup>	169,38 $\pm$ 3,90 <sup>b</sup>	181,32 $\pm$ 3,34 <sup>c</sup>	161,39 $\pm$ 2,9 <sup>ab</sup>
Ganancia de longitud ( $\Delta l$ ) (mm)	7,89 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	8,31 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	7,90 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	8,10 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
Factor de condición (k)	1,62 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,65 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,82 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,62 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Tasa de crecimiento específica (TCE)	1,38 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	1,46 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>	1,51 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,42 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>
Factor de conversión de alimento (FCA)	2,71 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	2,52 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup>	2,37 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	2,58 $\pm$ 0,45 <sup>ab</sup>

**Tabla 14:** Parámetros de crecimiento del pez cebra luego de 90 días de alimentación con una dieta control o suplementada con  $1 \times 10^7$  UFC/g de alimento de las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 o *L. lactis* TW34. Valores (media  $\pm$  1 error estándar). Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ), la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor.

El aumento del crecimiento observado en los peces cebra tratados con H16 y T4 probablemente se encuentre relacionado con la capacidad que presentan estas cepas de modular la microbiota intestinal. Se ha demostrado que la microbiota intestinal afecta una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo el procesamiento y la absorción de nutrientes (Verschuere et al., 2000a; Wang et al., 2017), el desarrollo del sistema inmune de la mucosa intestinal, el fortalecimiento del sistema inmune innato y la proliferación del epitelio intestinal (Rawl et al., 2004), por lo que juega un rol fundamental tanto en el crecimiento como en el bienestar de los individuos. Así, Rawls et al. (2004) demostraron, mediante el empleo de larvas de pez cebra de 6 dpf criadas de diferente manera (larvas criadas de manera convencional y larvas libres de gérmenes), que la microbiota intestinal puede regular la expresión de 212 genes, donde están incluidos aquellos implicados en la estimulación de la proliferación del epitelio intestinal, en la captación y el metabolismo de los nutrientes y en la respuesta inmune innata.

Las cepas H16 y T4 también podrían haber afectado la morfología del epitelio intestinal, diversos estudios han confirmado que el consumo de probióticos puede mejorar el crecimiento al aumentar el largo de las vellosidades intestinales, y como consecuencia la superficie intestinal, lo que produciría una mejora en la absorción de nutrientes (Merrifield et al., 2010b; Pirarat et al., 2011; Gisbert et al., 2013).

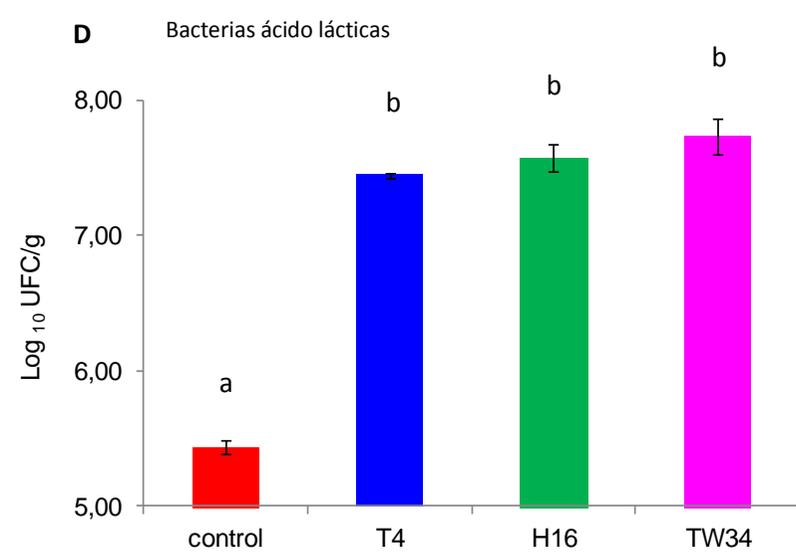
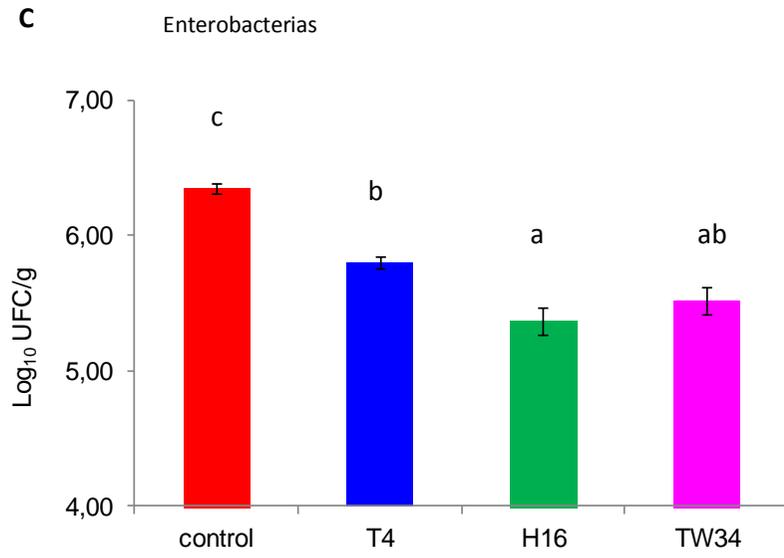
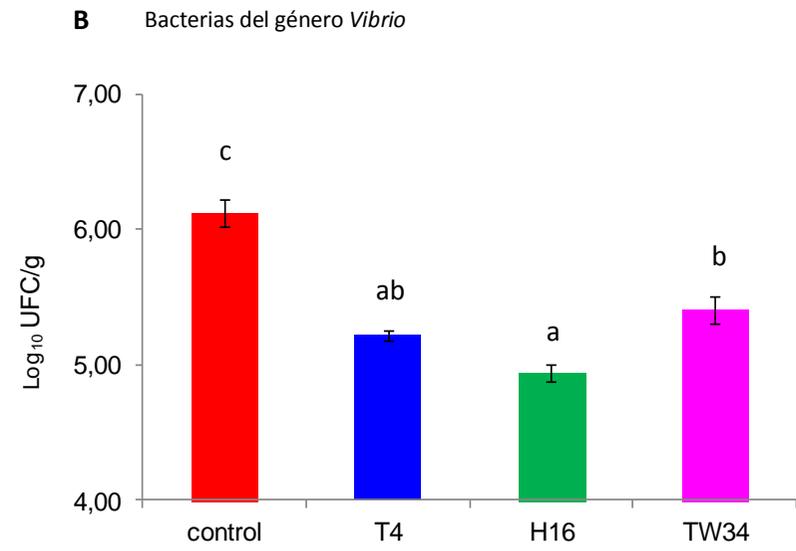
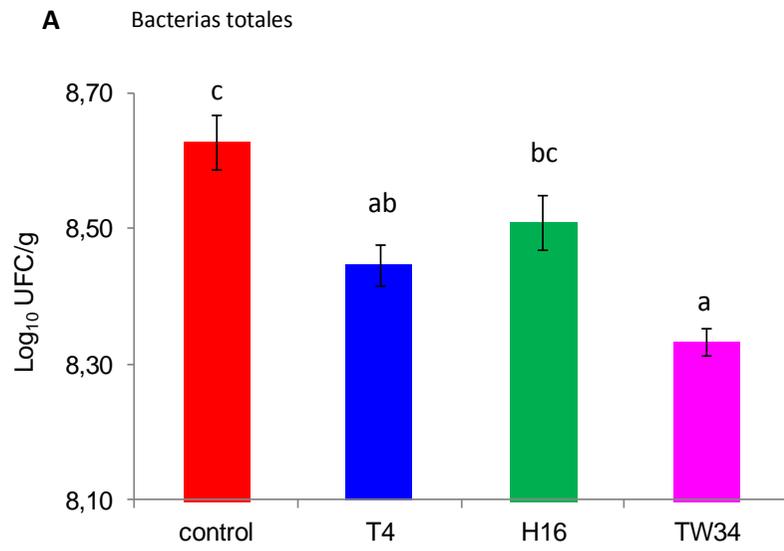
Uno de los probióticos más estudiados usando el pez cebra como modelo ha sido *L. rhamnosus* IMC 501. Varios estudios han demostrado que este probiótico actúa sobre diferentes órganos y sistemas del pez, por ejemplo, acelerando la tasa de crecimiento y la calcificación de la columna vertebral, a través de la estimulación de la expresión de genes claves implicados en la osificación, y también, estimulando la maduración temprana de las gónadas (Avella et al., 2012; Carnevali et al., 2013; Maradonna et al., 2013). Hasta el momento no se han encontrado estudios que evalúen el efecto de bacterias pertenecientes a la especie *L. pentosus* sobre los parámetros de crecimiento del pez cebra, aunque sí se han reportado dos cepas de esta especie (*L.*

*pentosus* HC-2 y AS13) que mejoraron el crecimiento del camarón *Litopenaeus vannamei* (Sha et al., 2016; Zheng y Wang, 2017) y una (*L. pentosus* PL11) que estimuló el crecimiento y el sistema inmune de la anguila *Anguilla japonica* (Lee et al., 2013).

### 2.3.1- Análisis de la microbiota intestinal a los 90 días de experimentación

En el intestino de los peces alimentados durante 90 días con los suplementos probióticos T4 o TW34, el recuento de bacterias totales fue significativamente menor que en el grupo control sin probiótico ( $p < 0,05$ ), (Fig. 22 A). El grupo tratado con H16 también tuvo un recuento de bacterias totales menor que el grupo control, pero no presentó diferencia significativa con éste ( $p < 0,05$ ). De igual modo a lo sucedido en el ensayo de colonización, los valores más bajos en el recuento total de bacterias para los grupos tratados con probióticos podrían correlacionarse con la disminución observada en los recuentos de bacterias del género *Vibrio* (Fig. 22 B) y de enterobacterias (Fig. 22 C), con un valor aproximadamente un orden de magnitud inferior respecto del control sin probiótico ( $p < 0,05$ ). Respecto a las BAL, los recuentos fueron significativamente superiores (2 órdenes de magnitud) en los peces alimentados con cada una de las cepas probióticas respecto del control ( $p < 0,05$ ), (Fig. 22 B).

A los 90 días, también se detectó en la microbiota intestinal la presencia de la cepa T4 con un recuento de 6,8  $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$  de intestino, y las cepas H16 y TW34 con recuentos de 7,24 y 7,4  $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$  de intestino, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de colonización de las cepas probióticas, en el cual la administración de las mismas provocó un aumento en los recuentos de BAL y una disminución en los del género *Vibrio* y de las enterobacterias, y, asimismo, fueron detectadas en el intestino durante su administración.



**Figura 22:** Recuento de bacterias en el tracto intestinal del pez cebra luego de 90 días de administración de las cepas *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 o *L. lactis* TW34 en el alimento. Valores (media  $\pm$  1 error estándar) de: (A) recuento de bacterias totales en medio TSA (B) recuento de BAL en medio MRS (C) recuento de bacterias del género *Vibrio* en medio TCBS (D) recuento enterobacterias en medio VRBG. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios ( $p < 0,05$ ), la letra “a” indica el menor valor y la “c” el mayor valor.

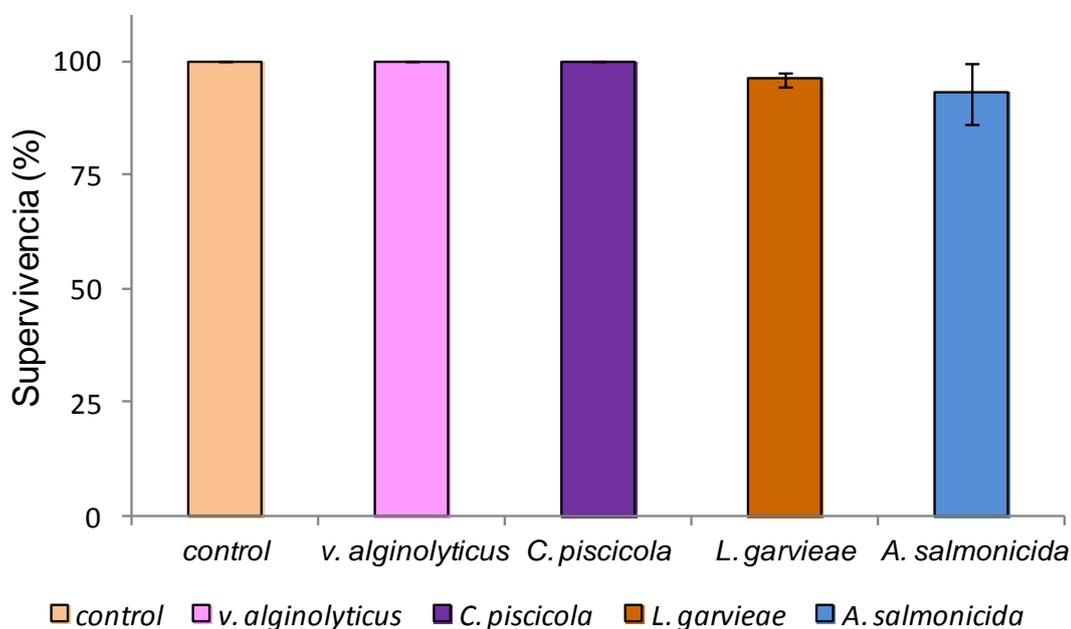
#### **2.4- Efecto de los patógenos usados en la presente tesis sobre larvas de pez cebra**

Con el fin de realizar una evaluación del efecto protector de las cepas probióticas utilizando larvas de pez cebra, primero se realizaron desafíos de los patógenos *V. alginolyticus*, *C. piscicola*, *L. garvieae* y *A. salmonicida*, que son inhibidos por los probióticos seleccionados, sobre larvas de 5 dpf.

