



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
TESIS DOCTOR EN BIOQUIMICA**



**Bacterias lácticas del estuario de Bahía Blanca.  
Evaluación de sus propiedades probióticas para su  
potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

**MARÍA GABRIELA SICA**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2013**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DOCTOR EN BIOQUIMICA**

**Bacterias lácticas del Estuario de Bahía Blanca.  
Evaluación de sus propiedades probióticas para su  
potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

**MARÍA GABRIELA SICA**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2013**

## PREFACIO

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad o en otras. El trabajo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la cátedra de Microbiología Industrial y de los Alimentos dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre los años 2005 y 2013, bajo la dirección de la Dra. María Amelia Cubitto, Profesora Adjunta de la Universidad Nacional del Sur y del Dr. Emilio R. Marguet, Profesor Asociado de la Universidad Nacional de la Patagonia.

Agradezco a la Universidad Nacional del Sur el haberme brindado los recursos materiales y humanos para completar mis estudios de postgrado y realizar esta tesis doctoral, sin los cuales no hubiera sido posible la concreción de este trabajo.

María Gabriela Sica



Universidad Nacional del Sur  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dra. María Amelia Cubitto y Dr. Rogelio Marguet.

María Amelia, gracias por haberme guiado en todo momento, por tus consejos y constante apoyo, tu generosidad, disposición y entusiasmo, por tu confianza en mi trabajo, por tu amistad y por tantas enseñanzas que hicieron posible el desarrollo de esta tesis.

A mis hermanos.

Mario, Alicia, Ignacia, Antonio y Silvina, gracias por el apoyo incondicional que me brindan en todos mis proyectos, por estar siempre, en las buenas y en las malas. Gracias por tanto amor.

A la bioquímica Patricia Marucci y a la Dra. Lorena Brugnoli, compañeras de trabajo.

Patri y Lorena, gracias por la amistad, la colaboración desinteresada y sincera, por el apoyo permanente en aquellos momentos que lo necesité y por estar ahí siempre. Gracias por tantos momentos buenos compartidos..... y por los mates y las risas...

A la Dra. Andrea Lopez Cazorla.

Gracias, Andrea, por el armado y mantenimiento del sistema de cultivo para que pudiera realizar parte de mi tesis, por tu generosidad y entusiasmo, por enseñarme “el mundo de los peces”, por tus consejos sinceros, por tantas horas de trabajo compartidas con alegría.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS, en cuyas dependencias fue realizado este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Ciencia y Tecnología, por su apoyo financiero mediante el proyecto “Desarrollo de probióticos para acuicultura a partir de bacterias aisladas de ambientes marinos”, PICT 2005-32891.

Al Departamento de Ingeniería de la UNS, por haber cedido el espacio para instalar el sistema de cría de trucha arcoiris.

A Pablo Abalo, Director del Laboratorio de Hidráulica y al Técnico Carlos Weis, por su ayuda desinteresada en el armado y mantenimiento del sistema de cría de peces.

A la Dra. Sandra Fernández, jefa del Laboratorio de Hidráulica - Área I, Departamento de Ingeniería.

A la Técnica en Acuicultura Viviana Pereyra y por su intermedio a las autoridades de la Escuela Agropecuaria de Tres Arroyos, por habernos abierto las puertas de la institución tan generosamente y permitirnos tomar las primeras muestras para iniciar los ensayos.

Al personal de la Cátedra de Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de BByF por el asesoramiento permanente.

A la Lic. Gabriela Serralunga del Departamento de Matemática, por sus recomendaciones.

Al Dr. José Luis Balcázar de la Universidad de Girona, España, por su buena predisposición y consejos cada vez que los necesitamos.

Al personal del Servicio de Microbiología de IACA Laboratorios, por su generosa colaboración.

A Marcos y a Juan Antonio, por su confianza y por alentarme siempre.

A Sandra y Enri, mis amigas del alma, por la confianza y aguante, por tantas alegrías y tristezas compartidas, por tantos años en la misma "ruta". Cuanta felicidad me da compartir con ustedes.

A Santi, Michu, Nico y Maite, mis otros solcitos.

*A la memoria de mis padres*

*A mis soles:  
Marito, Gonza, Marugenia, Aldi,  
Cami, Tomi, Joaco y Manu*

**INDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	5
<b>SUMMARY</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	11
Introducción general	12
Hipótesis	30
Objetivo general	30
Objetivos específicos	30
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS LÁCTICAS DEL ESTUARIO DE BAHÍA BLANCA</b>	32
1 Introducción	33
1.1 Bacterias lácticas	33
1.2 Estuario de Bahía Blanca	38
1.3 Utilización de BAL como control de bacterias patógenas en salmonicultura	41
Primera Hipótesis parcial	47
Objetivos	47
2 Materiales y Métodos	48
2.1 Medios de cultivo	48
2.2 Aislamiento e identificación de BAL	48
2.2.1 Toma de muestras y aislamiento de BAL	48
2.2.2 Identificación molecular de BAL: amplificación y secuenciación de 16S rDNA	51
2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana	52
3 Resultados	55
3.1 Aislamiento y tipificación de BAL	55
3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana	57
4 Discusión	61

**CAPÍTULO 2****CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL ESTUARIO DE BAHÍA**

<b>BLANCA</b>	<b>68</b>
1 Introducción	69
Segunda Hipótesis parcial	77
Objetivos	77
2 Materiales y Métodos	78
2.1 Cepas seleccionadas para el estudio	78
2.2 Ensayos de tolerancia a pH gástrico	78
2.3 Ensayos de tolerancia a la bilis	79
2.4 Evaluación de las propiedades de superficie celular y de adhesión de las cepas BAL	81
2.4.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie celular	81
2.4.2 Ensayos de autoagregación y coagregación	82
2.4.3 Evaluación de las propiedades de adhesión	83
a) Adhesión inespecífica	83
b) Adhesión específica a mucus de trucha arcoíris	85
2.5 Ensayos de exclusión competitiva	87
2.6 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (ATM)	89
2.7 Capacidad hemolítica	91
2.8 Ensayo de la supervivencia y adhesión de la cepa F2 en el agua del sistema de cultivo de trucha arcoíris	92
2.8.1 Supervivencia	92
2.8.2 Adhesión a vidrio y mucus en condiciones estáticas de la cepa F2 en agua de cultivo de trucha arcoíris	92
2.8.3 Adhesión a vidrio y mucus en condiciones de flujo dinámico	93
2.9 Análisis estadístico	95
3 Resultados	96
3.1 Tolerancia al ácido y a la bilis	96
3.2 Propiedades de superficie y de adhesión de las cepas BAL	97
3.3 Ensayos de auto y coagregación	99



---

3.4 Ensayos de exclusión competitiva	101
3.5 Ensayo de susceptibilidad a los ATM	102
3.6 Capacidad hemolítica	105
3.7 Evaluación de la supervivencia y de las propiedades de adhesión de la cepa F2 en el agua del sistema de cultivo de trucha arcoíris	105
4 Discusión	107
<b>CAPITULO 3</b>	
<b>APLICACIÓN DE <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> F2 EN UN SISTEMA EXPERIMENTAL DE CULTIVO DE TRUCHA ARCOÍRIS</b>	120
1 Introducción	121
Tercera Hipótesis parcial	129
Objetivos	129
2 Materiales y Métodos	130
2.1 Preparación del suplemento probiótico	130
a) Liofilización	130
b) Preparación del suplemento probiótico en el alimento	131
2.2 Condiciones experimentales en el cultivo de trucha arcoíris	131
2.3 Ensayo preliminar de seguridad de la cepa F2 sobre trucha arcoíris	136
2.4 Evaluación del efecto de la aplicación de la cepa F2 en ensayos de engorde de trucha arcoíris	137
2.4.1 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el agua de cultivo	137
2.4.2 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el alimento	138
2.5 Análisis microbiológico y fisicoquímico del sistema	139
2.5.1 Análisis de agua del sistema de cría	139
2.5.2 Análisis microbiológico de residuos sólidos	140
2.6 Análisis estadístico	141
3 Resultados	143
3.1 Preparación del suplemento probiótico	143
a) Liofilización	143

---

b) Preparación del suplemento probiótico en el alimento	143
3.2 Ensayo preliminar de seguridad de la cepa F2 sobre trucha arcoíris	144
3.3 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el agua de cultivo	144
3.4 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el alimento	147
3.5 Controles microbiológicos y fisicoquímicos del agua	147
3.6 Estudios microbiológicos de detritos en la experiencia de engorde con el agregado del probiótico con el alimento	148
4 Discusión	151
<b>CONCLUSIONES</b>	158
<b>ANEXO</b>	164
1 Medios de cultivo	165
2 Buffer fosfato salino	168
3 Pruebas bioquímicas	168
4 Recuento directo por microscopía de epifluorescencia	168
5 Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Halos de inhibición obtenidos para las cepas de referencia	169
6 Determinación de proteínas por el método de Lowry	172
7 Análisis físico químico y microbiológico del agua de perforación para cultivo de trucha arcoíris	173
7.1 Análisis físico-químico: resultados	173
7.2 Análisis microbiológico: resultados	175
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	176
<b>PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS</b>	208

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura I.1</b> Esquema básico de las etapas a seguir en el diseño de un probiótico para acuicultura.	28
<b>Figura 1.1</b> Estuario de Bahía Blanca.	40
<b>Figura 1.2</b> Localización sitios de muestreo de sedimentos	49
<b>Figura 2.1</b> Esquema de la celda de flujo utilizada en los ensayos de adhesión en condiciones de flujo laminar.	94
<b>Figura 2.2</b> Tolerancia de BAL a diferentes condiciones de pH.	96
<b>Figura 2.3</b> Adhesión de BAL a vidrio, acero inoxidable y mucus de trucha arcoíris.	98
<b>Figura 2.4</b> Autoagregación (1 y 4 h) de BAL.	100
<b>Figura 2.5</b> Coagregación (4 h) de BAL frente a patógenos de salmónidos.	100
<b>Figura 3.1</b> Esquema de una unidad del sistema cerrado de recirculación de agua para acuicultura.	133
<b>Figura 3.2</b> Supervivencia de la cepa F2 en el alimento.	143
<b>Figura 3.3</b> Tasa específica de crecimiento de trucha arcoíris durante el ensayo de engorde con la administración del probiótico en el agua en los muestreos quincenales.	146
<b>Figura 3.4</b> Índice de conversión alimentaria de trucha arcoíris durante el ensayo de engorde con la administración del probiótico en el agua en los muestreos quincenales.	146
<b>Figura 3.5</b> Recuento de Enterobacterias en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.	149
<b>Figura 3.6</b> Recuento de Hongos en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.	149
<b>Figura 3.7</b> Recuento de BAL en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.	150

## ÍNDICE DE FOTOS

	<b>Página</b>
Foto 1.1 Forunculosis.	42
Foto 1.2 Yersiniosis.	43
Foto 1.3 Lactococosis.	44
Foto 1.4 Ensayos de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar.	60
Foto 2.1 Obtención de bilis de trucha arcoíris por punción de vesícula biliar.	80
Foto 2.2 Cajas de Petri divididas en seis secciones por material plástico autoclavable.	84
Foto 2.3 Obtención de mucus de trucha arcoíris.	86
Foto 2.4 Cámara de flujo utilizada en los ensayos dinámicos de adhesión.	95
Foto 2.5 Adhesión de BAL.	99
Foto 2.6 Ensayo de determinación de sensibilidad a los ATM.	103
Foto 2.7 Evaluación de la capacidad hemolítica de BAL en agar sangre.	105
Foto 3.1 Cepa F2 liofilizada	130
Foto 3.2 Tanques de cultivo	133
Foto 3.3 Decantador (D), intercambiador de calor (IC) y biofiltro (B).	134
Foto 3.4 Esterilizador UV (E) y biofiltro (B).	134
Foto 3.5 Vista general del sistema de cría	135