Cada cultivo con larvas de pez cebra fue inoculado con un patógeno diferente con una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC/ml de E3, excepto el control sin patógeno. A los 7 días post infección ninguno de los cultivos en presencia de patógenos mostró diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia de las larvas respecto del control ( $p < 0,05$ ) (Fig. 23). Las larvas de pez cebra han demostrado ser tolerantes a los patógenos evaluados en las condiciones de infección ensayadas, por lo que no se pudo demostrar el efecto protector de las cepas probióticas utilizando este modelo experimental.

La tolerancia de larvas del pez cebra a diferentes patógenos de organismos acuáticos también ha sido encontrada por Rendueles et al. (2012), quienes demostraron que sólo uno, *Edwardsiella ictaluri*, de los 25 patógenos intestinales de peces probados, pertenecientes a los géneros *Aeromonas*,

*Vibrio*, *Edwardsiella*, *Listonella*, *Photobacterium* y *Yersinia*, causó mortalidad en larvas de pez cebra.



**Figura 23:** Supervivencia de larvas de pez cebra luego de 7 días de la infección experimental con  $10^7$  UFC/ml de *V. alginolyticus* 03/8525, *C. piscicola* 4020, *L. garvieae* 03/8460 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658. Los datos corresponden al valor medio y las líneas verticales indican un error estándar (No hubo diferencias significativas entre los valores medios,  $p < 0,05$ ).

Otra forma de provocar infecciones bacterianas en larvas de pez cebra es por medio de microinyectores especialmente diseñados para manipular larvas de tan pequeño tamaño (Takaki et al., 2013). La infección se puede lograr utilizando micro-agujas especiales para la inoculación de la cepa a

evaluar o para provocar injurias sobre la larva que luego es puesta en contacto por inmersión en una suspensión del patógeno. En varios estudios que produjeron infecciones experimentales, ya sea en larvas como en peces, éstos fueron lastimados antes de infectarlos o directamente inyectados, debido a que el pez cebra saludable es relativamente refractario a la infección por contacto con los patógenos (Neely et al. 2002; Pressley et al., 2005; Zhang et al., 2016). Estos antecedentes refuerzan el concepto que en acuicultura los peces saludables y en buenas condiciones pueden ser refractarios a la mayoría de los patógenos oportunistas mientras que, cuando se producen heridas sobre la piel en condiciones de estrés y hacinamiento, como frecuentemente sucede en la acuicultura intensiva, son más susceptibles a las infecciones bacterianas.

### **3-Conclusión**

La congelación y conservación a -80 °C resultó ser un método adecuado para la conservación de *Carnobacterium* sp. T4, *L. pentosus* H16 y *L. lactis* TW34. Esto nos permitió conservar un mismo stock de cada cepa para utilizarlos en todos los ensayos *in vivo*. En los ensayos de colonización y de crecimiento se pudo comprobar la seguridad de las tres cepas probióticas, debido a que no causaron mortalidad ni cambios en el comportamiento de los peces. T4, H16 y TW34 lograron modificar la microbiota intestinal del pez cebra, promoviendo la población beneficiosa de BAL y disminuyendo la de vibrios y enterobacterias, conocidos por incluir especies patógenas frecuentes en acuicultura como *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *E. tarda* y *Y. ruckeri*.

Muy limitada es la información sobre el efecto de los probióticos sobre el crecimiento del pez cebra, remarcando la originalidad de los resultados obtenidos que demostraron que probióticos autóctonos de peces de Patagonia estimulan el crecimiento de este pez. Particularmente, *Carnobacterium* sp. T4 y *L. pentosus* H16 indujeron un aumento del peso corporal de los peces. Además, H16 mejoró el factor de condición de los peces, aumentó la tasa de crecimiento específica y disminuyó el factor de conversión del alimento, resultando en una de las cepas más prometedoras de este estudio para acuicultura.

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

En algunos organismos acuáticos provenientes de ríos y costas marinas de la región patagónica se encontraron presentes microorganismos con propiedades probióticas valiosas para la acuicultura.

Se demostró que la ocurrencia de cepas autóctonas con actividad antimicrobiana extracelular contra patógenos de peces existe, pero es limitada.

Las tres cepas seleccionadas y caracterizadas en esta Tesis fueron microbiológicamente seguras y presentaron diferentes estrategias para enfrentar a patógenos de importancia acuícola. *Carnobacterium* sp. T4 y *Lactococcus lactis* TW34 produjeron bacteriocinas con actividad antimicrobiana contra patógenos Gram positivos *C. piscicola* y *L. garvieae*, respectivamente. *Lactobacillus pentosus* H16 inhibió a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y *V. alginolyticus*, ambos Gram negativos, mediante la producción de ácidos orgánicos y adhesión selectiva a mucus asociada a mecanismos de exclusión competitiva de patógenos.

Estas tres cepas fueron capaces de atravesar el tracto gastrointestinal del pez cebra, ser detectadas en el intestino y modificar su microbiota intestinal, aumentando poblaciones bacterianas beneficiosas y disminuyendo aquellas que pueden incluir patógenos oportunistas como enterobacterias y *Vibrio* spp.

*L. pentosus* H16 presentó valiosas propiedades para ser aplicada en el cultivo de crustáceos ya que demostró la capacidad de proteger a *Artemia* de la infección de un patógeno oportunista como *V. alginolyticus*. Además, su bioencapsulación en *Artemia* la vuelve apta para su administración a peces y

crustáceos en su etapa larval más vulnerable, bioencapsulada en portadores vivos (“carriers”) como rotíferos o *Artemia* spp.

Las cepas T4 y H16 mostraron beneficios concretos sobre el crecimiento de los peces aún cuando éstos fueron cultivados en sus condiciones óptimas de alimentación, calidad de agua, densidad y bienestar animal. Sería esperable que los efectos positivos de estos probióticos fueran aún más notorios en organismos acuáticos expuestos a algún tipo de estrés, como los que sufren en la acuicultura intensiva.

H16 también mejoró otros parámetros de interés económico para la producción acuícola entre ellos el factor de conversión del alimento, logrando un mayor aumento de biomasa del pez con el mismo alimento suministrado.

Si bien el pez cebra es un modelo experimental bien conocido, recién en los últimos años ha sido utilizado para evaluar procesos aplicados a la acuicultura, por lo que para transpolar los resultados a especies comerciales, como por ejemplo trucha arcoíris, será necesario realizar ensayos con las mismas.

Como conclusión final, en el presente estudio se demostró que existen en los ambientes acuáticos de la región patagónica bacterias que cumplen con los criterios de selección de probióticos para acuicultura, y que pueden constituir nuevas alternativas biotecnológicas ambientalmente amigables para contribuir a mitigar la ocurrencia de patógenos en esa actividad.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

Abid A., Davies S.J., Waines P., Emery M., Castex M., Gioacchini G., Carnevali O., Bickerdike R., Romero J. y Merrifield D.L. 2013. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1948-1956.

Abriouel H., Pérez Montoro B., Casimiro-Soriguer C.S., Pérez Pulido A.J., Knapp C.W., Caballero Gómez N., Castillo-Gutiérrez S., Estudillo-Martínez M., Gálvez A. y Benomar N. 2017. Insight into potential probiotic markers predicted in *Lactobacillus pentosus* MP-10 genome sequence. *Frontiers in Microbiology* 8: 891.

Adel M., Yeganeh S., Dawood M.A.O., Safari R., y Radhakrishnan S. 2017. Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 23: 1401-1409.

Adineh, H., Jafaryan H., Sahandi J. y Alizadeh M. 2013. Effect of *Bacillus* spp. probiotic on growth and feeding performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 16: 29-36.

Alakomi H.L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. y Helander, I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2001-2005.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. y Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

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

ANMAT. Administracion Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologia Medica. Ministerios de Salud de la Nacion. 2007. Probióticos y Prebióticos.

Anukam K.C., Macklaim J.M., Gloor G.B., Reid G., Boekhorst J., Renckens B., van Hijum S.A.F.T. y Siezen R.J. 2013. Genome sequence of *Lactobacillus pentosus* KCA1: vaginal isolate from a healthy premenopausal woman. *PLoS ONE* 8: e59239.

- Ardó L., Yin G., Xu P., Váradi L., Szigeti G., Jeney Z. y Jeney G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275: 26-33.
- Arena M.P., Silvain A., Normanno G., Grieco F., Drider D., Spano G. y Fiocco D. 2016. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 7: 464.
- Austin B. y Austin D.A. 2012. Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish. Heidelberg, Germany: Springer. 5th ed.
- Avella M.A., Place A., Du S.J., Williams E., Silvi S., Zohar Y., Carnevali, O. 2012. *Lactobacillus rhamnosus* accelerates zebrafish backbone calcification and gonadal differentiation through effects on the GnRH and IGF systems. *PloS one* 7: e45572.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D., Múzquiz J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173-186.
- Balcázar J.L., Rojas-Luna T. y Cunningham D.P. 2007a. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 147-150.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruíz-Zarzuola I., Vendrell D., Girones O. y Múzquiz J.L. 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51: 185-193.
- Balcázar J.L., de Blas I., Ruíz-Zarzuola I., Vendrell D., Girones O. y Múzquiz J.L. 2007c. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 30: 111-118.
- Balcázar J.L., Vendrell D., de Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Muzquiz J.L., Girones O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
- Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Marchant R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 427-444.

Bauer A.W., Kirby, M.M., Sherris J.C. y Tuurck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45:493-496.

Baya A.M., Toranzo A.E., Lupiani B., Li T., Roberson B.S. y Hetrick F.M. 1991. Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3114-3120.

Begley M., Gahan C.G. M., Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 625-651.

Bekker A., Hugo C., Albertyn J., Boucher C.E., Bragg R.R. 2011. Pathogenic Gram-positive cocci in South African rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 34: 483-487.

Bemena L.D., Mohamed L.A., Fernandes A.M., Lee B.H. 2014. Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 924-949.

Bennik, M.H.J., Smid, E.J. and Gorris, L.G.M. 1997. Vegetable associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2074 -2076.

Bhunja A.K., Johnson M.C. y Ray B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2: 319-322.

Boon P.I. y Cattanach M. 1999. Antibiotic resistance of native and faecal bacteria isolated from rivers, reservoirs and sewage. *Letters in Applied Microbiology* 28: 164-168.

Borrelli L., Aceto S., Agnisola C., De Paolo S., Dipineto L., Stilling R.M., Dinan T.G., Cryan J.F., Menna L. y Fioretti, A. 2016. Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish. *Scientific Reports* 6: srep30046.

Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., Frisvad J.C., Gerds M.L., Hammes W.P., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I.B., Prajapati J.B., Seto Y., Schure E.T., Van Boven A., Vankerckhoven V., Zgoda A., Tuijelaars S. y Hansen E.B. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.

Bøyum A. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 5: 9-15.

- Bozoglu T.F., Ozilgen, M. y Bakir U. 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology* 9:531-537.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bustos G., Arcos U., Vecino X., Cruz, J. M. y Moldes A.B. 2018. Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal* 132: 191-195.
- CAA. 2011. Código Alimentario Argentino (Capítulo XVII, Alimentos de régimen o dietéticos, artículo 1.389). Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca.
- Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8: 1137-44
- Cabello F.C., Godfrey H.P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A., y Buschmann A. H. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15: 1917-1942.
- Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 19:21-41.
- Campbell R., Adams A., Tatner M.F., Chair M. y Sorgeloos P. 1993. Uptake of *Vibrio anguillarum* vaccine by *Artemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. *Fish & Shellfish Immunology* 3:451-459.
- Cao Y., Shen J. y Ran Z.H. 2014. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterology Research and Practice*.
- Carnevali O., Zamponi M., Sulpizio R., Rollo A., Nardi M., Orpianesi C., Silvi S., Caggiano M., Polzonetti A. y Cresci A. 2004. Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International* 12: 377-386.
- Carnevali O., Avella M.A. y Gioacchini G. 2013. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 188: 297-302.

- Carnevali O., Maradonna F. y Gioacchini G. 2017. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472: 144-155.
- Carr F.J., Chill D. y Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 281-370.
- Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C.G. and Navarrete, P. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology* 6: 1093.
- Casado Muñoz M.C., Benomar N., Lavilla Lerma L., Gálvez A. y Abriouel H. 2014. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology* 172: 110-118.
- Cerezuela R., Meseguer J. y Esteban M.A. 2011. Current knowledge in symbiotic use for fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture Research & Development* 1: 1-7.
- Chang C.I., y Liu W.Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 25: 311-315.
- Clegg J. y Trotman C. 2002. Physiology and biochemical aspects of *Artemia* ecology. En: *Artemia: basic and applied biology*. Dordrecht: Springer.
- Cole D.W., Cole R., Gaydos S.J., Gray J., Hyland G., Jacques M.L. 2009. Aquaculture: environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212: 369-377
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. 2007. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* 71: 71-74.
- Cortes A., Troconis I. y Jaramillo M. 2013. Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas* 15: 16-23.
- Cortés-Zavaleta O., López-Malo A., Hernández-Mendoza A. y García H.S. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *International Journal of Food Microbiology* 173: 30-35.
- Cowan S.T. y Steel S. 1993. Identification of family Enterobacteriaceae. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. London: Cambridge University Press.

Dalmin G., Kathiresan K. y Purushothaman A. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian Journal of Experimental Biology* 39: 939–942.

Davidson P.M. y Taylor T.M. 2007. Chemical preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. En: *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington: Doyle and Beuchat, ASM press. 3rd ed.

Davis D.J., Bryda E.C., Gillespie C.H. y Ericsson A.C. 2016. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 311: 219-227.

DeLong E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 5685-5689.

Dey A., Ghosh K. y Hazra N. 2015. An overview on bioencapsulation of live food organisms with probiotics for better growth and survival of freshwater fish juveniles. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture* 5: 74-83.

Díaz-Cruz M.S., López de Ayala M.J. y Barceló D. 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22: 340-351.

Dimitroglou A., Merrifield D.L., Carnevali O., Picchiatti S., Avella M., Daniels C., Güroy D. y Davies S. 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production—a Mediterranean perspective. *Fish & shellfish immunology* 30: 1-16.

Done H.Y., Venkatesan A.K. y Halden R.U. 2015. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture?. *The AAPS journal* 17: 513-524.

Dopazo C.P., Lemos M.L., Lodeiros C., Bolinches J., Barja J. L. y Toranzo A. E. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 65: 97-101.

Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M. y Prévost H. 2006. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 564-582.

EFSA. 2008. Technical guidance. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 732: 1-15.

- Egervärn M. 2009. Antibiotic Resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. Tesis doctoral. Universidad sueca de Ciencias Agrícolas, Suecia.
- Ellis A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 291-308.
- Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokine O., van Dorsselear A., Bringel F., Hubert, J.C. y Hasselmann C. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4381-4387.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K. y Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 85-106.
- Falcinelli S., Picchietti S., Rodiles A., Cossignani L., Merrifield D.L., Taddei A.R., Maradonna F., Olivotto I., Gioacchini G. y Carnevali, O. 2015. *Lactobacillus rhamnosus* lowers zebrafish lipid content by changing gut microbiota and host transcription of genes involved in lipid metabolism. *Scientific Reports* 5: 9336.
- Fang H., Elina T., Heikki A. y Seppo S. 2000. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology y Medical Microbiology* 29: 47-52.
- FAO/NACA/WHO. 1999. Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization/ Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific. Joint Study Group. Food safety issues associated with products from aquaculture. WHO Technical Report Series 883: 1-68.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group, London, Ontario, Canada.
- FAO. 2005-2018. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Argentina. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Panné Huidobro, S. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. Actualizado 12 June 2018.
- FAO. 2009. Integrated mariculture: a global review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 529. Rome, FAO.
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome.
- Felix J.V., Papathanasopoulos M.A., Smith A.A., von Hol, A. y Hastings J.W. 1994. Characterization of leucocin B-Ta11a: a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Current microbiology* 29: 207-212.

Fernández Espinel C., Flores Dominick V., y Medina Morillo M. 2017. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. Revista Peruana de Biología 24: 93-100.

Fonseca F., Béal C., y Corrieu G. 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. Journal of Dairy Research, 67: 83-90.

Fonseca F., Beal C. y Corrieu G. 2001. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. Cryobiology 43: 189-198.

Food and Drug Administration. 2005. Agency response letter. GRAS notice no. GRN 000159. Food and Drug Administration, Washington, DC.

Fuller R. 1989. "Probiotics in man and animals" Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.

Garcés M.E., Sequeiros C. y Olivera N.L. 2015. Marine *Lactobacillus pentosus* H16 protects *Artemia franciscana* from *Vibrio alginolyticus* pathogenic effects. Diseases of Aquatic Organisms 113: 41-50.

Gatesoupe F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

Gatesoupe F. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 14:107-114.

Gibson G.R. y Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition 125: 1401-1412.

Gildberg A., Mikkelsen H., Sandaker E., y Ringø E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Hydrobiologia 352: 279-285.

Gildberg A. y Mikkelsen H. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. Aquaculture 167: 103-113.

Gilliland S.E. 1969. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. Journal of Dairy Science 52: 321-324.

- Gioacchini G., Maradonna F., Lombardo F., Bizzaro D., Olivotto I., Carnevali C. 2010a. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction* 140: 953-959.
- Gioacchini G., Bizzaro D., Giorgini E., Ferraris P., Sabbatini S. y Carnevali O. 2010b. Oocytes maturation induction by *Lactobacillus rhamnosus* in *Danio rerio*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Human Reproduction*. 25: i205-i206.
- Gioacchini G., Giorgini E., Merrifield D.L., Hardiman G., Borini A., Vaccari L. 2012. Probiotics can induce follicle maturational competence: the *Danio rerio* case. *Biology of Reproduction* 86: 65-65.
- Gioacchini G., Giorgini E., Olivotto I., Maradonna F., Merrifield D.L. y Carnevali O. 2014. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. *Zebrafish* 11: 98-106.
- Giorgini E., Conti C., Ferraris P., Sabbatini S., Tos, G., Rubini C., Vaccari, L., Gioacchini G. y Carnevali O. 2010. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on zebrafish oocytes maturation: an FT-IR imaging and biochemical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 3063-3072.
- Girija V., Malaikozhundan B., Vaseeharan B., Vijayakumar S., Gobi N., Herrera, M.D. V., Chenc J.C. y Santhanam, P. 2018. *In vitro* antagonistic activity and the protective effect of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 in zebrafish challenged with GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2. *Microbial Pathogenesis* 114: 274-280.
- Gisbert E., Castillom M., Skalli A., Andree K.B. y Badiola I. 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science* 9: 2766-2774.
- Gołek P., Bednarski W., Brzozowski B., Dziuba B. 2009. The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology* 59: 119-126.
- Gomez-Gil B., Herrera-Vega M.A., Abreu-Grobois F.A. y Roque A. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2318-2322.
- González C.L., Enicinas J.P., Garcia Lopez M.L. y Otero A. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology* 17: 383-391.

Gram L., Melchiorson J., Spanggaard B., Huber I. y Nielsen T.F. 1999 Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 969–973.

Grzeškowiak L., Collado M.C. y Salminen S. 2012. Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens. *Aquaculture* 356-357: 412-414.

Guarner F. y Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 39: 237-238.

Gudiña E.J., Teixeira J.A. y Rodrigues L.R. 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 76: 298-304.

Gunasekara R.A.Y.S.A., Rekecki A., Cornillie P., Cornelissen M. y Sorgeloos P. 2011. Morphological characteristics of the digestive tract of gnotobiotic *Artemia franciscana* nauplii. *Aquaculture* 321: 1–7.

Hai N.V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119: 917-935.

Hammes W.P. y Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. En: *The prokaryotes*, Vol 4. Singapore: Springer. 3rd ed.

Harzevili A.S., Van Duffel H., Dhert P. H., Swings J. y Sorgeloos P. 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research* 29: 411-417.

Hassaan M.S., Soltan M. A., Jarmołowicz S. y Abdo H.S. 2018. Combined effects of dietary malic acid and *Bacillus subtilis* on growth, gut microbiota and blood parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition* 24: 83-93.

Hastings J.W. y Stiles M.E. 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *Journal of Applied Microbiology* 70: 127-134.

Heredia-castro P., Hernández-Mendoza A., González-Córdova A. y Vallejo-Cordoba B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia* 42.

Hiney M. y Olivier G. 1999. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). En: *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3. United Kingdom: CAB Intern., Publ.

Hjelm M., Bergh Ø., Riaza A., Nielsen J., Melchiorson J., Jensen S., Duncan H., Ahrens P., Birkbeck H., y Gram, L. 2004a. Selection and identification of

autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. Systematic and Applied Microbiology 27: 360-371.

Hjelm M., Riaza A., Formoso F., Melchiorsen J. y Gram L. 2004b. Seasonal incidence of autochthonous antagonistic *Roseobacter* spp. and Vibrionaceae strains in a turbot larva (*Scophthalmus maximus*) rearing system. Applied and Environmental Microbiology 70: 7288-7294.

Holzappel W., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Journal Clinical Nutrition 73: 365-375.

Hoseinifar, S. H., Khalili M., Rufchaei R., Raeisi M., Attar M., Cordero H. y Esteban M. Á. 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Fish & Shellfish Immunology 47: 706-711.

Huang L., Forsberg C.W., Gibbins L.N. 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermented products. Applied and Environmental Microbiology 51: 1230-1234.

Huber I., Spanggaard B., Appel K.F., Rossen L., Nielsen T. y Gram L. 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology 96:117-132.

Hugas M. 1998. Bacteriocinogenic Lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Science 49: 139-150.

Hummel A.S., Hertel C., Holzappel W.H. y Franz C.M. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 73: 730-739.

Ina-Salwany M.Y., H. Hishammuddin Z., Zulperi M., Salema M., Karim M. y Natrah F.M.I. 2015. Elucidating the Probiotic Potential of Malaysian *Paenibacillus pabuli* Against *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* Culture. Asian Journal of Agricultural Research 9: 223-236.

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

Irianto A. y Austin B. 2003. Use of Dead Probiotic Cells to Control Furunculosis in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases: 26 59-62.

Jensen H., Grimmer S., Naterstad K. Axelsson L. 2012. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 153: 216-222.

Jöborn A., Olsson J.C., Westerdahl A., Conway P.L. y Kjelleberg S. 1997. Colonisation in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. K1. Journal of Fish Diseases 20: 383-392.

Jöborn A., Dorsch M., Olsson J.C. Westerdahl A. y Kjelleberg S. 1999. *Carnobacterium inhibens* sp. nov. isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49: 1891-1898.

Johnson J.A.C. y Etzel M.R. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. Journal of Dairy Science 78: 761-768.

Jose N.M., Bunt C.R. y Hussain M.A. 2015. Implications of antibiotic resistance in probiotics. Food Reviews International 31: 52-62.

Kaiser A.L. y Montville T.J. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Applied and Environmental Microbiology 62: 4529-4535.

Kapetsky J.M., Aguilar-Manjarrez J. y Jenness J. 2013. A global assessment of potential for offshore mariculture development from a spatial perspective. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 549. Rome, FAO. 181 pp

Katayama T., Tanaka M., Moriizumi J., Nakamura T., Brouchkov A., Douglas T.A., Fukuda M., Tomita F. y Asano K. 2007. Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25 000 years. Applied and Environmental Microbiology 73: 2360-2363.

Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J., Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274: 1-14.

Kim W.S., Hall R.J. y Dunn N.W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology 50: 429-433.

Kim W.S., Khunajakr N. y Dunn N.W. 1998. Effect of Cold Shock on Protein Synthesis and on Cryotolerance of Cells Frozen for Long Periods in *Lactococcus lactis*. Cryobiology 37: 86-91.