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1</b> Ejemplos de enfermedades bacterianas en acuicultura de salmónidos.	14
<b>Tabla 1.1</b> Cepas de bacterias del ácido láctico aisladas de sedimentos y peces del estuario de Bahía Blanca.	55
<b>Tabla 1.2</b> Filiación taxonómica de los aislamientos de BAL a partir de peces y sedimentos basada en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S.	56
<b>Tabla 1.3</b> Actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias BAL aisladas del Estuario de Bahía Blanca.	58
<b>Tabla 1.4</b> Interpretación de ensayos de inhibición por técnicas de difusión en placa.	59
<b>Tabla 2.1</b> Cepas seleccionadas en función de su actividad antagónica frente a patógenos de salmónidos.	78
<b>Tabla 2.2</b> ATM utilizados en los ensayos de susceptibilidad de BAL y valores de referencia de los halos de inhibición de cepas controles.	91
<b>Tabla 2.3</b> Hidrofobicidad de la superficie celular de BAL.	97
<b>Tabla 2.4</b> Porcentaje de inhibición de la adhesión de patógenos de salmónidos.	102
<b>Tabla 2.5</b> Susceptibilidad de BAL a los ATM.	104
<b>Tabla 3.1</b> Parámetros de crecimiento de trucha arcoíris durante el engorde con la administración del probiótico en el agua.	145
<b>Tabla 3.2</b> Parámetros de crecimiento de trucha arcoíris durante el engorde con la administración del probiótico en el alimento.	147
<b>Tabla A.1</b> Halos de Inhibición para <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.	170
<b>Tabla A.2</b> Halos de Inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	170
<b>Tabla A.3</b> Halos de Inhibición para <i>Eschericia coli</i> ATCC 25922.	171

<b>Tabla A.4</b> Puntos de corte de los halos de inhibición de los géneros <i>Enterococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> (CLSI 2009).	171
---	-----

## RESUMEN

Una de las áreas de estudio que ha crecido significativamente como medida alternativa para el control y prevención de enfermedades infecciosas en acuicultura, así como para el incremento de peso y mejoramiento del estado de salud en los peces, es el de los probióticos. En nuestro país, el estudio de microorganismos probióticos, en especial las bacterias lácticas, ha tenido un destacado desarrollo para su aplicación en humanos y en animales terrestres; sin embargo, el estudio de sus aplicaciones en la acuicultura es limitado.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el potencial probiótico de cepas de BAL provenientes de peces y sedimentos de estuario de Bahía Blanca a fin de considerar su aplicación en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

A partir de muestras de sedimentos y del tracto gastrointestinal de peces que cumplen su ciclo de vida completo o gran parte de él en el estuario de Bahía Blanca, se aislaron 22 cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus*, que fueron identificadas por sus características fenotípicas y por secuenciación del ADNr 16S.

Para realizar una primera selección, se estudió la capacidad inhibitoria de las cepas BAL aisladas sobre el crecimiento de tres patógenos bacterianos de mayor incidencia en el cultivo de salmónidos: *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Lactococcus garvieae*. En función de su potencialidad antagónica frente a estos patógenos indicadores, se seleccionaron 12 cepas a las que se continuó estudiando a fin de conocer su potencial como

probióticos. En cada una de las cepas se estudiaron las características de superficie celular como hidrofobicidad, autoagregación y coagregación; la capacidad de adhesión a diferentes superficies (acero inoxidable, vidrio y mucus superficial de trucha arcoíris); capacidad de competir con los patógenos de salmónidos por los sitios de adhesión al mucus, la resistencia al pH gástrico y a la bilis de trucha arcoíris. Para evaluar su seguridad se determinó la resistencia a los antimicrobianos y su capacidad hemolítica.

La mayoría de las cepas estudiadas mostraron características promisorias ya que presentaron buena capacidad de adhesión, estabilidad frente a la bilis de trucha arcoíris, baja ocurrencia de resistencia adquirida a antimicrobianos y ausencia de actividad hemolítica. Además, todas ellas exhibieron la capacidad de excluir competitivamente a alguno de los patógenos por competencia, exclusión y/o desplazamiento.

Por la estabilidad a la bilis y la tolerancia al pH gástrico de las truchas, la buena capacidad de adhesión, por altos índices de inhibición demostrados sobre la adhesión de *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* a superficies cubiertas con mucus de trucha y por la ausencia de resistencia adquirida a los antimicrobianos, se selecciona la cepa F2, para realizar ensayos *in vivo* en un cultivo de juveniles de trucha arcoíris. Esta cepa mantuvo su capacidad de adhesión a mucus en el agua de cultivo, tanto en condiciones estáticas como en condiciones de flujo laminar y fue capaz de sobrevivir, al menos 24 h, en el agua del sistema de cría.

La administración de la cepa F2 no produjo efectos negativos en los peces. La adición de esta cepa al agua de cultivo o como suplemento de la dieta base durante los ensayos de engorde de juveniles, produjo cambios



significativos en la tasa específica de crecimiento y ganancia de peso promedio. Sin embargo, la mejora en la eficiencia de la conversión alimentaria, solo se puso de manifiesto cuando la cepa F2 fue administrada con el alimento, concluyendo que la dosis y el modo de administrar el probiótico son importantes para obtener un beneficio en el crecimiento.

Este estudio es el primer reporte sobre el aislamiento de BAL a partir de sedimentos y peces del estuario de Bahía Blanca y sobre el estudio de sus propiedades probióticas para su potencial uso en acuicultura. Se puede concluir que la cepa F2, *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, aislada de intestino de *Ramnogaster arcuata*, especie que cumple su ciclo de vida completo en el estuario de Bahía Blanca, muestra buenas perspectivas para su aplicación en el cultivo de trucha arcoíris. Este estudio además demuestra que BAL provenientes de un ambiente acuático con alta influencia marina presentan potencialidad probiótica para ser utilizadas en el cultivo de una especie de agua dulce.

## SUMMARY

The use of probiotics is an area of study that has grown exceptionally as an alternative for the control and prevention of infectious diseases in aquaculture, as well as for weight gain and improvement of health status in fish. In our country, the study of probiotic microorganisms, especially lactic acid bacteria, has had a significant development for application in humans and terrestrial animals; however, the study of their applications in aquaculture is limited.

The objective of this thesis was to evaluate the potential probiotic of LAB strains from fish and sediments from Bahía Blanca estuary to consider its application in rainbow trout culture (*Oncorhynchus mykiss*).

From samples of sediments and gastrointestinal tract of fish that spend their life cycle completely or partly in the Bahía Blanca estuary, 22 strains belonging to the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* and *Enterococcus* were isolated and identified by their phenotypic characteristics and 16S rDNA sequencing.

To make a first selection of probiotic bacteria, the inhibitory capacity of these strains on the growth of three bacterial pathogens of greatest impact on salmonid culture: *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* and *Lactococcus garvieae* was studied. Based on their antagonistic potential against these pathogens, 12 strains were selected to continue studying their probiotic properties. Each strain was evaluated according to the cellular surface characteristics such as hydrophobicity, autoaggregation and coaggregation, the ability to adhere to different surfaces (stainless steel, glass and surface mucus of rainbow trout), the ability to inhibit the adhesion

of pathogens of salmonids to mucus and the resistance to gastric pH and bile of rainbow trout. To evaluate its safety to be applied as probiotics, the antimicrobial resistance and hemolytic capacity were determined.

Most of the strains studied showed promising characteristics as their adhesion capacity to the three surfaces assayed, stability to rainbow trout bile, low occurrence of acquired resistance to antibiotics and no hemolytic activity. Furthermore, all strains showed the ability to competitively exclude *Y. ruckeri* and *A. salmonicida* from the mucus-coated surfaces, at least in one of the test: competition, exclusion and / or displacement.

Because of the good tolerance to gastric pH and rainbow trout bile, the good adhesion, the excellent ability to inhibit the adhesion of *Y. ruckeri* and *A. salmonicida* to surfaces coated with rainbow trout mucus and the absence of acquired resistance to antibiotics, the strain F2 was selected for *in vivo* study in a culture of juvenile rainbow trout. Furthermore, the strain F2 maintained its ability to adhere to mucus in the presence of water of trout farming system, both under static and laminar flow conditions and it was able to survive at least 24 h in this water.

There was no evidence of any harmful effects caused by the administration of F2 strain during the culture of juvenile rainbow trout. The addition of F2 to the farming water or as a supplement of the basal diet produced significant changes in the specific growth rate and average weight gain. However, the improvement in the efficiency of food conversion was detected only when the strain F2 was provided in food, concluding that the dose and mode of administering a probiotic are important to obtain a benefit in the growth of animals.

This study is the first report on the isolation of LAB from sediments and fish from Bahía Blanca estuary and their probiotic properties for potential use in aquaculture. From the experiments it may be concluded that the strain F2, *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, isolated from gastrointestinal tract of *Ramnogaster arcuata*, species that comply the full life cycle in the Bahía Blanca estuary, shows good prospects for application in rainbow trout farming. Further, this study demonstrates that LAB isolated from an estuary with a high marine influence, posses probiotic potential to be used in the culture of a freshwater species.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las pesquerías, basadas en la extracción de los recursos naturales, han sufrido fuertes cambios en la última década, no sólo en lo referido a su dimensionamiento original sino también en cuanto a la calidad de su composición específica. Argentina no queda fuera de este panorama mundial. Actualmente, el problema más agudo que enfrenta el hombre es el corolario de que los ecosistemas acuáticos han sido explotados por encima de su propia capacidad de sustentabilidad natural. En algunos casos, la contaminación y otros factores se han sumado de tal forma que también existe una disminución de la capacidad de carga que determinados recursos hídricos poseían originalmente (Lyndom, 1999; SAGPyA, 2001).

Teniendo en cuenta la pérdida de los recursos renovables y de acuerdo a los lineamientos de la FAO (2006) en lo referente a una imprescindible cobertura de “seguridad alimentaria” para este milenio, se debe pensar obligadamente en aquellas producciones que puedan iniciarse, potenciarse o bien, mejorarse, para producir mayor cantidad de insumos y alimentos de excelente calidad. Dentro de estas producciones, claramente puede insertarse la acuicultura cuya oferta de productos de alta calidad proteica es cada vez más requerida por la población (SAGPyA, 2001).

En el año 2005 la producción mundial de acuicultura alcanzó 48,1 millones de toneladas (FAO, 2007) con una tasa anual de crecimiento promedio de 8,8 % desde los años 50. El valor de la producción acuícola fue estimado en USD 105.300 millones en 2009 (FAO, 2009). Actualmente

es la fracción de mayor incremento dentro de la industria pesquera y se la considera el sector de producción de alimentos que más ha crecido en el mundo. La mayor parte de la producción proviene de Asia, más precisamente de China, que representa alrededor del 67 % de la producción mundial de pescado. Los principales productores en Europa, América y África son Noruega, Chile y Egipto, respectivamente. Si bien la actividad de acuicultura tiene gran relevancia en algunos países, en Argentina está poco desarrollada; sin embargo, poco a poco se está abriendo camino, especialmente debido al interés de los productores agropecuarios. El Estado Nacional manifiesta su apoyo al sector para favorecer su crecimiento, visualizando como objetivo el aumento de producciones diversificadas en varias especies en distintas regiones del país, especialmente dirigidas a la piscicultura de agua dulce y marina. (SAGPyA, 2001). Las opciones más rentables y viables dentro de la piscicultura comercial, son la cría de trucha arco iris y de pacú, con el 66 y 22 % de la producción total, respectivamente. Existen varios criaderos en provincia de Buenos Aires, Patagonia y la región NEA.