- Kim D.H. y Austin B. 2006. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114: 297-304.
- Kim D.H. y Austin B. 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology* 47: 141-147.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S. y Chun J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716-721.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. 1995. Stages of embryonic-development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Klaenhammer T.R. y Kleeman E.G. 1981. Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 1461-1467.
- Klaenhammer T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12- 39-85.
- Kolkovski S., Curnow J. y King J. 2004. Intensive rearing system for fish larvae research II *Artemia* hatching and enriching system. *Aquacultural Engineering* 31: 309-317.
- Kong S. y Davison A. J. 1980. The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH, e<sup>-</sup> and O<sup>2-</sup> in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 204: 18-29.
- Kongnum K. y Hongpattarakere T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 170-177.
- Korhonen J. 2010. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. University of Eastern Finland.
- Kurath G. 2008. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique (Technical Office of Epizootics)* 27: 175-196.
- Lamari F., Sadok K., Bakhrouf A., Gatesoupe F.J. 2014. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia* nauplii. *Aquaculture International* 22: 699-709.

Lauzon H.L. 2010. Preventive measures in aquaculture isolation, application and effects of probiotics on Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing at early stages. Tesis doctoral. Universidad de Islandia. Islandia.

Lazado C.C., Caipang C.M.A. 2014. Atlantic cod in the dynamic probiotics research in aquaculture. *Aquaculture* 424: 53-62.

Lebeer S., Vanderleyde, J. y De Keersmaecker S.C. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 728-764.

Lebeer S., Vanderleyden J. y De Keersmaecker S.C. J. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8: 171-184.

Lee H.I., Kim M.H., Kim K.Y. y So J.S. 2010. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. Isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe* 16: 522-526.

Lee J.Y., Nguyen D.T., Park Y.S., Hwang K.Y., Cho Y.S., Kang K.D., Yoon J., Yu J., Yeed S.T., Ahne Y. H., Leeb g., Seonga S.I. y Paikd M.J. 2012. Organic acid profiling analysis in culture media of lactic acid bacteria by gas chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Letters* 3: 74–77.

Lee J.S., Chen, H., Damte D., Lee S.J., Kim J.C., Rhee, M.H., Suh J.S. y Park, S.C. 2013. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish & shellfish immunology* 34: 756-761.

Lee J.S., Damte D., Lee S.J., Hossain M.-A., Belew S., Kim J.-Y., Rhee M.-H., Kim J.J. y Park S.C. 2015. Evaluation and characterization of a novel probiotic *Lactobacillus pentosus* PL11 isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) for its use in aquaculture. *Aquaculture Nutrition* 21: 444-456.

Leisner J.J., Laursen B.G., Prévost H., Drider D. y Dalgaard, P. 2007. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 592-613.

Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R. D. Gordon, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11070-11075.

- Lin Y.H., Chen Y.S., Wu H.C., Pan S.F., Yu B., Chiang C.M., Chiu C.M. y Yanagida F. 2013. Screening and characterization of LAB-produced bacteriocin-like substances from the intestine of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) as potential biocontrol agents in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 114:299-307.
- Liu G., Lv Y., Li P., Zhou K., Zhang J. 2008. Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control* 19: 353-359.
- López Cazorla A., Sica M.G., Brugnoli L.I., Marucci P.L., Cubitto MA. 2015. Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology* 31: 88-94.
- Luo G., Huang L., Su Y., Qin Y., Xu X., Zhao, L., y Yan Q. 2016. flrA, flrB and flrC regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*. *Emerging Microbes & Infections* 5: e85.
- Mac Faddin J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V. y Clark D.P. 2009. Brock Biology of Microorganisms. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 12th ed.
- Mahdhi A., Hmila Z., Chaieb K., Kamoun F., Bakhrouf A. 2011a. Probiotic properties of halophilic *Bacillus* strains enhance protection of *Artemia* culture against pathogenic *Vibrio*. *Aquatic Biology* 13: 225-231.
- Mahdhi A., Kamoun F., y Bakhrouf A. 2011b. Inhibitory activity and adhesive ability of potential probiotic *Bacillus* species to confer protection for *Artemia* gnotobiotic culture against pathogenic *Vibrio* spp. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 35: 227-233.
- Mahdhi A., Esteban M.A., Hmila Z., Bekir K., Kamoun F., Bakhrouf A. y Krifi B. 2012. Survival and retention of the probiotic properties of *Bacillus* sp. strains under marine stress starvation conditions and their potential use as a probiotic in *Artemia* culture. *Research in Veterinary Science* 93:1151-1159.
- Makridis P., Fjellheim A. J., Skjermo J. y Vadstei, O. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 185: 207-218.

- Makridis P., Martins S., Tsalavouta, M., Catalao Dionisio L., Kotoulas G., Magoula, A. y Dinis M.T. 2005. Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. *Aquaculture Research* 36: 1619-1627.
- Maradonna F., Gioacchini G., Falcinelli S., Bertotto D., Radaelli G., Olivott, I., y Carnevali, O. 2013. Probiotic supplementation promotes calcification in *Danio rerio* larvae: a molecular study. *PloS one* 8: e83155.
- Marques A., Dhont J, Sorgeloos P., Bossier P. 2004. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically-grown brine shrimp *Artemia franciscana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 312:115-136.
- Marques A., Dinh T., Ioakeimidis, C., Huys G., Swings J., Verstraete W., Dhont P., Sorgeloos P. y Bossier P. 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4307-4317.
- Marques A., Thanh, T.H., Verstraete W., Dhont J., Sorgeloos P. y Bossier P. 2006. Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334: 20-30.
- Martínez Cruz P., Ibáñez A. L., Monroy Hermosillo O. A. y Ramírez Saad, H. C. 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology* 2012.
- Mathur M.D., Vidhani S., Mehndiratta P.L., Bhalla P. y Reddy B.S.N. 2003. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *Journal Association of Physicians of India* 51: 593-596.
- Mathur S. y Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology* 105: 281-295.
- Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D. y Andrade A.F.B. 1999. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology* 38: 37-42.
- Mazur P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949.
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- McDonald I.J., Reiter B., y Rogers P.L. 1973. Growth of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* in a chemostat. Production of cells and survival of bacteria during frozen storage. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 1285-1295.

- McGroarty J.A. 1993. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 6: 251-264.
- Menanteau-Ledouble S., Kumar G., Saleh M. y El-Matbouli M. 2016. *Aeromonas salmonicida*: updates on an old acquaintance. *Diseases of Aquatic Organisms* 120: 49-68.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davie, S.J., Baker R.T., Bøggwald J., Castex M. y Ringø E. 2010a. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302: 1-18.
- Merrifield D.L., Harper G.M., Dimitroglou A., Ring, E. y Davies S.J. 2010b. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*, 41: 1268-1272.
- Metivier A., Pilet M., Dousset X., Sorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard J.C., Marion D., Cenatiempo Y. y Fremaux C. 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology* 144: 2837-2844.
- Michel C., Faivre B. y Kerouault B. 1986. Biochemical identification of *Lactobacillus piscicola* strains from France and Belgium. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 27-30.
- Mogensen G., Salminen S., O'Brien J., Ouwehand A., Holzapfel, W., Shortt C., Fonden R., Miller G.D., Donohue D., Playne M., Crittenden R., Salvadori B., Zink R., 2002. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bulletin of IDF* 377: 10-19.
- Moldes A.B., Paradelo R., Vecino X., Cruz J.M. Gudiña E., Rodriguez L., Texeira J.A., Domínguez J.M. y Barral M.T. 2013. Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *BioMed Research International*.
- Montel Mendoza G.M., Pasteris S. E., Ale C.E., Otero M.C., Bühler M.I., y Nader-Macías M.E.F. 2012. Cultivable microbiota of *Lithobates catesbeianus* and advances in the selection of lactic acid bacteria as biological control agents in raniculture. *Research in Veterinary Science* 93: 1160-1167.
- Morales G. 2004. Crecimiento y eficiencia alimentaria de trucha arcoíris en jaulas bajo diferentes tipos de alimentación. Tesis de grado. Facultad de agronomía. UBA.

Moreno P., Molinari L., Hualde P., y Miyazaki T. (2016). First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. Bull Eur Ass Fish Pathol, 36: 59.

Moser S.A. y Savage D.C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli*. Applied and Environmental Microbiology 67: 3476-3480.

Muñoz-Atienza E., Araújo C., Magadán S., Hernández P. E., Herranz C., Santos Y. y Cintas. L. M. 2014. *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. Fish & Shellfish Immunology 41: 570-580.

Nandi A., Dan S.K., Banerjee G., Ghosh P., Ghosh K., Ringø E. y Ray A.K. 2017. Probiotic potential of autochthonous bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. Probiotics and Antimicrobial Proteins 9: 12-21.

NAS. 2010. The National Research Council of The National Academy of Sciences. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th ed.

Nayak S.K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & Shellfish immunology 29: 2-14.

NCCLS. 2000. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M2–A7, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 7th ed.

Neely M.N., Pfeifer J.D. y Caparo, M. 2002. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis. Infection and Immunity 70: 3904-3914.

Nelson M.C., Varney J. S., Welch T.J. y Graf, J. 2016. Draft genome sequence of *Lactococcus garvieae* strain PAQ102015-99, an outbreak strain isolated from a commercial trout farm in the Northwestern United States. Genome Announcements 4: e00781-16.

Nes I.F., Diep D.B., Håvarstein L.S., Brurberg M.B. Eijsink, V. y Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 113-128.

Newaj-Fyzul A., Al-Harbi A.H., y Austin B. 2014. Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture 431: 1-11.

- Nievas M.L., Commendatore M.G., Olivera N.L., Esteves J.L., y Bucala V. 2006. Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial community. *Bioresource technology* 97: 2280-2290.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A., Salminen S. y Bylund G. 2001a. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198: 229-236.
- Nikoskelainen S., Salminen S., Bylund G., y Ouwehand A.C. 2001b. Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2430-2435.
- Nikoskelainen S., Ouwehand A., Bylund G., Salminen S. y Lilius E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology* 15:443-452.
- Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegard C., Haugen H.S. y Kristiansen P.E. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10: 19-37.
- Norusis M.J. 1997. *SPSS advanced statistics 7.5*. SPSS, Chicago, IL.
- Novoa B. y Figueras A. 2012. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. En: *Current Topics in Innate Immunity II*. New York: Springer.
- Olivera N.L., Horiszny C., Riva Rossi C. 2012. Antimicrobial activity and biosurfactant production of bacteria isolated from fish intestinal tract. viii Congreso Samige 2012. Mar del plata.
- Orozco-Medina C., Maeda-Martínez A.M. y López-Cortés A. 2002. Effect of aerobic Grampositive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 213: 15-29.
- Ouwehand A., Vankerckhoven V., Goossens H., Huys G., Swings J., Vancanneyt M. y Lähteenmäki A. 2005. The safety of probiotics in foods in Europe and its legislation. *Probiotics in food safety and human health*. Boca Raton: CRC Press.
- Panné Huidobro S. 2016. Producción por Acuicultura en Argentina en el 2016. Dirección de Acuicultura. Dirección Nacional de Planificación Pesquera. Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Ministerio de Agroindustria.

- Pascual L.M., Daniele M.B., Ruiz F., Giordano W., Pájaro C., Barberis L. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54: 141-148.
- Pasteris S.E., Roig Babot G., Otero M.C., Bühler M.I., Nader-Macías M.E. 2009. Beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from a *Rana catesbeiana* hatchery. *Aquaculture Research* 40:1605-1615.
- Pasteris S.E., Guidoli MG., Otero M.C., Bühler M.I., Nader-Macías M.E. 2011. *In vitro* inhibition of *Citrobacter freundii*, a red-leg syndrome associated pathogen in raniculture, by indigenous *Lactococcus lactis* CRL 1584. *Veterinary Microbiology* 151:336-344.
- Patel S., Shukla R., y Goyal A. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods* 14: 549-561.
- Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O. Mauriello G. y Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science* 67: 309-317.
- Pérez Montoro B., Benomar N., Lavilla Lerma L., Castillo Gutiérrez S., Gálvez A. y Abriouel H. 2016. Fermented Aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. *Frontiers in Microbiology* 7:1583.
- Pérez-Sánchez T., Balcázar J.L., García Y., Halaihel N., Vendrell D., De Blas I., Merrifield D.L. y Ruiz-Zarzuela I. 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases* 34: 499-507.
- Pirarat N., Kobayashi T., Katagiri T., Maita M. y Endo M. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 339-347.
- Pirarat N., Pinpimai K., Endo M., Katagiri T., Ponpornpisit A., Chansue N. y Maita M. 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Research in Veterinary Science* 91: 92-97.
- Pressley M.E., Phelan P.E., Witten P.E., Mellon M.T. y Kim C.H. 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology* 29: 501-513.