Uno de los principales problemas que afectan negativamente la acuicultura son las enfermedades infecciosas (Austin y Austin, 1985). Existe un gran número y variedad de organismos capaces de generar enfermedades infecciosas en acuicultura. Se destacan las enfermedades bacterianas y virales como las principales causas de mortalidad en criaderos de peces y en larvicultura de camarones, las cuales generan elevadas pérdidas económicas (Gómez-Gil *et al*, 2000; Hai *et al*, 2007). En la Tabla I.1 se resumen las principales enfermedades infecciosas de origen

bacteriano en el cultivo de trucha arcoíris, principal especie cultivada en nuestro país.

**Tabla I.1** Ejemplos de enfermedades bacterianas en acuicultura de salmonidos

<b>Agente patógeno</b>	<b>Tipo de lesiones y/o enfermedad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	Lesiones hemorrágicas en piel y músculos	Nikoskelainen <i>et al</i> , 2001
<i>A. hydrophila</i>	Putrefacción de aletas y colas, septicemia	Aly <i>et al</i> , 2008
<i>Vibrio anguillarum</i>	Lesiones hemorrágicas en cabeza, úlceras, septicemia	Ringø <i>et al</i> , 2002
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>		Nicolás <i>et al</i> , 2008
<i>Yersinia ruckeri</i>	Enfermedad entérica de la boca roja, congestión vascular en cerebro y ojos, septicemia, hepato y esplenomegalia	Bravo y Midtlyng, 2007
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Septicemia richetsial: oscurecimiento de piel, úlceras y palidez de branquias, esplenomegalia	Bravo y Midtlyng, 2007
<i>Lactococcus garvieae</i>	Nódulos sistémicos y septicemia	Ringø y Gatesoupe, 1998
<i>Streptococcus iniae</i>	Meningoencefalitis	Romalde <i>et al</i> , 2005
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Necrosis visceral	Collins <i>et al</i> , 1987



Las enfermedades infecciosas son particularmente frecuentes en la acuicultura intensiva. Las elevadas densidades poblacionales en criaderos exponen a los animales a condiciones de estrés y deterioro del microambiente en el que cumplen sus ciclos biológicos. El hacinamiento, el bajo nivel de oxígeno disuelto, el alto contenido de amoníaco, la elevada temperatura, o la presencia de contaminantes, alteran los mecanismos naturales de defensa (Bucio *et al*, 2006). En consecuencia, se incrementan los riesgos de aparición de epizootias, siendo el medio acuoso la principal fuente de diseminación de los mismos (Ringø, 2001). Los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos para ingresar al hospedador a través de diferentes órganos blanco y actualmente se acepta que las principales puertas de entrada son la piel, las branquias, el tracto gastrointestinal o una combinación de los mismos. Las interacciones entre los peces y los microorganismos que están presentes en el medio acuático son una fuente potencialmente importante de enfermedad y por lo tanto, de mortalidad asociada (Austin y Austin, 1985).

Las enfermedades microbianas pueden ser causadas por patógenos oportunistas, que pueden residir en el medio ambiente o en peces portadores (Bucio *et al*, 2006 y 2004). Las condiciones de estrés antes mencionadas permiten que los microorganismos puedan penetrar, colonizar e invadir los tejidos del hospedador (Hansen y Olafsen, 1999). Los patógenos oportunistas suelen ser omnipresentes en las aguas naturales, prosperando en la materia orgánica en suspensión. Algunos ejemplos son: *Aeromonas hydrophila* (septicemia), *Flexibacter columnaris* (enfermedad columnar), *Edwardsiella ictaluri* (septicemia entérica del

bagre), protozoos parásitos externos como *Trichodina* spp., y hongos como *Saprolegnia* spp. A diferencia de los patógenos oportunistas, los patógenos obligados requieren al hospedador vivo con el fin de crecer y reproducirse, aunque sobreviven en la columna de agua o unidos a los sedimentos, siendo viables el tiempo suficiente como para transmitirse horizontalmente. Las bacterias patógenas obligadas más importantes en el cultivo de salmónidos son bacterias Gram negativas (*Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium psychrophilum*). También se destacan las bacterias intracelulares *Piscirickettsia salmonis* y *Renibacterium salmoninarum* y las Gram positivas, como *Lactococcus garvieae*, entre otras (Tabla I.1). Dentro del grupo de patógenos obligados, se incluyen a los virus, como por ejemplo, Ortomyxovirus (anemia infecciosa del salmón), Nodavirus (encefalopatía y retinopatía viral), Piscine reovirus (inflamación del músculo cardíaco y esquelético) (Sernapesca, 2011).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de la acuicultura se ve limitado por la elevada tasa de mortalidad que presentan los organismos acuáticos por enfermedades infecciosas, situación que se agrava con el uso de agentes químicos, que favorecen la emergencia de cepas resistentes (Ringo y Gatesoupe, 1998; Gram *et al*, 1999; Verschueren *et al*, 2000; Gómez-Gil *et al*, 2000; Vázquez *et al*, 2003). Las medidas profilácticas y terapéuticas más utilizadas en acuicultura para enfrentar esta problemática, se han enfocado a cuatro áreas diferentes:

- 1- Desinfección de las fuentes de agua y alimento
- 2- Estimulación de la resistencia del hospedador

- 3- Uso profiláctico o terapéutico de antibióticos
- 4- Probióticos

Existen diferentes métodos para reducir las poblaciones de microorganismos patógenos en acuicultura, como por ejemplo la desinfección química de los huevos, del material (redes, botas, etc.) y de los estanques. En los criaderos, el agua puede ser tratada empleando luz UV, ozono o una combinación de ambos y desinfectantes derivados del cloro. Sin embargo, el cultivo en estanques y en la mayoría de los grandes criaderos operado bajo condiciones de flujo continuo, el agua no es tratada. Los problemas de enfermedades bacterianas pueden ser minimizados mediante la gestión de las condiciones de cría para satisfacer las necesidades fisiológicas de los peces y proveer un ambiente de bajo estrés (Bucio *et al*, 2004 y 2006).

Otra alternativa para prevenir enfermedades en peces es la vacunación. Sin embargo, es poco probable que se desarrollen vacunas para proteger a los peces contra patógenos oportunistas como *Aeromonas hydrophila*, debido a su presencia ubicua y a sus serotipos múltiples. Además, los principios de vacunación no son aplicables para estadios tempranos de crecimiento, como larvas y alevines, por que presentan baja inmunocompetencia (Saarela *et al*, 2000). Es importante señalar que la prevención de enfermedades en los estadios más tempranos del crecimiento tiene un significado económico considerable ya que son los más susceptibles a las enfermedades y presentan alta mortalidad (Nikoskelainen *et al*, 2001). Por otra parte, el costo de la vacunación es elevado y las vacunas no están disponibles para todas las especies de

peces de cría, incluidas las especies tropicales. Además, la aplicación de algunos tipos de vacunas resulta compleja cuando se cuenta con un gran número de individuos muy pequeños. Se han desarrollado vacunas eficaces para prevenir las enfermedades causadas por *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri* (Hill, 2005). En Chile se utilizan vacunas desde 1995 en criaderos de salmones frente a brotes de enfermedad entérica de la boca roja, síndrome rickettsial y la forunculosis atípica (Bravo y Midtlyng, 2007). Por lo tanto, aunque las vacunas están siendo desarrolladas y comercializadas, no pueden ser utilizadas como una medida de control universal de enfermedades infecciosas en acuicultura (Denev *et al*, 2009).

Para el control de patógenos de peces durante los brotes de enfermedad, las poblaciones son tratadas por la exclusión de los peces infectados o peces muertos y la quimioterapia, incluyendo el uso de antimicrobianos (ATM). Los ATM pueden utilizarse para eliminar las bacterias durante un brote de la enfermedad. Sin embargo, éstos suelen ser añadidos al alimento de manera profiláctica y como promotores de crecimiento, utilizando en este caso, dosis subterapéuticas de ATM. Esta práctica tiene dos aspectos negativos principales:

a) la presencia de residuos de ATM en el ambiente y en los tejidos de los peces destinados al consumo,

b) la selección de cepas resistentes a los mismos, pudiendo convertirse en una amenaza ecológica para la sustentabilidad de las poblaciones acuáticas y el riesgo concomitante en la salud pública. (Hansen *et al*, 1992; Gildberg *et al*, 1997, 1998; Byun *et al*, 1997; Ringo y

Birkbeck, 1999, Egervärn *et al*, 2007b; Ringo *et al*, 2010; Morandi *et al*, 2012).

Los ATM habitualmente utilizados para el tratamiento de las infecciones humanas también se utilizan para los animales. La elección de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas se está convirtiendo en una situación cada vez más limitada, costosa y en algunos casos infructuosa, debido a la aparición de resistencia a los fármacos en bacterias y hongos. Esta pérdida de opciones de tratamiento se ha transformado en una amenaza que puede revertir muchos de los avances médicos de los últimos 50 años (HHS, Department of Health and Human Services, USA, 1999). El informe de la conferencia de la Unión Europea, “Amenaza Microbiana” (1998) reconoció que la principal vía de transmisión de microorganismos resistentes desde los animales al hombre es a través de la cadena alimentaria (FAO, 2005). Existe una fuerte tendencia en contra del uso innecesario de drogas antimicrobianas para la cría de animales homeotermos y poiquilotermos y resulta fundamental regular su uso para evitar la generación de cepas microbianas difíciles de controlar.

Actualmente, se considera que los ATM siguen siendo necesarios para tratar brotes ocasionales de enfermedades bacterianas. Sin embargo, existe una creciente preocupación por el elevado consumo de antibióticos en la acuicultura como agentes profilácticos. Por esto se ha iniciado la búsqueda de métodos alternativos de control de las enfermedades y promoción del crecimiento (Gildberg *et al*, 1997; Byun *et al*, 1997).

Con el desarrollo de vacunas y a través de la aplicación de buenas prácticas de acuicultura, mejoras en el saneamiento y en la calidad del agua, las muertes por enfermedades infecciosas se redujeron (FAO, 2005). Un ejemplo claro de los beneficios de la erradicación de antibióticos lo representa la industria de salmones de Noruega. Luego de un acuerdo sobre el uso de antibióticos en los años ochenta, se observó una disminución del 95% en la utilización de los mismos, lo que se tradujo en una caída de 50 a 1 Ton de ATM/año. En este período, la producción de salmón se incrementó 10 veces. Este efecto puede ser atribuido, a la menor incidencia de cepas resistentes, al uso de vacunas, mejoras en la producción y programas selectivos de cría (Mazzoni, 2001).

Una de las áreas de estudio que ha crecido de manera excepcional como una medida alternativa para el control y prevención de enfermedades frente al uso de antibióticos, así como para el incremento de peso y mejoramiento del estado de salud en los peces, es el de los probióticos (Gatesoupe, 1999; Nikoskelainen *et al*, 2001; Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al*, 2006b; 2008; Vine *et al*, 2006, Kesarcodi-Watson *et al*, 2008; Lara Flores, 2011; Boutin *et al*, 2012). Noruega y otros países con buen desarrollo de la acuicultura, como Finlandia, Japón, Canadá, Estados Unidos, México, España y, más recientemente, Chile, han comenzado a estudiar y aplicar bacterias del ácido láctico (BAL), por sus propiedades probióticas, en cultivos de organismos acuáticos. Estos estudios han señalado no sólo el efecto de las BAL como controles biológicos de enfermedades, sino también como promotores de crecimiento, logrando así, organismos más sanos y con tallas adecuadas para su comercialización

en menor tiempo (Ringo y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; Hansen y Olafsen, 1999; Verschueren *et al*, 2000; Abidi, 2003; Lara-Flores *et al*, 2003; Panigrahi *et al*, 2004; Vázquez *et al*, 2005).

El uso de alimentos que contienen microorganismos vivos (bacterias y levaduras) con propiedades benéficas se conoce desde hace siglos. Mucho antes de su descubrimiento, los microorganismos fueron utilizados para preservar alimentos y estos métodos empíricos contribuyeron al mejoramiento de la salud humana.

A principios del siglo pasado, Metchnikoff (1907) propuso implantar BAL en intestino humano con la intención de inhibir la actividad perjudicial de ciertos microorganismos. El concepto moderno de probióticos fue formulado años después por Parker (1974), quien los define como microorganismos o sustancias microbianas que contribuyen al balance intestinal. La definición fue luego restringida a “microorganismos vivos que suplementados con el alimento causan un efecto benéfico sobre el animal hospedador, por el mejoramiento del balance de su microbiota intestinal” (Fuller, 1989). En un sentido más amplio, un probiótico es definido como células microbianas vivas de efecto beneficioso que, al ser suministradas al hospedador como parte de su dieta, contribuyen a mejorar el balance intestinal y/o promover la microbiota nativa (Gatesoupe, 1999; Hansen, 1999). Según la definición, de la Organización Mundial de la Salud, un probiótico es todo aquel microorganismo vivo que, administrado en la cantidad adecuada, proporciona beneficios al hospedador (FAO/WHO, 2002).

Los probióticos han sido ampliamente aplicados para la promoción de la salud humana, en animales de granja, mascotas y animales acuáticos (Ringo y Gatesoupe, 1998; Hansen y Olafsen, 1999; Lyndom, 1999; Vaughan *et al*, 2005). En los sistemas de acuicultura el ambiente inmediato tiene una gran influencia en el estado sanitario del hospedador puesto que los microorganismos presentes, por ejemplo, en intestino de los peces son los mismos a los hallados en sus tegumentos, branquias, medio circundante e incluso en el alimento (Hansen y Olafsen, 1999; Lara-Flores *et al*, 2003). Debido a esto, Verschuere *et al* (2000) proponen la siguiente definición de probióticos en los ambientes acuáticos: "un microorganismo vivo que tiene efecto beneficioso sobre el hospedador, modificando la comunidad microbiana relacionada con él o con el ambiente en el que éste se desarrolla, a través de una mejora del uso del alimento o de su valor nutricional y/o de la respuesta del hospedador a las enfermedades y/o la calidad del ambiente".

El uso de probióticos es una opción para disminuir la utilización de antimicrobianos y el elevado costo asociado a vacunas e inmunoestimuladores. Estos microorganismos ejercen su acción por diferentes mecanismos. El efecto benéfico que pueden ejercer los probióticos en el hospedador, puede llegar a concebirse como una multiplicidad de modos de acción combinados o sinérgicos, muchos de ellos ligados a cepas específicas (Balcázar *et al*, 2006b, 2008). Los siguientes son ejemplos de los diferentes mecanismos de acción sugeridos para cepas probióticas en acuicultura:



**a) Exclusión competitiva y formación de biofilms:** Las cepas probióticas han demostrado inhibir las bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo* (Balcázar *et al*, 2006b, 2008). El antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza, por lo que las interacciones microbianas juegan un importante papel en el mantenimiento de una equilibrada competencia entre los microorganismos beneficiosos y potencialmente patógenos. Sin embargo, la composición de las comunidades microbianas pueden ser alterada por las prácticas de cría y el ambiente, condiciones que estimulan la proliferación de determinadas especies bacterianas. Es bien sabido que la microbiota en el tracto gastrointestinal (TGI) de los animales acuáticos puede modificarse, por ejemplo, con la ingestión de otros microorganismos; por lo tanto, la manipulación de microorganismos constituye una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia de patógenos (Balcázar *et al*, 2006a). Un criterio importante para el uso de probióticos en acuicultura es el potencial de colonización que poseen estos microorganismos en el TGI. Las bacterias probióticas colonizan las superficies mucosas sin causar enfermedad y así colaborar en la digestión, desplazar bacterias patógenas y/o modular la respuesta inmunológica (Balcázar *et al*, 2006a; Pasteris *et al*, 2012).

**b) Producción de metabolitos antagónicos y enzimas:** Las cepas probióticas pueden producir diferentes metabolitos antagónicos frente a microorganismos patógenos, entre los que se incluyen CO<sub>2</sub>, etanol, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, sideróforos, enzimas

(lisozima y proteasa) (Ali, 2000, Verschuere *et al*, 2000, Irianto y Austin, 2002, Chythanya *et al*, 2002, Balcázar *et al*, 2006b; Gatesoupe, 2008).

**c) Competencia por nutrientes o por fuentes de energía:** La competencia por nutrientes puede jugar un papel importante en la composición de la microbiota del TGI o del ambiente de las especies en cultivos acuáticos. Por ejemplo, las cepas probióticas productoras de sideróforos podrían limitar el hierro disponible y por lo tanto, el crecimiento de muchos patógenos (Rico-Mora *et al*, 1998; Gram *et al*, 1999; Verschuere *et al.*, 1999; Verschuere *et al*, 2000).

**d) Estimulación del sistema inmunitario del hospedador:** La actividad inmunoestimulante de algunos probióticos se ha puesto en evidencia tanto en peces como en camarones. Algunas cepas estimulan la respuesta innata o inespecífica, como por ejemplo la actividad lisozima en eritrocitos, macrófagos y linfocitos, y otras cepas, la respuesta inmune específica. El sistema complemento participa tanto como índice de presencia de microorganismos patógenos como de depuración. Este sistema, junto con otras proteínas de fase aguda, puede reaccionar frente a los patógenos, con la liberación de citoquinas por la interacción de células inmunes. Los probióticos también pueden modificar la respuesta del hospedador al interactuar con células epiteliales, modulando la secreción de citoquinas antiinflamatorias (Fuller, 1992; Panigrahi *et al.*, 2004; Farzanfar, 2006; Kim y Austin, 2006; Balcázar *et al*, 2007b; Nayak, 2010; Pasteris *et al*, 2012).

**f) Efectos nutricionales, sobrevida, promoción de crecimiento, metabolismo digestivo:** Dado que la acuicultura es una de las opciones

más interesantes para la producción de proteínas de origen animal, requiere de alimentos de alta calidad con un elevado contenido proteico, así como algunos aditivos para mantener a los organismos sanos y en crecimiento favorable. Los probióticos constituyen una alternativa apropiada para mejorar la digestión de nutrientes y el crecimiento de organismos acuáticos. Se conoce que la microbiota indígena tiene un efecto importante en la estructura, función y metabolismo del TGI de animales acuáticos. Se sugiere que algunas cepas presentes en el TGI de peces producen enzimas digestivas que les facilitan la digestión y utilización del alimento, favoreciendo el crecimiento, la velocidad de conversión de alimento y la eficiencia proteica (Irianto y Austin, 2002; Bairagi *et al*, 2002; Lara-Flores *et al*, 2003).

**g) Mejoramiento de la calidad del agua:** El mejoramiento de la calidad del agua ha sido asociado a cepas de BAL por su capacidad de reducir la materia orgánica a CO<sub>2</sub> en mayor grado que las bacterias Gram negativas. Algunas cepas de BAL presentan actividad fosfatasa y producen proteasas extracelulares, lo que las hace promisorias como estrategias de biorremediación (Balcázar *et al*, 2006b; Aly y Abdel-Galil, 2008).

Merrifield *et al* (2010a), trata de fusionar todas las definiciones propuestas de probióticos para su aplicación en acuicultura, teniendo en cuenta sus efectos benéficos, y definen a los mismos como microorganismos que al ser administrados a través de la alimentación o del agua de cría producen un beneficio en el hospedador, mejorando su resistencia a las enfermedades, su estado de salud, su crecimiento, la utilización del alimento y la respuesta al estrés, efecto logrado, al menos

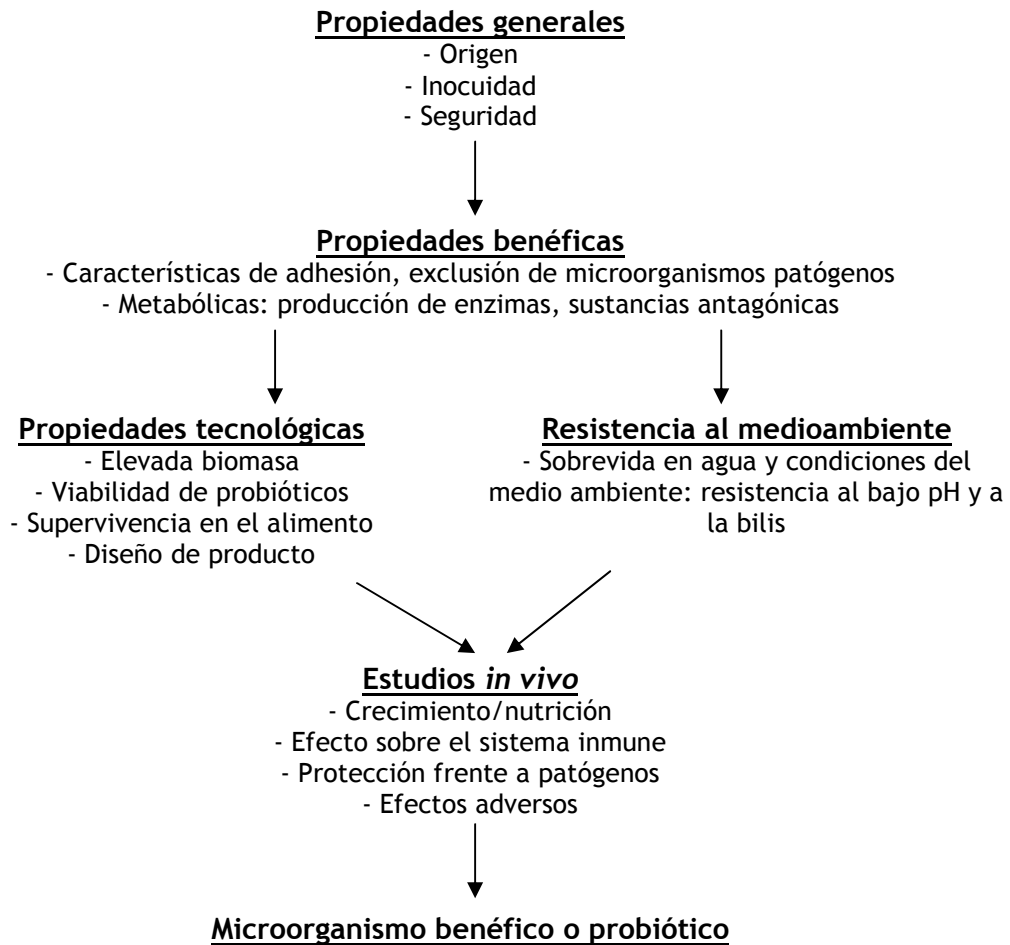
en parte, a través de una mejora del equilibrio microbiano del hospedador y del ambiente que rodea a los peces. El autor también propone una serie de criterios a seguir para seleccionar un probiótico para acuicultura, algunos de los cuales son esenciales (E) y otros favorables (F); cuanto mayor sea el cumplimiento de los criterios establecidos, más apropiada será la cepa seleccionada como posible probiótico y por lo tanto, más probable que sea eficaz en un sistema de cultivo de peces. Los criterios propuestos son:

- No debe ser patógeno, no sólo con respecto a la especie cultivada, sino también para los animales acuáticos en general y para los consumidores (E).
- Debe estar libre de factores vinculados con la resistencia a los ATM (E).
- Debe ser resistente a las sales biliares y al bajo pH (E).
- Ser capaz de adherirse y colonizar la superficie mucosa de los peces (F).
- Sobrevivir y desarrollar en el sistema de cría (F).
- Exhibir propiedades antagónicas frente a patógenos clave de la especie a cultivar; por ejemplo, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, para cultivo de salmónidos (F).
- Producir vitaminas y enzimas digestivas extracelulares (F).
- Permanecer viable en condiciones normales de almacenamiento y ser lo suficientemente robusto como para sobrevivir a los procesos industriales (F).