Qin C., Zhang Z., Wang Y., Li S., Ran C., Hu J., Xie Y., Li W. y Zhou Z. 2017. EPSP of *L. casei* BL23 Protected against the Infection Caused by *Aeromonas veronii* via Enhancement of Immune Response in Zebrafish. *Frontiers in Microbiology* 8: 2406.

Ramos M.A., Weber B., Gonçalves J.F., Santos G.A., Rema P. y Ozório R.O.A. 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166: 302-307.

Ravi A.V., Musthafa K.S., Jegathammbal G., Kathiresan K. y Pandian S.K. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology* 45: 219-223.

Rawls J.F., Samuel B.S., Gordon J.I. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4596-4601.

Reed B. y Jennings M. 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio*. *Research Guidance on the housing and care of Zebrafish*. Southwater: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals.

Reid G. 2000. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal* 10: 415-419.

Rendueles O., Ferrières L, Frétaud M., Bégaud E., Herbomel P., Levraud J. P. y Ghigo J. M. 2012. A new zebrafish model of oro-intestinal pathogen colonization reveals a key role for adhesion in protection by probiotic bacteria. *PLoS pathogens* 8: e1002815.

Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S., Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.

Ribas L., y Piferrer F. 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Reviews in Aquaculture* 6: 209-240.

Rico-Mora R. y Voltolina D. 1995. Effects of bacterial isolates from *Skeletonema costatum* cultures on the survival of *Artemia franciscana* nauplii. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 203-204.

Rieu A., Aoudia N., Jégo G., Chluba J., Yousfi N., Briandet R., Deschamps J., Gasquet B., Monedero V., Garrido C. y Guzzo J. 2014. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cellular Microbiology* 16: 1836-1853.

- Ringø E. y Gatesoupe F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177-203.
- Ringø E. 2008. The ability of Carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of 350 fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research* 39: 171-180.
- Ringø E., Olsen R.E., Gifstad T.Ø., Dalmo R.A., Amlund H., HEMRE G.I. y Bakke A.M. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16: 117-136.
- Ringø E., Olsen R.E., Jensen I., Romero J., y Lauzon H.L. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 24: 1005-1032.
- Roberts C.F. 1959. A replica plating technique for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*). *Microbiology* 20: 540-548.
- Robertson P.A.W., O'Dowd C., Burrell, C., Williams P. y Austin B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243.
- Rolig A.S., Parthasarathy R., Burns A.R., Bohannon B.J., y Guillemin K. 2015. Individual members of the microbiota disproportionately modulate host innate immune responses. *Cell Host & Microbe* 18: 613-620.
- Romero J., Feijóo C.G., Navarrete P. 2012. Antibiotics in aquaculture use, abuse and alternatives. *Health and Environment in Aquaculture*. InTech.
- Ross A.C. y Vederas J.C. 2011. Fundamental functionality: recent developments in understanding the structure- activity relationships of lantibiotic peptides. *The Journal of Antibiotics* 64: 27-34.
- Rowe H.M., Withey, J.H. y Neely M.N. 2014. Zebrafish as a model for zoonotic aquatic pathogens. *Developmental y Comparative Immunology* 46: 96-107.
- Rurangwa E., Sipkema D., Kals J., ter Veld M., Forlenza M., Bacanu G.M. y Palstra A.P. 2015. Impact of a novel protein meal on the gastrointestinal microbiota and the host transcriptome of larval zebrafish *Danio rerio*. *Frontiers in Physiology* 6: 133.
- Russo P., Iturria I., Mohedano M.L., Caggianiello G., Rainieri S., Fiocco D., Pardo, M.A., López P. y Spano G. 2015. Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 3479-3490.

Sahoo T.K., Jena P. K., Patel A.K. y Seshadri S. 2016. Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review. *Aquaculture Research* 47: 1013-1027.

Salazar B.C., y Montoya O.I. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *Vitae* 10:2.

Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta A., Meseguer J. y Esteban M.Á. 2008. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 25: 114-123.

Salminen S., Isolouri E. y Salminen E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains for future challenge. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 347-358.

Sanz Y., Santacruz A. y Gauffin P. 2010. Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proceedings of the Nutrition Society* 69: 434-441.

Schrezenmeir J. y de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 361-364.

Seale J.V.; Millar M. 2013. Probiotics: A new frontier for infection control. *Journal of Hospital Infection* 84: 1-4.

SENASA. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/animales-acuaticos/produccion-primaria/sanidad-animal>.

Sequeiros C., Vallejos M., Marguet E.R., Olivera N.L. 2010. Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Archives of Microbiology* 192: 237-245.

Sequeiros C., Garcés M.E., Vallejo M., Marguet E.R., Olivera N.L. 2015 Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Archives of Microbiology* 197:449-458.

Sequeiros C., Garcés M., Fernández M., Martínez Díaz S., Libkind D., Olivera N. 2016. Microorganisms from Patagonian Aquatic Environments for Use in Aquaculture. En: *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Editores: Nelda Lila Olivera, Diego Libkind y Edgardo Donati. Editorial Springer International Publishing AG

- Sha Y., Wang L., Liu M., Jiang K., Xin F., Wang B. 2016. Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 452: 28-36.
- Shahid M., Hussain B., Riaz D., Khurshid M., Ismail M., y Tariq M. 2016. Identification and partial characterization of potential probiotic lactic acid bacteria in freshwater *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. *Aquaculture Research* 48: 1688-1698.
- Sica M.G., Olivera N.L., Brugnoli L.I., Marucci P.L., López Cazorla A.C. y Cubitto M.A. 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45:389-397.
- Sica M.G., Brugnoli L.I., Marucci P.L., Cubitto M.A. 2012. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 869-879.
- Sica M. G. 2013. Bacterias lácticas del estuario de Bahía Blanca: evaluación de sus propiedades probióticas para su potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. Argentina.
- Siciliano R.A., Cacace G., Mazzeo M.F., Morelli L., Elli M., Rossi M. y Malorni A. 2008. Proteomic investigation of the aggregation phenomenon in *Lactobacillus crispatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1784: 335-342.
- Sieuwerts S., Molenaar D., van Hijum S.A., Beerthuyzen M., Stevens M.J., Janssen P. W., Ingham C.J., Bok F.A.M., de vos W.M. y van Hylckama Vlieg, J.E. 2010. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 7775-7784.
- Sokol H., Pigneur B., Watterlot L., Lakhdar, O., Bermúdez-Humarán L.G., Gratadoux J.J., Blugeon S., Bridonneau C., Furet J.P., Corthier G., Grangette N.V., Porchart P., Trugnan G., Thomas G., Blottiere H.M., Doré J., Marteau P., Seksik P. y Langella P. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 16731-16736.
- Song Z.F., Wu T.X., Cai L.S., Zhang L.J. y Zheng X.D. 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *Journal of Zhejiang University Science B* 7: 596-602.

Sorgeloos P., Lavens P., Leger P., Tackaer, W. y Versichele D. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *Artemia Reference Center*. Faculty of Agriculture. State University of Ghent. Belgium.

Sorgeloos P., Dhert P. y Candreva P. 2001 Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147-159.

Sorongon M.I., Bloodgood R.A. y Burchardl R.P. 1991. Hydrophobicity, adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3193-3199.

Sorroza L. 2012. Propuesta de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España.

Sorroza L., Padilla, D., Acosta F., Román L., Grasso V., Vega J. y Real, F. 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology* 155: 369-373.

Sorum H. y L´Abee-Lund T.M. 2002. Antibiotic resistance in food-related bacteria. A result of interfering with the global web of bacterial genetics. *International Journal of Food Microbiology* 78: 43-56.

Sotomayor M.A., Balcázar J.L. 2003. Inhibition of shrimp pathogenic *vibrios* by mixture of probiotic strain. *Revista Aquatic* 19: 9-15.

Spanggaard B., Huber I., Nielsen J., Sick, E.B., Pipper C.B., Martinussen, T., Slierendrecht W.J. y Gram L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3: 755-765.

Starliper C.E., Shotts E y Brown J. 1992. Isolation of *Carnobacterium piscicola* and unidentified Gram-positive bacillus from sexually mature and post-spawning rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 13:181-187.

Stephens W.Z., Wiles T.J., Martinez E.S., Jemielita M., Burns A.R., Parthasarathy R., Bohannan B.J.M. y Guillemin K. 2015. Identification of population bottlenecks and colonization factors during assembly of bacterial communities within the zebrafish intestine. *MBio* 6: e01163-15.

Stiles M., McMullen L. y Smith D. 2007. Lactic Acid Bacteria for the Treatment of Food. U.S. Patent Application No 11/931,061, 31 Oct. 2007.

Suárez J.E. 2013. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutrición Hospitalaria* 28: 38-41.

- Succi M., Tremonte P., Reale A., Sorrentino E. y Coppola R. 2007. Preservation by freezing of potentially probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus*. *Annals of Microbiology* 57: 537-544.
- Sullivan C., Kim C.H. 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 341-350.
- Swain S.M., Singh C. y Arul V. 2009. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against Vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 697-703.
- Tagg J.R., Dajani A.S. y Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40: 722-756.
- Tahiri I., Desbiens M., Benech R., Kheadr E., Lacroix C., Thibault S., Ouelletb D. y Fliss, I. 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology* 97: 123-136.
- Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T. y Mierau I. 1999. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science* 82: 2530-2535.
- Tanghe A., Van Dijck P. y Thevelein J.M. 2003. Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications. *Advances in applied Microbiology* 53: 129-176.
- Teuber M., Meile L. y Schwarz F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:115-137.
- Thankappan B., Ramesh D., Ramkumar S., Natarajaseenivasan K., y Anbarasu K. 2015. Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita* towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175: 340-353.
- Thimon L., Peypoux F., Wallach J. y Michel G. 1995. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters* 128:101-106.
- Thompson F. y Austin B. 2006. *The biology of vibrios*. Washington: ASM Press.
- Tobback E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F. y Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 30: 257-268.

- Tomas M.S.J., Ocana M.E. y Nader-Macias M.E. 2004. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe* 10: 1-5.
- Toranzo A.E., Novoa B., Baya A.M., Hetrick F.M., Barja J.L. y Figueras A. 1993. Histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), experimentally infected with *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Fish Diseases* 16: 261-267.
- Toranzo A.E., Magariños B. y Romalde J.L. 2005 A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37-61.
- Toranzo A.E., Romalde J.L., Magariños B. y Barja J.L. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Mediterraneennes* 86: 155-176.
- Tripathi M.K. y Giri S.K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9: 225-241.
- Tulini F.L., Lohans C.T., Bordon K.C., Zheng J., Arantes E.C., Vederas J.C. y De Martinis E.C. 2014. Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2: Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2. *International Journal of Food Microbiology* 173: 81-88.
- Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolaur, E. y Salminen S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 393-398.
- Ulloa P.E., Iturra P., Neira R. y Araneda C. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21: 649-666.
- Ulloa P.E., Pena A.A., Lizama C.D., Araneda C., Iturra P., Neira R., y Medrano J.F. 2013. Growth response and expression of muscle growth-related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein-based diets. *Zebrafish* 10: 99-109
- Ulloa P.E., Medrano J.F. y Feijoo C.G. 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics* 5: 313.
- Underwood W., Anthony R., Gwaltney-Brant S., Poison A. S.P.C.A. y Meyer, R. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals. Schaumburg: American Veterinary Medical Association.
- UniProt Consortium. 2016. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research* 45: 158-169.

- Van Hai N., Buller N., y Fotedar R. 2010. Encapsulation capacity of *Artemia* nauplii with customized probiotics for use in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture Research* 41: 893-903.
- van Pijkeren, J.P., Canchaya, C., Ryan, K.A., Li, Y., Claesson, M.J., Sheil, B., Steidler L., O'Mahony L., Fitzgerald G.D., van Sinderen D. y O'Toole P. W. 2006. Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4143-4153.
- Vásquez S.M., Suárez H., y Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de Nutrición* 36: 64-71.
- Vázquez J.A., Gonzalez M.P. y Murado M.A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149-161.
- Vázquez-Silva G., Castro-Mejía J.J., Sánchez de la Concha B., González-Vázquez R., Mayorga-Reyes L. y Azaola-Espinosa A. 2016. Bioencapsulation of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus johnsonii* in *Artemia franciscana* as feed for charal (*Chirostoma jordanii*) LARVAE. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15:3.
- Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., de Blas I., Gironés O., Múzquiz J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 29: 177-198.
- Vendrell D., Balcazar J.L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Girones O. y Muzquiz J.L. 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31: 337-345.
- Verschuere L., Rombaut G., Huys G., Dhont J., Sorgeloos P. y Verstraete W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2527-2533.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P. y Verstraete W. 2000a. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64: 655-671.
- Verschuere L., Heang H., Criel G., Sorgeloos P. y Verstraete W. 2000b. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1139-1146.

- Vílchez M.C., Santangeli S., Maradonna F., Gioacchini G., Verdenelli C., Gallego V., Peñaranda D.S., Tveiten H., Pérez L., Carneval O. y Asturiano J.F. 2015. Effect of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* on the Expression of Genes Involved in European Eel Spermatogenesis. *Theriogenology* 84: 1321-1331.
- Villamil L., Figueras A., Plana, M. y Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219: 43-56.
- Vinderola C.G. y Reinhermer J A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36: 895-904.
- Vine N.G., Leukes W.D. y Kaiserln H. 2004. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters* 231: 145-152.
- Vine N.G., Leukes W.D. y Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 404-427.
- Vizoso-Pinto M.G., Franz C.M.A.P., Schillinger U. y Holzapfel W.H. 2006 *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology* 109: 205-214.
- Walker V.K., Palmer G.R. y Voordouw G. 2006. Freeze – thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1784-1792.
- Wang Y.B., Xu Z.R. y Xia M.S. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds. *Fisheries Science* 71: 1034-1039.
- Wang A.R., Ran C., Ringø E. y Zhou, Z.G. 2017. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*.
- Weinbauer M.G., Bettarel Y., Cattaneo R., Luef B., Maier C., Motegi C., Peduzzi P. y Mari, X. 2009. Viral ecology of organic and inorganic particles in aquatic systems: avenues for further research. *Aquatic Microbial Ecology: International Journal* 57: 321.
- Westerdahl A., Olsson J., Kjelleberg S. y Cownway P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2223-2228.

- Westerfield M. 2000. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press.
- Wiklund T. y Dalsgaard I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 32: 49-69.
- Woo P.K. y Bruno D.W. 2011. Fish diseases and disorders. Massachusetts: CAB International. 2nd ed.
- Yanbo W. y Zirong X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology* 127: 283-292.
- Zamora-Rodríguez L. M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Universitat de Girona. España.
- Zhang Q., Dong X., Chen B., Zhang Y., Zu Y. y Li W. 2016. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human. *Developmental y Comparative Immunology* 55: 159-168.
- Zheng C.N. y Wang W. 2017. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research* 48: 2767-2777.
- Zhou X., Tian Z., Wang Y. y Li, W. 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 501-509.
- Zhou Z., Wang W., Liu W., Gatlin III D. M., Zhang Y., Yao B. y Ringø E. 2012. Identification of highly-adhesive gut *Lactobacillus* strains in zebrafish (*Danio rerio*) by partial rpoB gene sequence analysis. *Aquaculture* 370: 150-157.
- Zorriehzahra M.J., Delshad S.T., Adel M., Tiwari R., Karthik K., Dhama K. y Lazado C. C. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly* 36: 228-241.
- Zorriehzahra M.J., Adel M. y Torabi Delshad S. 2017. Enteric redmouth disease: Past, present and future: A review. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16: 1135-1156.

## **ANEXO**

# **Optimización de la cría y mantenimiento del pez cebra**

## 1-Introducción

En el marco del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral se desarrolló, diseñó y optimizó un bioterio de pez cebra en las instalaciones del acuario experimental del CCT CONICET CENPAT. Hasta momento dicho acuario no contaba con este modelo experimental. Se destaca este desarrollo por el tiempo demandado durante la ejecución de la Tesis y por el avance que implicó para la Institución contar con este bioterio experimental. Actualmente el bioterio se encuentra a cargo de nuestro grupo de investigación.

El pez cebra es un modelo animal bien establecido para una amplia gama de áreas de investigación como la biomedicina, el comportamiento animal, la fisiología y la toxicología (Roush, 1996; Lawrence, 2007). En los últimos años, el uso de este pez como modelo para mejorar diferentes aspectos del proceso de producción en acuicultura se ha convertido en un valioso campo de investigación (Ulloa et al., 2011). En particular, se han llevado a cabo investigaciones orientadas a mejorar la supervivencia, la reproducción, la respuesta inmune, la nutrición y el crecimiento, y se espera que estos resultados sean aplicables a peces comerciales (Caruffo et al., 2015; Oyarbide et al., 2012; Ulloa et al., 2014).

El pez cebra es un pez teleósteo (con esqueleto osificado) y pertenece a la familia de los ciprínidos, cuyo hábitat natural se encuentra en India, Pakistán y Bhután (Van der Sar et al., 2004). Estas regiones poseen climas que pueden provocar cambios tanto en las condiciones físico-químicas como en la disponibilidad de recursos en el agua, por lo que este pez está adaptado a sobrevivir en ambientes variables en los cuales la salinidad, el pH o temperatura no son estables (Lawrence, 2007). Estas características podrían

explicar su amplio rango de tolerancia ante distintos factores y la posibilidad de mantenerlo en cautiverio (Harper y Lawrence, 2011).

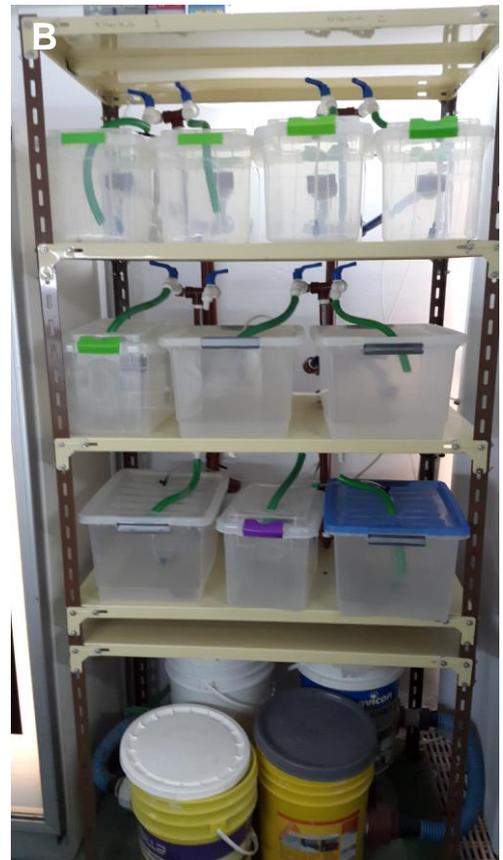
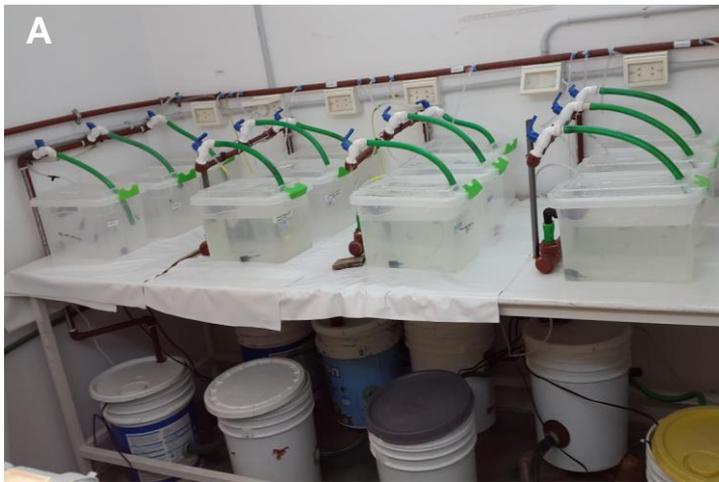
El pez cebra suele medir menos de 5 cm de longitud (De Tolla et al., 1995). Las hembras se pueden distinguir de los machos con bastante fiabilidad por su apariencia. Las hembras reproductivamente maduras tienen un abdomen más prominente debido a los huevos en desarrollo en los ovarios. Los machos son generalmente más delgados (Ruhl et al., 2009; Schilling, 2002).

## **2-Diseño y construcción de los sistemas de recirculación**

El diseño y construcción del bioterio del pez cebra (*Danio rerio*) fue realizado con el asesoramiento y colaboración del Técnico acuarista Mariano Moris, Director Técnico del acuario experimental del CCT CONICET –CENPAT.

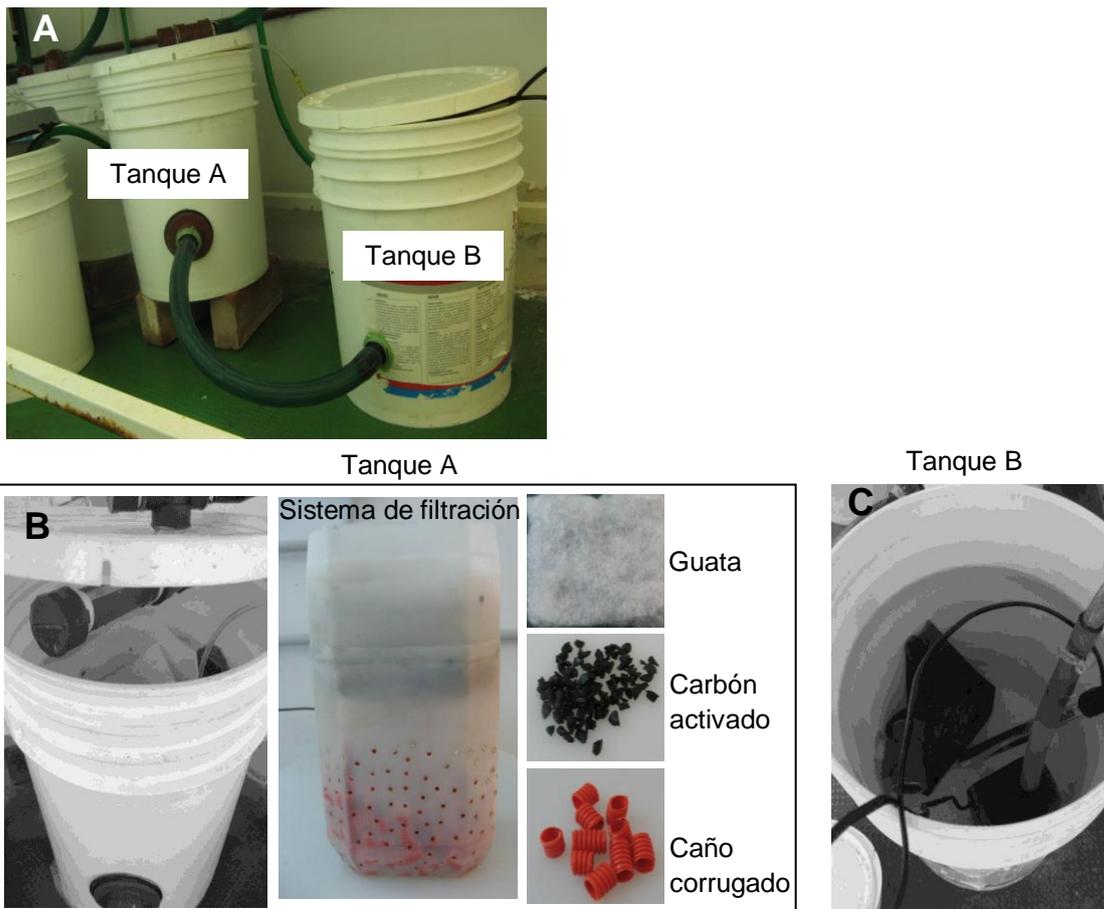
Para el mantenimiento y cría del pez cebra se diseñaron 6 sistemas independientes con recirculación de agua, con tres tanques-pecera cada uno, un tanque con el sistema de filtración (filtro mecánico/biológico, tanque A) y un tanque decantador (tanque B) con una bomba de agua, calefactor y anillos cerámicos (Fig. A1). Cuatro sistemas fueron usados para realizar las experiencias (Fig. A1 A) y dos sistemas para mantener los reproductores (Fig. A1 B). La temperatura requerida por el pez cebra fue de  $28,0 \pm 0,5$  °C (Lawrence, 2007), y se mantuvo estable por medio de un calefactor colocado en el tanque B de cada sistema. El ciclo de claridad oscuridad de la sala se mantuvo con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, requerido por el pez cebra (Lawrence, 2007).