- Estar registrado para su uso como aditivo en la alimentación (F).

La Figura 1.1, esquematiza y resume los pasos a seguir para la selección y diseño de candidatos probióticos para su utilización en acuicultura.

Los primeros ensayos de la incorporación de probióticos en acuicultura fueron productos comerciales diseñados para animales terrestres. El mayor interés estuvo orientado a la utilización de bacterias del género *Bacillus* sp y BAL (Raida *et al*, 2003; Newaj-Fyzul *et al*, 2007; Panigrahi *et al*, 2007; Merrifield *et al*, 2010b). Estos estudios con probióticos comerciales fueron importantes para demostrar la posibilidad de utilizar microorganismos vivos como aditivos nutricionales en acuicultura. Sin embargo, la supervivencia de estos microorganismos en los animales acuáticos fue incierta, por lo cual se han orientado los esfuerzos a la búsqueda y selección de cepas con propiedades probióticas del ambiente acuático.



**Figura I.1** Esquema básico de las etapas a cumplir en el diseño de un probiótico para acuicultura

Dentro del grupo de BAL, *Lactobacillus*, y más recientemente *Carnobacterium*, constituyen los géneros más estudiados por sus propiedades probióticas de importante aplicación en cultivo de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos) (González *et al*, 2000; Hagi *et al*, 2004; Balcázar *et al*, 2008; Merrifield *et al*, 2010b). Los lactobacilos constituyen parte de la microbiota intestinal habitual en peces. El género *Carnobacterium* es un lactobacilo atípico que ha sido aislado únicamente en carnes envasadas al vacío, aves, peces y agua de mar y no se han

reportado casos de infecciones oportunistas en el hombre (Panigrahi *et al*, 2004; Vázquez *et al*, 2005).

Si bien en nuestro país el estudio de probióticos, especialmente orientado a las BAL, ha tenido un destacado desarrollo para su aplicación en humanos y en animales terrestres, el estudio de sus aplicaciones en la acuicultura es limitado. Menor aún es la disponibilidad de información sobre el potencial probiótico de BAL provenientes de ambientes acuáticos.

En Argentina, con anterioridad al inicio de este estudio, no había reportes sobre bacterias del ácido láctico en ambientes marinos costeros y estuarinos, ni en peces de esos ambientes. Por lo tanto no existía conocimiento sobre el potencial de estos microorganismos como agentes probióticos para acuicultura. Este estudio se desarrolló con el objetivo de obtener la información sobre el potencial probiótico de cepas de BAL provenientes de peces y sedimentos de un ambiente estuarino, con fuerte influencia marina, a fin de considerar su aplicación en cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Estos conocimientos podrán ser aplicados para el desarrollo de alimentos probióticos para acuicultura, preparados con cepas nativas, que tendrán impacto en un sector de la producción cuyo desarrollo en el país se debe fortalecer, evitando el uso de cepas importadas y de antimicrobianos con los riesgos ambientales y sanitarios que esto implica.

## HIPÓTESIS

Bacterias lácticas aisladas de peces y de un ambiente acuático con alta influencia marina, como el estuario de Bahía Blanca, poseen potencialidad probiótica y son factibles de ser utilizadas en el mejoramiento del cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## OBJETIVOS

El **OBJETIVO GENERAL** de esta tesis es aislar cepas de bacterias lácticas del Estuario de Bahía Blanca, evaluar sus propiedades probióticas y seleccionar aquellas cepas más aptas para su aplicación en el mejoramiento del cultivo intensivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar e identificar bacterias lácticas presentes en peces y sedimentos del estuario de Bahía Blanca.
2. Evaluar la capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de los patógenos bacterianos de salmónidos de mayor incidencia en nuestra región.
3. Evaluar las propiedades probióticas *in vitro* de las cepas aisladas para su potencial uso en acuicultura de salmónidos.
4. Evaluar la seguridad de las cepas mediante la investigación de la capacidad hemolítica y ensayos de susceptibilidad a los antimicrobianos.



5. Seleccionar una cepa en función de sus propiedades probióticas para los ensayos *in vivo*.

6. Evaluar la inocuidad *in vivo* de la cepa seleccionada frente a un cultivo de juveniles trucha arcoíris.

7. Evaluar el efecto de la aplicación de esta cepa en ensayos de engorde, suministrando el probiótico al agua o al alimento, en un cultivo intensivo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema con recirculación de agua.

# **CAPÍTULO 1**

## **Aislamiento, identificación y selección preliminar de bacterias lácticas del estuario de Bahía Blanca**

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Bacterias lácticas

El término bacterias lácticas (BAL) comprende a un grupo heterogéneo de bacterias cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Las BAL comparten similitudes morfológicas y metabólicas, estando muchas de ellas relacionadas filogenéticamente. La descripción general de las bacterias dentro de este grupo es que poseen morfología de cocos y bacilos Gram positivos, por lo general no móviles y asporógenos, salvo por el género *Sporolactobacillus* (Kitahara y Suzuki, 1963). Por lo general son catalasa negativa, carecen de citocromos, poseen metabolismo fermentativo, son anaeróbicas, aerotolerantes o microaerófilas. Son nutricionalmente exigentes ya que carecen de algunas capacidades biosintéticas. Requieren carbohidratos, aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas, especialmente del grupo B, para su crecimiento. En consecuencia, están comúnmente asociadas a ambientes ricos en nutrientes como la leche y derivados, algunas plantas, material en descomposición y superficies mucosas de los animales como por ejemplo, el tracto gastrointestinal. Las diferentes especies de BAL se han adaptado a crecer en muy diferentes condiciones ambientales y su presencia es generalizada en la naturaleza. Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación, son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solo por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos, sino también por su implicancia en la textura, sabor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Hugenholtz, 2008).

La mayor parte de las BAL pertenecen al Phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros pertenecientes al orden Lactobacillales (G+C < 50 %): *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus*, y *Carnobacterium*, entre otros. (Kandler, 1995). En el mismo Phylum se encuentra el género *Sporolactobacillus* que está compuesto por cinco especies de bacilos formadores de endosporas, catalasa negativos, anaerobios facultativos o microaerofílicos, originalmente propuestos como miembros del género *Lactobacillus* y posteriormente, elevado a la categoría de género dentro de la familia *Bacillaceae* (Kitahara and Toyota 1972; Garrity y Holt, 2001; Parra Huertas, 2010; Ruiz Pérez, 2010). El resto corresponden al Phylum Actinobacteria (G+C > 50 %), orden Bifidobacteriales, cuyo principal representante es el género *Bifidobacterium*.

Por ello actualmente el término bacterias lácticas tiene un significado ambiguo pudiendo referirse tanto a bacterias del orden Lactobacillales exclusivamente, como al conjunto, incluyendo los otros grupos. Además, el hecho que durante muchos años se les haya considerado como organismos afines ha llevado al establecimiento de un área de conocimiento en Bacterias Lácticas dentro de la Microbiología, que si bien no está definida como una disciplina de esta ciencia a efectos prácticos opera como tal.

La principal característica del metabolismo de las BAL es la fermentación de los azúcares, siendo su producto final, en la mayor parte de los casos, el ácido láctico. Pueden fermentar hexosas, como por ejemplo glucosa o fructosa, utilizando la llamada vía homofermentativa en la que el producto final es ácido láctico, o la vía heterofermentativa en la que, además

de ácido láctico, se forman ácido acético, etanol y dióxido de carbono. La utilización de una u otra vía depende de la presencia de las enzimas que intervienen en la transformación del azúcar en ácido, la fructosa 1,6-bifosfato-aldolasa en el primer caso (vía de glucólisis de Embden-Meyerhof-Parnas), y una fosfoacetolasa (vía de pentosas-fosfato), en el segundo. Algunas especies poseen sólo una de las vías metabólicas y se denominan homofermentadoras o heterofermentadoras estrictas. Las especies heterofermentadoras además pueden fermentar pentosas con la producción de ácido láctico y ácido acético. Otras especies, denominadas heterofermentativas facultativas, pueden poseer ambas vías y por lo tanto, utilizan una u otra ruta dependiendo del azúcar que se encuentre presente (Kandler y Weiss, 1986; Kandler, 1995; Madigan *et al*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, las BAL son microorganismos ubicuos, han sido aislados de una amplia variedad de ambientes naturales y forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (TGI), genito-urinario y respiratorio del hombre y muchos animales. Dentro de las BAL el grupo más estudiado es el orden Lactobacillales y en particular, el género *Lactobacillus*, gracias a sus propiedades biotecnológicas, de importancia en la industria alimentaria y por ser considerado GRAS (generally regarded as safe).

A comienzos del siglo XX Metchnikoff (1907, 1908) (citado por Tannock, 1997) propuso su teoría de que el consumo de BAL presentes en leches fermentadas (yogur) mejoraba la salud. Posteriormente, Shirota (1930) continuó esta línea y aisló la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota que se comenzó a comercializar como “Yakult”. Este fue el punto de partida del reconocimiento de las propiedades probióticas de algunas cepas de BAL.

Actualmente ésta es una de las áreas más activas en investigación, tanto en el campo de las bacterias lácticas como en el de Tecnología de Alimentos, llevando al desarrollo de nuevos alimentos con componentes que mejoran la salud del consumidor (alimentos funcionales). En comparación con la abundante y extensa información disponible de BAL en animales endotérmicos, existe menor número de estudios realizados en peces y en ambientes acuáticos.

La composición de la microbiota intestinal de los peces es más simple que la de animales homeotermos. Varios estudios que involucran técnicas moleculares, demuestran que las bacterias Gram negativas son los principales constituyentes de la microbiota intestinal en peces (Ringø *et al*, 1995; Spanggaard *et al*, 2001, Pond *et al*, 2006). Algunos autores informan además la presencia de levaduras (Andlid *et al*, 1998, Gatesoupe, 2008). Está generalmente aceptado que algunas bacterias aerobias y anaerobias facultativas aisladas de piel, branquias e intestino, tales como los géneros *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* y *Vibrio* constituyen la microbiota endógena de una variedad de peces marinos (Cahill, 1990) y su distribución depende básicamente de la salinidad del hábitat y de la carga microbiana del agua. Aquellos microorganismos que puedan multiplicarse en el intestino de los peces podrán mantenerse como colonizadores, mientras que el resto actuará como microbiota transitoria. En contraste con los peces de agua salada, la microbiota intestinal de las especies de agua dulce tiende a ser dominada por miembros de los géneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, representantes de la familia *Enterobacteriaceae* y anaerobios

obligados de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* y *Photobacterium* (Izvekova *et al*, 2007).