Los tanques-pecera fueron recipientes de plástico transparente, para permitir la entrada de luz y una fácil observación y monitoreo de los peces. Estos recipientes fueron adquiridos con tapa para evitar pérdida de calor en el sistema de recirculación y, también por seguridad ya que el pez cebra puede saltar (Fig. A1). Sobre las tapas se hicieron 2 orificios, uno para la entrada de una manguera que proveyó el aire y el otro para el ingreso del agua. A cada recipiente se le hizo un orificio de salida de agua (por rebalse) sobre un lateral en la parte superior del recipiente (Fig. A1 C). La capacidad de cada tanque fue de 7 litros, con una profundidad adecuada ya que, si bien los peces cebra a menudo se describen como peces de vida superficial, estudios de campo muestran que ocupan la totalidad de la columna de agua (Spence et al., 2006).



**Figura A1:** Sistemas independientes con recirculación de agua, con tres tanques-pecera cada uno, un tanque con el sistema de filtros y un tanque decantador cada uno; (A) sistemas de experimentación; (B) sistemas para reproductores; (C) tanques-pecera y cañería de recirculación.

El sistema de recirculación de agua fue construido con caños de polipropileno. Un caño recolectó el agua de rebalse proveniente de los tres tanques-pecera (Fig. A1 C) y la dirigió hacia el tanque del filtro mecánico/biológico (tanque A). La entrada de agua al tanque A se realizó con un caño de polipropileno multi-perforado para que ésta cayera sobre el sistema de filtros (mecánico y biológico) en forma de lluvia (Fig. A2 A y B). El sistema de filtración del agua fue colocado en el tanque A (Fig. A2 B) y estuvo compuesto por 3 recipientes apilados uno encima del otro con la base perforada, que contenían (i) recipiente superior, guata como filtro mecánico para retener el material sólido en suspensión; (ii) recipiente del medio, carbón activado con capacidad de adsorber moléculas orgánicas y sustancias coloidales presentes en el agua, con el fin de purificar y decolorar el agua y (iii) recipiente inferior de mayor capacidad y con perforaciones en todas las paredes y base, con trozos de caño corrugado de aproximadamente 2 cm de largo, para aumentar la superficie de contacto y permitir el establecimiento de las bacterias nitrificantes (filtro biológico, Fig. A2 B) (Merino y Sal, 2007). Posteriormente, el agua pasó al tanque B (decantador) el cual contenía anillos cerámicos como complemento del filtro biológico, un calefactor (300 watts) para mantener la temperatura del agua y una bomba de agua (3.000 l/h) para elevar y transportar el agua hacia las peceras (Fig. A2 A y C).



**Figura A2:** Tanques del sistema de recirculación y sus componentes; (A) Tanques A y B y sus conexiones, (B) Tanque A, con sistema de filtro mecánico/biológico; (C) Tanque B (decantador) con bomba, calefactor y anillos cerámicos.

### 3-Adquisición de los peces cebra

Los peces cebra fueron comprados en tres negocios de acuarismo. Dos de ellos de la ciudad de Puerto Madryn, vivero y acuario “El amanecer” y en

el acuario "Discus". Otra camada de reproductores fue adquirido en un acuario de la ciudad de Mar del Plata, acuario "Océano".

#### **4-Optimización de los sistemas de recirculación**

##### **4.1-Calidad del agua, parámetros físicos y químicos**

Una buena calidad de agua es fundamental para el bienestar de los peces en cautiverio y puede lograrse mediante un buen sistema de filtración del agua, filtro mecánico como biológico, sumado a los protocolos de limpieza, al manteniendo del biofiltro y la renovación adecuada de agua (Reed y Jennings, 2011; Merino y Sal, 2007). En nuestro caso, el agua utilizada para los sistemas de recirculación se obtuvo de la red, se filtró (1 micrón), se trató con luz ultravioleta (UV) (Reed y Jennings, 2011) y luego se eliminó el cloro. El agua así obtenida, se almacenó en un tanque de 100 litros con aireación y un calefactor, para conservarla en las mismas condiciones que la de los sistemas (filtrada, tratada con UV, sin cloro, aireada y a 28 °C) y disponer de ella para los recambios periódicos.

##### ***Temperatura del agua***

El pez cebra se clasifica como euritérmico, lo que significa que puede tolerar un amplio rango de temperatura. En su hábitat natural, se ha observado que el pez cebra sobrevive a temperaturas tan bajas como 6 °C en invierno a más de 38 °C en verano (Spence et al., 2008). Una temperatura del agua de 28,5 °C es ampliamente citada como la temperatura óptima para la cría del pez cebra y su reproducción exitosa (Westerfield, 2000; Reed y Jennings, 2011; Lawrence y Mason, 2012).

## ***pH***

Los estudios de campo han observado que el pez cebra está presente en aguas entre 5,9 y 8,1 (Engeszer et al., 2007). En la mayoría de las instalaciones de laboratorio mantienen el pH en un valor próximo a 7,0 (Lawrence, 2007).

## ***Oxígeno disuelto***

Los peces tropicales de tamaño pequeño, como el pez cebra, suelen tener altas tasas de metabolismo por lo cual consumen más oxígeno por unidad de peso que los peces más grandes (Helfman et al., 1997). Este hecho, junto con la temperatura de mantenimiento relativamente alta, la densidad de población y los niveles de entrada de alimento que son típicos de las instalaciones intensivas de pez cebra requieren que los niveles de oxígeno disuelto se mantengan en aproximadamente 7 mg/l a 28 °C para asegurar la salud del pez (Lawrence, 2007).

## ***Compuestos nitrogenados***

En peces de agua dulce, el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se excreta a través del epitelio branquial por difusión pasiva, y en menor medida, en las heces (Lawrence, 2007). También es producido durante la descomposición de la materia orgánica. Niveles de  $\text{NH}_3$  en exceso son tóxicos para la mayoría de los animales acuáticos y, por lo tanto, no tiene que exceder los 0,02 mg/l y debe ser eliminado (Lawrence, 2007). En sistemas de recirculación, esto se logra mediante el proceso de nitrificación mediado por bacterias presentes en el filtro biológico que oxidan amoníaco/amonio a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y luego a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Lawrence, 2007). El nitrito, producto intermedio de esta conversión, también es tóxico para los peces y puede ser problemático debido a que se absorbe a través de las branquias e interfiere con la capacidad de los peces para

absorber oxígeno y puede causar la muerte, por lo que debe ser inferior a 1 mg/l (Lawrence, 2007). El nitrato generalmente no es tóxico para los peces, pero una exposición prolongada a concentraciones mayores a 200 mg/l puede causar problemas (Lawrence, 2007).

En la tabla A1 se muestra el rango y los valores medios de los parámetros de temperatura, pH, oxígeno disuelto y compuestos nitrogenados utilizados en la mayoría de las instalaciones del pez cebra para su cría y mantenimiento (Lawrence, 2007; Reed y Jennings, 2011, Lawrence y Mason, 2012).

<b>Parámetro</b>	<b>Valor o rango recomendado</b>	<b>Método de testeo</b>
Temperatura	28,5 °C (24-30 °C)	Termómetro
pH	6,8-8,5	Kit colorimétrico, electrodo de vidrio
Oxígeno disuelto	> 4 mg/l, óptimo 7 mg/l	Kit colorimétrico, oxímetro
NH <sub>3</sub> (amoníaco)	< 0,02 mg/l	Kit colorimétrico comercial
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nitrito)	< 1 mg/l	Kit colorimétrico comercial
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (nitrato)	< 200 mg/l	Kit colorimétrico comercial

**Tabla A1:** Parámetros de calidad de agua recomendados para la cría del pez cebra

Durante el proceso de optimización de los sistemas de recirculación se logró mantener estable una temperatura de  $28 \pm 0,5$  °C, la cual fue medida

diariamente con termómetro. El pH del agua se mantuvo entre 7 y 7,5, y para su medición se utilizó un electrodo de vidrio. Se logró obtener un buen sistema de aireación en cada tanque-pecera, como en los tanques del filtro mecánico/biológico y decantador. Los niveles de oxígeno se mantuvieron en aproximadamente 8 mg/l, el cual fue medido con un oxímetro. Para mantener los compuestos nitrogenados en niveles aceptables, sin tener que realizar recambio de agua diarios, fue necesaria la optimización de los filtros biológicos como se describe a continuación.

#### **4.2-Optimización de los filtros biológicos**

En todo sistema de recirculación de agua uno de los procesos más importantes es el que se desarrolla en el filtro biológico, denominado nitrificación. Este proceso involucra bacterias especializadas que transforman del nitrógeno excretado al medio por los organismos cultivados en forma de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), el cual es tóxico para los peces, a otro compuesto relativamente inofensivo como el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Candarle, 2014).

El nitrógeno amoniacal en el agua de cultivo, se compone de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y amonio ionizado ( $\text{NH}_4^+$ ), ambos se encuentran en equilibrio y dependen de la temperatura y pH del agua. Durante la nitrificación, en una primera etapa los compuestos de amonio ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) son paulatinamente convertidos por oxidación a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por acción de bacterias quimioautótrofas como las *Nitrosomonas*, que emplean como sustrato compuestos inorgánicos reducidos para obtener energía, utilizando oxígeno molecular (Candarle, 2014). En una segunda etapa, los nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) formados se oxidan a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por medio de bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrocystis* (Lawson, 1995).

Todas estas bacterias nitrificantes son estrictamente aeróbicas, ya que el proceso, es básicamente una oxidación (Candarle, 2014).

Para lograr que el proceso de nitrificación funcione correctamente fue necesario que se establezca la población de bacterias nitrificantes en el filtro biológico. Estas bacterias que normalmente están presentes en el agua y ambiente, frente a la presencia de estos compuestos inorgánicos y a las condiciones adecuadas de oxígeno y temperatura comienzan a colonizar los filtros y reproducirse (Candarle, 2014). Este proceso de colonización se denomina maduración del biofiltro, es lento debido al lento crecimiento de las bacterias nitrificantes y puede durar hasta dos meses (Candarle, 2014). Durante este proceso deben ser monitoreados los niveles de nitrógeno en todos sus compuestos, nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), para poder evaluar el estado del proceso de maduración.

Para optimizar este proceso en nuestros sistemas, se colocaron algunos peces cebra en los tanques-pecera y diariamente se registraron los valores de los compuestos nitrogenados en el agua. La medición de los compuestos nitrogenados se realizó empleando kits comerciales (SERA, Alemania).

Durante los primeros 10 días se detectó un aumento en la concentración de compuestos amoniacales ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ) con un valor de 0,5 mg/l (mínima concentración detectada por el Kit Amonio marca SERA). En cambio, los valores de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) fueron 0 mg/l, en el mismo período. Los valores de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  se redujeron con recambios de agua cada vez.

Luego de aproximadamente 13 días, disminuyeron los compuestos amoniacales y comenzó a detectarse nitrito (0,5 mg/l, mínima concentración detectada por el Kit Nitrito marca SERA) y nitrato (10 mg/l, mínima concentración detectada por el Kit Nitrato marca SERA) en el agua de los

sistemas. Esto indicó que comenzó la oxidación de los compuestos de amoniacales a nitrito, que a su vez estimuló la oxidación de éstos y la aparición de nitratos, solapadamente. Los compuestos amoniacales no se detectaron más a partir de los 13-14 días. Los nitritos comenzaron a descender a partir de los 20 días, a la vez que se elevaron sostenidamente los valores de nitrato. A partir de los 25 días aproximadamente se completó la colonización de los filtros biológicos y la maduración de los mismos. A partir de ese momento se registraron solo aumentos en los valores de nitrato, indicando que el amonio se transformó activamente a nitrato. El aumento de los valores de nitrato cercanos a 25 mg/l se registraron aproximadamente cada 7-9 días, los cuales se redujeron mediante recambio de agua.

#### **4.3-Limpieza**

La limpieza de los acuarios y los filtros es una práctica muy importante para el bienestar de los peces y, sobre todo, para mantener la calidad del agua (Brand et al., 2002). La limpieza diaria consistió en el sifoneo de las heces y residuos del fondo, así como también la limpieza con esponja de las paredes y fondo. Durante los recambios de agua los peces fueron mantenidos en los tanques-pecera con un nivel de agua mínimo, y luego se procedió al llenado de los mismos.

Los tanques del filtro mecánico/biológico y decantador se limpiaron cuando se requirió recambios de agua. La guata y el carbón activado de los filtros se cambiaron cada 15 días y una vez al mes, respectivamente. Para preservar las comunidades bacterianas presentes en los filtros biológicos éstos solo se enjuagaron muy rápidamente una vez al mes.

## **5-Alimentación**

La alimentación del pez cebra depende del estadio en que se encuentra. Los peces juveniles y adultos se alimentaron, fuera de los ensayos de experimentación, con alimento comercial en una proporción de 4 % del peso corporal (TetraMin) y con nauplios de *Artemia* spp. (obtenidos como se detalló en la sección 6- sin esterilidad) en una proporción de nauplios diluida 1:3 cada 8 peces adultos (Westerfield, 2000). Durante los ensayos con probióticos solo se alimentaron con alimento comercial.

En todos los casos los peces fueron alimentados dos veces al día. Al momento de alimentar los peces se cortó la recirculación de agua y el suministro de oxígeno para facilitar el acceso al alimento y una vez desaparecido el alimento se volvió a conectar el suministro de aire y agua. El tiempo de alimentación se utilizó como una oportunidad para observar la salud y el comportamiento de los animales.

Las larvas recién eclosionadas de los peces cebra no se alimentan hasta el día 5 dpf; a partir de éste día comienzan a comer paramecios (Westerfield, 2000). Luego del día 9 dpf las larvas son alimentadas con *Artemia* spp. recién eclosionada (Westerfield, 2000).

### ***Cultivo de paramecios***

Los paramecios utilizados para alimentar las larvas durante los días 5 a 9 dpf se aislaron de las guatas de los filtros mecánicos. Estos filtros normalmente se encuentran habitados por protozoarios que degradan la materia orgánica retenida. La guata se escurrió sobre una placa de Petri y bajo la lupa se seleccionaron paramecios que se colocaron en un tubo con agua

destilada limpia. El medio de cultivo para los paramecios consistió en 10 granos de trigo hervido y 0,3 g de levadura por cada 175 ml de agua destilada (Westerfield, 2000). A esta preparación se le agregaron los paramecios, y se incubó con luz y aireación durante una semana a temperatura ambiente. El cultivo de paramecios se monitoreó diariamente bajo la lupa. Luego de aproximadamente una semana el cultivo alcanzó su máxima concentración. Para cosechar los paramecios, el cultivo se colocó en un matraz de cuello largo tapado con una bolsa negra y papel aluminio salvo el cuello del matr az. Se colocó un tapón de goma espuma en la parte inferior del cuello, dejando todo el cuello del matraz con agua limpia y bien iluminada. Se dejó reposar toda la noche y al día siguiente, como los paramecios tienen fototropismo positivo, éstos atravesaron la goma espuma y se recuperaron del agua presente en el cuello de matr az. Los paramecios se cosecharon mediante una pipeta de vidrio. Estos paramecios se usaron para escalar el cultivo hasta obtener 5 litros o más, necesarios para alimentar miles de larvas de pez cebrá. La concentración de paramecios se determinó utilizando una cámara de recuento celular de Neubauer con una gota de lugol para inmovilizarlos.

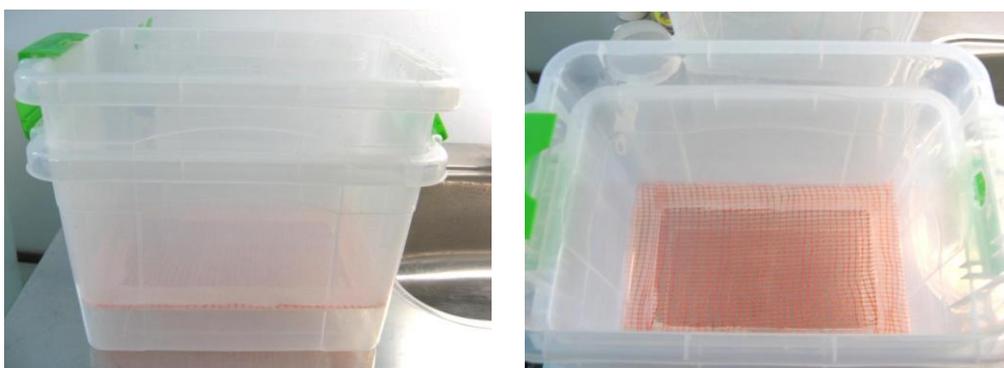
## **6-Optimización de la reproducción del pez cebrá**

Los peces cebrá hembras pueden tener alrededor de 200 huevos en cada puesta. Esto depende del estado de los peces, que a su vez depende de la alimentación durante los días previos y de la calidad del agua (Westerfield, 2000).

Para realizar la cruzó se seleccionaron machos provenientes de un proveedor y hembras de otro. Las hembras seleccionadas fueron aquellas que presentaron el abdomen más ancho, ya que esto indica que estuvieron bien

alimentadas y provistas de huevos. En el caso de los machos, se seleccionaron los más grandes y de buena apariencia. Los machos y hembras seleccionados se alimentaron con *Artemia* dos días previos a la cruce, y la noche anterior se colocaron en una paridera (Fig. A3) con agua de calidad óptima a 28,5 °C.

La paridera fue construída con 2 tanques-pecera de plástico de 7 l cada uno (igual al de los sistemas). Uno de los recipientes fue desprovisto de su base, la cual fue reemplazada por una red, para que pasen los huevos, pero no los peces, y se colocó dentro del otro recipiente conteniendo agua de calidad óptima, con aireación y a 28,5 °C, que se mantuvo con un calefactor. De esta forma, el fondo de la paridera quedó dividido para que los huevos pasen al fondo del recipiente y no sean comidos por sus progenitores, y facilitar su posterior recolección. Se colocaron 8 hembras y 4 machos.



**Figura A3:** Paridera utilizada para realizar las cruces y posterior recolección de los huevos.

Al día siguiente, por la mañana, los huevos fueron recolectarlos con un colador y enjuagados en abundante agua. Luego se enjuagaron 6 veces con agua utilizando una pipeta Pasteur para eliminar los restos difíciles de sacar. Posteriormente los huevos se transfirieron a placas de Petri con embriomedio (E3, Tabla A2), 30 huevos por placa, y se observaron bajo la lupa, para descartar los huevos sin embriones. Los huevos fertilizados se reconocieron

fácilmente por su transparencia de los que no contenían embriones por ser blancos y opacos. El E3 se preparó con las soluciones que se muestran en la Tabla A2, se colocaron 959 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 10 ml del stock #1, 1 ml del Stock #2, 10 ml del Stock #3, 10 ml del Stock #4 y 10 ml del Stock #5 fresco, preparado en el momento. Luego se agitó y se ajustó el pH a 7,2 con NaOH 1 M.

Denominación	Ingredientes
Stock #1	8,0 g de NaCl 0,4 g KCl 100 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Stock #2	0,36 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,60 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Stock #3	0,72 g CaCl <sub>2</sub> 50 ml de H <sub>2</sub> O destilada
Stock #4	1,23 g de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 50 ml de H <sub>2</sub> O
Stock #5	0,35 g NaHCO <sub>3</sub> 10ml de H <sub>2</sub> O destilada

**Tabla A2:** Soluciones stock utilizadas para la preparación de E3.

Posteriormente se colocaron 30 huevos fertilizados por placa con E3 y se incubaron a 28,5 °C. Durante los 3 días posteriores se retiraron los huevos en mal estado y se realizó el recambio del E3 diariamente. La higiene es especialmente importante ya que los huevos de pez cebra son muy susceptibles a las infecciones fúngicas (Overstreet et al., 2000).

Las larvas suelen eclosionar dentro de los 2-3 dpf (Westerfield, 2000). Después de la eclosión, se adhieren a superficies duras por medio de células especializadas en la cabeza (Laale, 1977). Aproximadamente a los 5 dpf las larvas inflan sus vejigas natatorias al tragar aire en la superficie del agua (Goolish y Okutake, 1999). Las larvas subsisten en gran medida gracias a las reservas del saco vitelino hasta el inicio de la alimentación exógena, que es coincidente con la finalización del desarrollo del sistema digestivo (Holmberg et al., 2004) y la capacidad de regular la posición en la columna de agua (Goolish y Okutake, 1999). Esta transición tiene lugar entre 5-6 dpf (Kimmel et al., 1995). Las reservas del saco vitelino se agotan rápidamente a los 7 dpf, por este motivo es conveniente comenzar a alimentar a las larvas antes que esto ocurra.

A partir del 5 dpf las larvas fueron trasvasadas a recipientes con 100 ml de E3 con 30 larvas cada uno y alimentadas con paramecios (100 paramecios/ml E3). Durante los primeros días de la alimentación, las larvas del pez cebra tienen un tamaño de boca de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y las presas deben, en consecuencia, estar dentro de un rango similar. Los paramecios tienen un tamaño adecuado de aproximadamente 50 a 200  $\mu\text{m}$ . Las larvas se desarrollaron y crecieron rápidamente; en el día 9 dpf se solapó la alimentación de los paramecios con nauplios de *Artemia* (500  $\mu\text{m}$ ), ya que algunos comenzaron a comerlos. A partir del día 15 dpf se alimentó solo con *Artemia*. Diariamente los recipientes se limpiaron y se realizó un recambio del 50% de volumen de E3. A partir de los 21 días, los peces fueron mantenidos en los sistemas de recirculación como los adultos y alimentados con alimento comercial y *Artemia*.

## 7-Bibliografía

Brand M., Granato M. y Nüsslein-Volhard C. 2002. Keeping and raising zebrafish. En: Zebrafish - A Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press .

Candarle P. 2014. Técnicas de Acuaponia. Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Dirección de acuicultura. Ministerio de agroindustria, Subsecretaría de pesca y acuicultura.

<https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/>.

Caruffo, M., Navarrete, N., Salgado, O., Díaz, A., López, P., García, K., Feijóo, C.G. and Navarrete, P. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Frontiers in Microbiology* 6: 1093.

De Tolla L.J., Srinivas S., Whitaker B.R., Andrews C., Hecker B., Kane A.S. y Reimschuessel R. 1995. Guidelines for the care and use of fish in research. *ILAR Journal* 37 (4):159-173.

Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A. y Parichy D.M. 2007 Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4(10):21-38.

Goolish E.M. y Okutake K. 1999. Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air–water interface. *Journal of Fish Biology* 55:1054-1063.

Harper C. y Laurence C. 2011. The laboratory Zebrafish. Taylor and Francis Group. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

Helfman G., Collett, B. y Facey D. 1997. The Diversity of Fishes. Malden: Wiley-Blackwell.

Holmberg A., Schwerte T., Pelster B. y Holmgren S. 2004. Ontogeny of the gut motility control system in zebrafish *Danio rerio* embryos and larvae. *Journal of Experimental Biology* 207: 4085-4094.

- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. y Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Laale, H. 1977. The biology and use of zebrafish *Brachydanio rerio* in fisheries research: a literature review. *Journal of Fish Biology* 10: 121-173.
- Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture* 269:1-20.
- Lawrence C. y Mason T. 2012. Zebrafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR Journal*, 53(2): 179-191.
- Lawson T. 1995. Recirculating aquaculture systems. *Fundamentals of aquacultural engineering*. US:Springer.
- Merino O.G. y Sal F.M. 2007. Sistemas de Recirculación y Tratamiento de agua. CENADAC. Argentina. Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Dirección de acuicultura. Ministerio de agroindustria, Subsecretaría de pesca y acuicultura. <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/>
- Overstreet R.M., Barnes S.S., Manning C.S. y Hawkins W.E. 2000. Facilities and Husbandry (Small Fish Models) in The Laboratory Fish. San Diego: Academic Press
- Oyarbide U., Rainieri S. y Pardo M. A. 2012. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae as a system to test the efficacy of polysaccharides as immunostimulants. *Zebrafish* 9(2): 74-84.
- Reed B. y Jennings M. 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio*. Research Guidance on the housing and care of Zebrafish. Southwater: Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals.
- Roush W. 1996. Zebrafish embryology builds better model vertebrate. *Science* 272(5265): 1103-1104.
- Ruhl N., McRobert S.P. y Currie, W.J.S. 2009. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). *Lab Animal Europe* 9(9): 19-30.

- Schilling T.F. 2002. The morphology of larval and adult zebrafish. En: Zebrafish - A Practical Approach. Oxford, UK: Oxford University Press .
- Spence R., Fatema M.K., Reichard M., Hu, K.A., Waha, M.A., Ahme, F. y Smith C. 2006. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* 69 (5): 1435-1448.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C. y Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews* 83(1): 13-34.
- Ulloa P. E., Iturr, P., Neira R. y Araneda C. 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21(4): 649-666.
- Ulloa P. E., Medrano J. F. y Feijoo C. G. 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Frontiers in Genetics*, 5: 313.
- van der Sar, A. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Bitter, W. 2004. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in Microbiology* 12(10): 451-457.
- Westerfield M. 2000. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Press. [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html)