A diferencia de lo que ocurre con el hombre y los animales terrestres, la microbiota intestinal en peces no existe como una entidad propia, debido a que se presenta una constante interacción con el ambiente circundante (Ringo y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; Hansen, 1999; Lyndom, 1999; Verschuere *et al*, 2000; González *et al*, 2000; Vázquez *et al*, 2003; Hagi *et al*, 2004; Greco *et al*, 2005; Vázquez *et al*, 2005). Cahill (1990) concluye en sus estudios de peces, que la microbiota intestinal está influenciada por la composición microbiana del ambiente acuático. Otro aspecto interesante que se puede tener en cuenta, es el hecho que la microbiota de los peces en los sistemas de cría intensivos, difiere sustancialmente de la presente en ambientes naturales y es afectada por factores tales como nutrientes, técnicas de crianza y desinfección, así como por el uso de antibióticos. Por lo tanto, la composición de la microbiota indígena de las mucosas y epitelios de animales acuáticos depende de factores genéticos, nutricionales y las características fisicoquímicas del ecosistema en el que viven y en el que cumplen las diferentes funciones biológicas (Cahill, 1990, Clements, 1997, Kuz'mina y Skvortsova, 2002).

Kvasnikov *et al* (1977) describió la presencia de lactobacilos y otras BAL en el TGI de varias especies de peces en distintas etapas de cría, en estanques de Ucrania. Sin embargo este trabajo fue discutido y se argumentó que la alimentación artificial habría tenido el principal efecto en la carga microbiana que presentaban los peces. Posteriormente se realizaron numerosos reportes de aislamientos de BAL del intestino de peces, aunque han continuado

predominando los estudios en peces bajo condiciones de cultivo (Ringo *et al*, 1995, Ringo y Gatesoupe 1998, Ringo *et al*, 2000, Bucio *et al*, 2006). El número de estudios de BAL de ambientes y peces marinos han sido menores. Algunos estudios han reportado que las BAL normalmente están presentes en menor proporción que otros microorganismos en muestras de TGI y heces de varias especies de peces (Ringo y Gatesoupe, 1998; Chaiyapechara, 2008; Gatesoupe, 2008).

En la actualidad ha aumentado el interés en el estudio de la presencia y función que cumplen las BAL en sedimentos y organismos marinos, vivos y en descomposición y señalan este medio, como una fuente de BAL con potencialidades biotecnológicas importantes (Ishikawa *et al*, 2003, Toffin *et al*, 2005, Itoi *et al*, 2008).

## **1.2 Estuario de Bahía Blanca**

El mar y en especial las zonas costeras son ricas en biota, viva o muerta, que provee los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos heterótrofos. Si bien se han realizado numerosos estudios ecológicos y taxonómicos sobre bacterias en estas zonas, la mayoría de ellos se centró en el estudio de bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas. Debido a la exigua información existente en nuestro país sobre las BAL provenientes de ambientes acuáticos, en especial del medio marino costero, es que, el primer objetivo de esta tesis es realizar el aislamiento de BAL del Estuario de Bahía Blanca.

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, a continuación se realizará una breve descripción de dicho estuario.



El estuario se encuentra ubicado en la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires, Argentina, entre los 38°42' y 39°26'S y 62°28' y 61°40'O y presenta una longitud aproximada de 100 km (Figura 1.1). Se halla formado por una serie de canales orientados en dirección NO-SE y extensas planicies de mareas e islas, contando con una superficie total de 2.290 km<sup>2</sup>. El canal principal, vía de acceso al complejo portuario más importante de la región, tiene una forma alargada con una longitud total de 68 km y un ancho que varía desde 200 m, en la cabecera, a 4 km en su boca. El aporte de agua dulce lo proporciona principalmente el río Sauce Chico, en la parte más interna, y el arroyo Napostá Grande, en la parte media (Piccolo y Perillo, 1990). El estuario se divide, sobre la base de la distribución de la salinidad y la temperatura, en dos sectores, interno y externo.

El sector interno es de mezcla parcial, con estratificación marcada en las áreas asociadas a la desembocadura de los arroyos, pero con una fuerte tendencia a ser verticalmente homogéneo en condiciones de poca precipitación. Las salinidades varían entre 15 ‰ durante los períodos lluviosos, a 30 ‰ en los períodos secos.

En el sector externo, las salinidades son similares a las de las aguas de plataforma marina (34 ‰), con una distribución vertical homogénea. La temperatura decrece levemente desde la cabecera a la desembocadura, con una distribución vertical homogénea a lo largo de todo el estuario (Piccolo *et al*, 1987). Las temperaturas oscilan entre 6,8 °C y 9,5 °C en invierno, y entre 21,5 °C y 25,7 °C durante el verano, con un patrón de ascenso y descenso suave (Marcovecchio y Ferrer, 2005).



**Figura 1.1** Estuario de Bahía Blanca  
 Amarillo: islas; verde: marismas; celeste; planicies de marea.

La costa del estuario, hasta la cota de 10 m, está ocupada por la estepa halófila, integrada por arbustos, subarbustos y hierbas halófitas, que llegan a confundirse con las especies propias de la estepa pampeana y del bosque xerofítico. Es un sistema con una dinámica natural muy compleja, incluyendo aspectos geológicos, físicoquímicos y biológicos. La clasificación según su rango de marea lo ubica dentro de los estuarios mesomareales.

El estuario de Bahía Blanca cumple un destacado rol en la vida de muchos peces, ya que funciona como área de cría, particularmente en verano y otoño. Los beneficios del estuario como áreas de cría y desarrollo de peces han sido ampliamente descriptos. Entre ellos se pueden citar las condiciones físico-químicas fisiológicamente aptas para el desarrollo de embriones y larvas de peces, la alta disponibilidad de recursos alimenticios y el bajo riesgo de

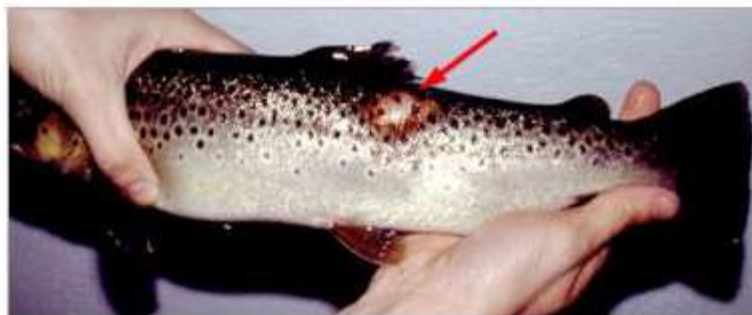
predación, por ausencia de grandes predadores y/o disponibilidad de zonas de resguardo (Lopez Cazorla, 1987). Estas condiciones incrementan la supervivencia, alimentación y tasas de crecimiento de los primeros estadios de vida de los peces. La ictiofauna del estuario está integrada por aproximadamente 30 especies, siendo las más importantes: saraquta (*Ramnogaster arcuata*), pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*), corvina rubia (*Micropogonias furnieri*), pescadilla real (*Macrodon ancylodon*), corvina negra (*Pogonias cromis*), burriqueta (*Menticirrhus americanus*), y pargo blanco (*Umbrina canosai*) (Lopez Cazorla, 1987, 2004; Sardiña, 2004).

### **1.3 Utilización de BAL como control de bacterias patógenas en salmonicultura**

Como se mencionó en la Introducción General, son numerosos los patógenos que pueden afectar la salmonicultura. Para esta tesis, se seleccionaron tres patógenos bacterianos con importante incidencia en el cultivo de trucha arcoíris: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* agente causal de la forunculosis (Jutfelt *et al*, 2006), *Yersinia. Ruckeri*, agente causal de la enfermedad entérica de la boca roja (Hietala *et al*, 1995) y *Lactococcus garvieae*, patógeno que causa grandes pérdidas económicos en el cultivo de peces marinos y de agua dulce (Brunt y Austin, 2005; Vendrell *et al*, 2006).

La forunculosis es una enfermedad septicémica de gran importancia sanitaria, y fundamentalmente económica (Foto 1.1). El principal agente etiológico es una bacteria Gram negativa, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Este microorganismo tiene un amplio rango de hospedadores,

afectando a peces tanto de agua continental como marina, entre ellos la trucha, el salmón y el rodaballo. La bacteria penetra en el pez normalmente a través de abrasiones de la piel, y se disemina vía sanguínea al resto de los órganos, produciendo un cuadro septicémico.



**Foto 1.1** Forunculosis.

La flecha indica la característica formación de forúnculos en la piel de trucha arcoíris. (Foto tomada de “Principales patologías bacterianas en la piscicultura española”, Blanco *et al*, 2004, Revista electrónica de veterinaria RedVet)

Actualmente el patógeno se distribuye mundialmente, con excepción de Australia y Nueva Zelanda. Las cepas atípicas se encuentran principalmente en regiones templadas del hemisferio norte, como Canadá, USA, Japón, centro y norte de Europa, incluyendo los países Nórdicos. Sin embargo, también han sido aisladas en Australia y en el mediterráneo. Es una enfermedad endémica en Chile, país considerado segundo productor mundial de salmónidos, sólo superado por Noruega (González Kartner, 2002; Sernapesca, 2011).

*Yersinia ruckeri* es un microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae* que afecta salmónidos de todas las edades, tanto alevines como adultos. También se ha aislado de otras especies de peces, en los que no tiene importancia como patógeno, pero sí como portadores y por lo tanto, con capacidad de diseminar la bacteria a través de las heces. La transmisión es

básicamente de tipo horizontal, aunque también se puede transmitir a través de la superficie de los huevos. La fuente de infección es fundamentalmente el agua, infectándose los animales a través de las branquias o del tracto gastrointestinal. En Sudamérica la enfermedad entérica de la boca roja (Foto 1.2) es considerada como una de las enfermedades infectocontagiosas de mayor trascendencia en salmónidos, comparable a la forunculosis y su relevancia es tal en nuestra región, que Chile se encuentra desarrollando vacunas contra este patógeno (Chia Ramos, 1998; Sernapesca, 2011).



**Foto 1.2** Yersiniosis o enfermedad de la boca roja.

En la foto A: se observa oscurecimiento de la piel (arriba, trucha arcoíris normal) y en B, hemorragias en la boca. (Fotos tomadas de “Principales patologías bacterianas en la piscicultura española”, Blanco *et al*, 2004, Revista electrónica de veterinaria RedVet)

El proceso septicémico causado por la bacteria Gram positiva *Lactococcus garvieae* (Foto 1.3) ha sido denominado como lactococosis, aunque, desde el punto de vista clínico, se incluye habitualmente bajo el nombre genérico de estreptococosis. Si bien *L. garvieae* afecta a otras especies, como la anguila, es la trucha la más afectada por este patógeno. Desde su descripción inicial en España en el año 1991, se han diagnosticado todos los años brotes de lactococosis, siendo en estos momentos una de las enfermedades infecciosas de mayor repercusión sanitaria y económica en los países Europeos, en especial en el área mediterránea (Blanco *et al*, 2004;

Vendrell *et al*, 2006). En el año 2009, se produce el primer reporte de este patógeno en América del Sur, aislado a partir de tilapia, en un brote de lactococosis en Brasil (Evans *et al*, 2009).

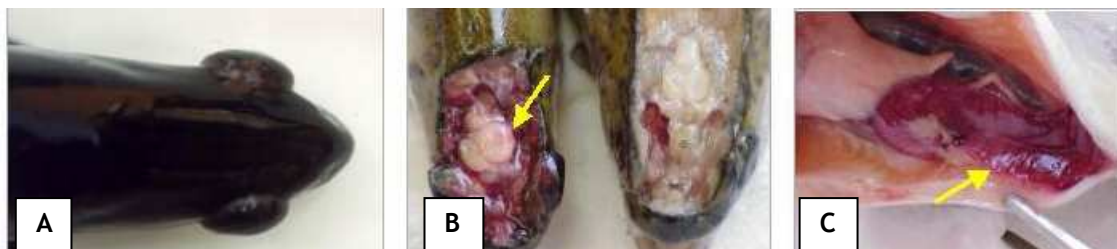


Foto 1.3 Lactococosis.

En la foto A, se observa la exoftalmia típica de esta enfermedad; en B, encefalitis, y en C, enteritis (estas últimas, señaladas con flecha amarilla). (Fotos tomadas de “Principales patologías bacterianas en la piscicultura española”, Blanco *et al.*, 2004, Revista electrónica de veterinaria RedVet).

Ha sido reportado que la administración de BAL, como *Lactobacillus Pediococcus* y *Carnobacterium*, a diferentes especies de peces tienen la capacidad de actuar como agentes de control biológico y promotores de crecimiento. En estos estudios las cepas de BAL demostraron producir en ensayos *in vitro*, compuestos que inhiben a bacterias Gram (+) y Gram (-) (Ringø *et al*, 2005; Balcázar *et al*, 2006b; Merrifield *et al*, 2010b).

Las cepas probióticas pueden producir diferentes metabolitos con actividad antagónica frente a microorganismos patógenos, como ácido láctico, ácido acético y otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo (2,3-butanedione), bacteriocinas, sideróforos y enzimas (Verschuere *et al*, 2000, Irianto y Austin, 2002, Ammor *et al*, 2006; Gatesoupe, 2008;).

La fermentación producida por las BAL se caracteriza por la acumulación de ácidos orgánicos y la reducción concomitante del pH. Los niveles y tipos de ácidos orgánicos producidos durante el proceso de

fermentación dependen de la especie de BAL, la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento. El ácido láctico ejerce actividad antagónica contra muchos microorganismos indeseables y es el principal metabolito producido en la fermentación en las BAL. A pH bajo, una gran cantidad de ácido láctico está en la forma no disociada y es tóxico para muchas bacterias y hongos (ten Brink *et al*, 1994; Zewge, 2006). Otros ácidos orgánicos producidos por las cepas de BAL a través de la vía heterofermentativa (como por ejemplo ácido acético), pueden interaccionar con las membranas celulares y causar la acidificación intracelular y la desnaturalización de proteínas. Desde un punto de vista antimicrobiano, algunos de estos ácidos son más eficaces que el ácido láctico debido a sus altos valores de pKa (por ejemplo, ácido láctico 3,08 y ácido acético 4,75), por lo que a un pH dado, se encuentra mayor porcentaje de las formas no disociadas de estos ácidos con respecto al ácido láctico (Earnshaw, 1992; Zewge, 2006).

El peróxido de hidrógeno es producido por numerosas BAL en presencia de oxígeno. El efecto antimicrobiano del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es debido a la oxidación de grupos sulfhidrilos con la consecuente desnaturalización de enzimas y la peroxidación de los lípidos de la membrana celular. Además es precursor de radicales libres como el anión superóxido, con fuerte actividad bactericida por el daño que produce sobre los ácidos nucleicos (Bykiyczkow y Gessner, 1988; Zewge, 2006).

El dióxido de carbono es producido únicamente por la vía heterofermentativa. Si bien se desconoce su mecanismo de acción como agente antimicrobiano, puede contribuir a crear un ambiente anaeróbico,

alterando la decarboxilación enzimática y la permeabilidad de las membranas celulares (Eklund, 1984; Zewge, 2006).

Las bacteriocinas y otros metabolitos relacionados, son compuestos de naturaleza peptídica producidos por numerosas BAL que ejercen, en general, su efecto antimicrobiano por incremento de la permeabilidad de la membrana celular (Zewge, 2006).

En la introducción general de esta tesis, se mencionan los criterios a seguir para seleccionar candidatos probióticos para su utilización en acuicultura. Un efecto esperado de los probióticos y que forma parte de los criterios de selección, es la capacidad de ejercer antagonismo frente a microorganismos indeseables. Es por este motivo que una de las primeras etapas en la selección de un potencial probiótico es realizar ensayos *in vitro* de antagonismo, en el que los patógenos son expuestos a los candidatos probióticos o sus productos extracelulares, ya sea en medios líquidos o en medios sólidos (Chythanya *et al*, 2002; Gusils *et al*, 2002; Brunt y Austin, 2005; Ringø *et al*, 2005 y 2010; Balcázar *et a.*, 2006a y 2007c;).



### **Primera Hipótesis parcial**

Las cepas BAL aisladas del intestino de peces y sedimentos del estuario de Bahía Blanca poseen la capacidad de inhibir patógenos de salmónidos.

### **Objetivos**

Aislar e identificar BAL del estuario de Bahía Blanca y realizar una primera selección estudiando su capacidad inhibitoria frente a microorganismos patógenos de salmónidos.

---

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Medios de cultivo

En esta etapa del estudio se utilizaron los siguientes medios de cultivo (la composición de los mismos se detalla en el Anexo):

- **Caldo MRS de pH 5.6 y 4.7:** caldo De Man, Rogosa y Sharpe (BK 070HA, diagnóstico Biokar, Beauvais, Francia) (De Man y *et al*, 1960), modificando el pH en cada caso con ácido acético 1N.

- **Caldo MRS modificado:** caldo MRS preparado a partir de sus componentes, sin el agregado de acetato de sodio y citrato diamónico. El pH se ajustó a 8.0 con una solución 1 N de NaOH. Este medio ha sido recomendado para el aislamiento de *Carnobacterium* sp. (Schillinger y Holzapfel 1995, González *et al*, 2000).

- **Agar Plate Count (PCA)** (105.463, Merck, Darmstadt, Alemania), pH 7,0.

- **Caldo Tripticasa de soja (CTS)** (105.458, Merck, Darmstadt, Alemania), pH 7,0.

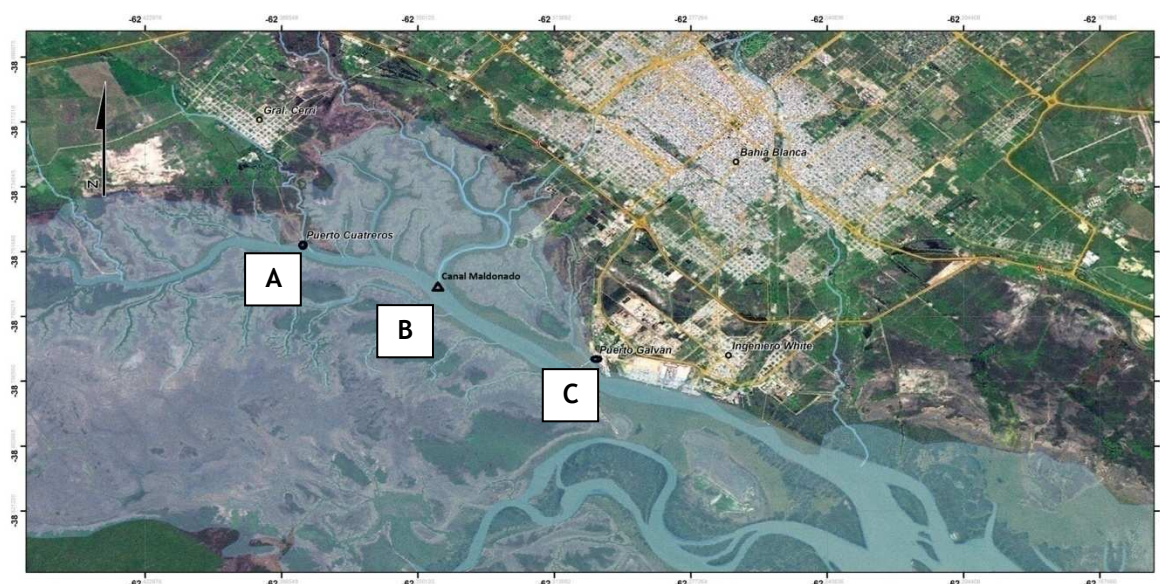
- **Agar tripticasa de soja (ATS)**, CTS con el agregado de 1,2 % de agar-agar purificado (1614, Merck, Darmstadt, Alemania), pH 7,0.

### 2.2 Aislamiento e identificación de BAL

#### 2.2.1 Toma de muestras y aislamiento de BAL

Las muestras de sedimentos superficiales (primeros 10 cm) se obtuvieron desde una embarcación con una draga de arrastre bentónico, de tres sitios ubicados en la zona interna del Canal Principal del estuario de Bahía Blanca correspondientes a Puerto Galván, entrada del Canal Maldonado

y Puerto Cuatrerros (Figura 1.2), sitios a los cuales se accedió en dos oportunidades: mayo y diciembre de 2008. Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno estéril (Nasco Whirl Pak™), transportadas al laboratorio a 4 °C y procesadas dentro de las 24 h del muestreo. Diez gramos de sedimentos se suspendieron en 90 mL de solución salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) y se homogeneizaron en un agitador orbital a 450 rpm durante 10 min. Alícuotas de 10 mL de las suspensiones de los sedimentos se inocularon en 100 mL de caldo MRS pH 4.7, caldo MRS pH 5.6 y en caldo MRS modificado. Todos los caldos se incubaron a 25 °C durante 48 h en forma estática.



**Figura 1.2** Localización sitios de muestreo de sedimentos.  
A: Puerto Cuatrerros; B: canal Maldonado y C: Puerto Galván.

Los peces costeros fueron recolectados en forma artesanal según normas estándares de pesca, del Canal Principal del estuario de Bahía Blanca. Se guardaron en bolsas estériles, se trasladaron refrigeradas a 4°C hasta el laboratorio y se procesaron inmediatamente. Las muestras incluyeron dos especies de la familia *Scianidae*: pescadilla, *Guatucupa cynoscion* (5 ejemplares juveniles) y corvina, *Micropogonias furnieri* (5 ejemplares

juveniles), y dos especies de la familia *Clupeidae*: saraqita, *Ramnogaster arcuata* (10 ejemplares adultos) y saraca, *Brevoortia aurea* (5 ejemplares juveniles). A excepción de cinco ejemplares adultos de *Ramnogaster arcuata*, que fueron recogidas en el mes diciembre de 2008, el resto de las muestras de peces fueron recolectadas en mayo del mismo año. Los especímenes fueron diseccionados asépticamente. El intestino de cada pescado se homogeneizó con 25 mL de solución salina estéril con perlas de vidrio en un agitador orbital a 450 rpm durante 10 min. Alícuotas de 5 mL de las suspensiones de cada muestra, se inocularon en 100 mL de caldo MRS pH 4.7, caldo MRS pH 5.6 y en caldo MRS modificado. Los caldos se incubaron a 25 °C durante 48 h (Kandler y Weiss, 1986; Gómez-Gil *et al*; 2000; Vázquez *et al*, 2003; Tharmaraj *et al*, 2003; Hagi *et al*, 2004; Vine *et al*, 2004a).

Para el aislamiento de BAL, a partir de las muestras enriquecidas en los caldos, se realizaron diluciones decimales en solución salina estéril y se sembraron en agar MRS pH 5,6 y pH 4,7 y en agar MRS. Estos medios se prepararon adicionando el caldo correspondiente con 1,2 % agar v/v (1614, Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas se incubaron a 25 °C durante 72 a 96 h, con tensión disminuida de O<sub>2</sub>. La temperatura de incubación seleccionada fue de 25 °C debido al origen de las muestras, a fin de no generar o de evitar el estrés por temperatura ya que en el estuario difícilmente se superan los 26 °C.

Luego de la incubación, se estudiaron las colonias bacterianas de las placas que contenían hasta 300 unidades formadoras de colonias (UFC), se separaron en función de las características culturales (forma, tamaño, color, elevación y bordes de las colonias) y su respuesta a la coloración de Gram

(González *et al*, 2000; Ammor *et al*, 2005; Greco *et al*, 2005; Bucio *et al*, 2006; Itoi *et al*, 2008). Las colonias presuntivas se reaislaron en el respectivo agar MRS. Los aislamientos se seleccionaron en función a la respuesta a la tinción de Gram, la producción de las enzimas catalasa y la presencia de citocromo oxidasa. (Ver Anexo).

Las cepas seleccionadas fueron mantenidas a -70 °C en caldo MRS pH 6,5 suplementado con 20 % v/v de glicerol.

### 2.2.2 Identificación molecular de BAL

El ADN de las cepas seleccionadas se extrajo a partir de cultivos en caldo MRS utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, WI). La secuencia del gen que codifica a ARNr 16S (correspondientes a las posiciones 27-1492 del gen en *Escherichia coli*) fue amplificada por PCR de acuerdo a la descripción de DeLong (1992), utilizando Multigene Gradient thermal cycler (Labnet International Inc., Woodbridge, New Jersey). Este estudio se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional Patagónico (CENPAT). La secuenciación de ambas hebras de fragmentos amplificados por PCR se realizó con el método de cadena terminal didesoxi por parte de los Servicios Comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias del gen ARNr 16S se compararon con la base de datos de nucleótidos del GenBank utilizando los programas BLAST (Altschul *et al*, 1990) y EzTaxon (Chun *et al*, 2007). Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank, registradas con los números de acceso del FJ892726 al FJ892746 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para la detección de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar (Mishra y Prasad, 2005, Balcázar *et al*, 2006b, Van Hai *et al*, 2007). Las cepas de patógenos indicadores empleadas en este experimento fueron: *Yersinia ruckeri* ATCC 29473, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y dos cepas *Lactococcus garvieae*, correspondientes a aislamientos clínicos 03/8460 y 03/8702 (estas dos últimas cepas fueron amablemente proporcionadas por el Dr. José Francisco Fernández Garayzabal de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España).

*Listeria monocytogenes*, *Y. ruckeri* y *L. garvieae* se cultivaron en CTS a 35 ° C durante 24 h; *A. salmonicida* se cultivó en CTS a 25°C durante 30 h.

Las cepas BAL fueron cultivadas en 10 mL de caldo MRS pH 6,5 durante 48 horas a 25 °C. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 2.000 x g (Labofuge 200, Kendra, Germany) durante 15 min. y se filtraron utilizando membranas de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore, EE.UU.). Ocho mililitros de cada sobrenadante libre de células, se dividió en tres alícuotas: 2,5 mL fueron neutralizados (pH 6.8) con NaOH 5 N, 2,5 mL fueron neutralizados y tratados con 1000 U/mL de enzima catalasa (EC 1.11.1.6; bovine liver, Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 25 °C y la porción restante se utilizó sin tratar (extracto crudo) (Juárez *et al*, 2004 y 2003). Tubos con 20 ml de PCA fundido y enfriado a 48 °C, se inocularon con 200 µL con cada cultivo de *Y. ruckeri*, *L. monocytogenes* y *L. garvieae*, ajustados a una densidad óptica de 0,250 a 550 nm (DO<sub>550</sub>) (~ 10<sup>8</sup> células/mL), se mezclaron y plaquearon en cajas de Petri estériles. Una vez solidificado, se

realizaron en el agar pocillos de 5 mm de diámetro con pipetas de vidrio estériles tipo Pasteur. Los pocillos se llenaron con 35  $\mu$ L de cada sobrenadante de BAL, libre de células: a) extracto crudo, b) neutralizado y c) neutralizado y tratado con catalasa. Como control negativo, se utilizó caldo MRS pH 6,5 sin inocular, tratado de igual manera que los sobrenadantes de BAL, para descartar la posible actividad inhibitoria del medio. Las placas fueron colocadas a 4 °C durante 12 h para permitir la difusión de los sobrenadantes en el agar y posteriormente se incubaron a 35 °C durante 48 h. El diámetro de la zona de inhibición (zona clara alrededor de cada pocillo) se registró en milímetros con un calibre tipo Vernier.

Para *A. salmonicida* se realizaron modificaciones del ensayo de difusión antes descrito. Estas modificaciones consistieron principalmente en realizar la siembra en superficie y en la temperatura de incubación, debido a que este microorganismo crece pobremente con tensión disminuida de oxígeno, tiene temperatura óptima de crecimiento entre 22 y 25 °C, y no tolera temperaturas superiores a los 35°C (Tadese *et al*, 2005; Janda y Abbott, 2010). Se utilizó ATS, puesto que con este medio de cultivo, se obtuvo el mejor desarrollo de la cepa. Una alícuota de 100  $\mu$ L de una suspensión de *A. salmonicida* en solución salina, OD<sub>550</sub> de 0,125 (equivalente aproximadamente a 10<sup>6</sup> células/mL), se diseminó en superficie con una espátula de Drigalsky estéril en ATS; las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 15 min, para permitir la absorción de la suspensión en el agar. Posteriormente, sobre la superficie del agar, se colocaron discos de papel de filtro estériles de 1 mm de espesor y 5 mm de diámetro. Los discos se impregnaron con 35  $\mu$ L de sobrenadantes tratados y no tratado, utilizando los

mismos controles de caldo MRS, explicado anteriormente (Balcázar *et al*, 2008). Las placas se colocaron a 4 ° C durante 12 h para permitir la difusión de los sobrenadantes en el agar. El diámetro de la zona de inhibición (zona clara alrededor de cada disco) se registró en milímetros con un calibre Vernier luego de la incubación a 25 °C durante 48 h.

Cada patógeno fue evaluado por triplicado a partir de tres cultivos independientes de BAL.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento y tipificación de BAL

Se obtuvieron 22 aislamientos de cepas que presuntamente correspondían a BAL, basándose en las características fenotípicas. Todos estos aislamientos correspondieron a cocos, cocobacilos y bacilos, Gram positivos, no formadores de esporas, oxidasa y catalasa negativas. Todos las presuntas BAL fueron aisladas en MRS pH 5,6 y 4,7. Ningún aislamiento con características de BAL se obtuvo a partir de MRS modificado, lo que indica la no recuperación de *Carnobacterium* sp. La Tabla 1.1 muestra el origen de cada cepa aislada.

**Tabla 1.1** Cepas de bacterias del ácido láctico aisladas de sedimentos y peces del estuario de Bahía Blanca

Aislamiento	Origen	Mes (Temperatura del agua °C)
F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 <sup>a</sup>	<i>Ramnogaster arcuata</i> <sup>c</sup>	Diciembre (22°C)
F11, F12	<i>Ramnogaster arcuata</i> <sup>c</sup>	Mayo (9°C)
F8, F9	<i>Cynoscion guatucupa</i> <sup>d</sup>	Mayo (9°C)
F10	<i>Brevoortia aurea</i> <sup>d</sup>	Mayo (9°C)
F13	<i>Micropogonias furnieri</i> <sup>d</sup>	Mayo (9°C)
S14 <sup>b</sup>	Puerto Galván	Diciembre (22°C)
S19, S22	Puerto Galván	Mayo (9°C)
S15	Canal Maldonado	Diciembre (22°C)
S20, S21	Canal Maldonado	Mayo (9°C)
S16, S17	Puerto Cuatrerros	Diciembre (22°C)
S18	Puerto Cuatrerros	Mayo (9°C)

<sup>a</sup>F: Aislada de peces, <sup>b</sup>S: Aislada de sedimentos

<sup>c</sup> Adultos, <sup>d</sup> Juveniles

**Tabla 1.2** Filiación taxonómica de los aislamientos de BAL a partir de peces y sedimentos basada en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S

Cepa	( Número de acceso al GenBank	Especie de mayor coincidencia (Número de acceso al GenBank)	Similitud (%)
F1	FJ892726	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	99.7
F2	FJ892732	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171 <sup>T</sup> (D16550)	99.9
F3	FJ892739	<i>Enterococcus hirae</i> CECT 279 <sup>T</sup> (AJ420799)	99.5
F4	FJ892727	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	100.0
F6	FJ892740	<i>Enterococcus hirae</i> CECT 279 <sup>T</sup> (AJ420799)	99.9
F7	FJ892728	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	100.0
F8	FJ892744	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <sup>T</sup> (CP000414)	99.9
F9	FJ892729	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	100.0
F10	FJ892730	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	100.0
F11	FJ892731	<i>Weissella viridescens</i> NRIC 1536 <sup>T</sup> ( <a href="#">AB023236</a> )	100.0
F12	FJ892745	<i>Leuconostoc citreum</i> KM20 (DQ489736)	99.9
F13	FJ892746	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 <sup>T</sup> (CP000414)	99.9
S14	FJ892733	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558 <sup>T</sup> (D79211)	99.9
S15	FJ892734	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558 <sup>T</sup> (D79211)	100.0
S16	FJ892735	<i>Lactobacillus graminis</i> DSM 20719 <sup>T</sup> (AM113778)	99.7
S17	FJ892737	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 <sup>T</sup> (AJ305321)	99.7
S18	FJ892738	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM 20336 <sup>T</sup> (AJ305321)	99.7
S19	FJ892736	<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558 <sup>T</sup> (D79211)	99.9
S20	FJ892741	<i>Enterococcus mundtii</i> CECT972 <sup>T</sup> (AJ420806)	99.9
S21	FJ892742	<i>Enterococcus mundtii</i> CECT972 <sup>T</sup> (AJ420806)	99.9
S22	FJ892743	<i>Enterococcus durans</i> CECT411 <sup>T</sup> (AJ420801)	99.7

Para identificar las cepas BAL aisladas, se analizaron las secuencias correspondientes al gen que codifica para el ARNr 16S (~ 1400 pb). Las BAL predominantes de los aislamientos a partir de las especies de peces pertenecieron al género *Weissella* (F1, F4, F7, F9, F10 y F11), con un 99,7 a 100 % de homología en la secuencia de ADNr 16S con *W. viridescens* (*Lactobacillus viridescens sensu*, Collins *et al*, 1993). El resto de los aislamientos a partir de peces mostraron valores de homología de ADNr 16S por encima del 99 % con *E. hirae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum* y *Lb paracasei*. La cepa F5 no se incluye en la Tabla 1.2 ya que por problemas metodológicos no pudo ser secuenciada. Para las cepas provenientes de sedimentos, se obtuvieron homologías superiores a 99 % con *Lb. pentosus*, *Lb. graminis*, *P. pentosaceus*, *E. mundtii* y *E. durans* (Tabla 1.2).

### 3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La Tabla 1.3 muestra la actividad inhibitoria de los sobrenadantes crudos y neutralizados de BAL, libres de células, frente a *L. monocytogenes* y tres patógenos de salmónidos. Todas las cepas BAL ensayadas presentaron actividad inhibitoria con el extracto crudo sobre *L. monocytogenes* y *Y. ruckeri* y solo un 68,2 % frente al crecimiento de *A. salmonicida*. *Lactococcus garvieae* 03/8460 fue inhibido por el extracto crudo del 86,4 % de las cepas BAL y un 90,1 % de las mismas, presentó actividad inhibitoria frente a la cepa 03/8702.

**Tabla 1.3** Actividad antimicrobiana de las cepas de bacterias BAL aisladas del Estuario de Bahía Blanca

Cepa	<i>L.monocytogenes</i>		<i>Y.ruckeri</i>		<i>A.salmonicida</i>		<i>L.garvieae</i> 03/8702		<i>L.garvieae</i> 03/8460	
	Halo de inhibición <sup>a</sup>									
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
F1	+	-	++	-	+	-	+	-	+	-
F2	+++	+	+++	+	+	-	++	+	+	-
F3	++	-	++	-	-	-	+	+	+	-
F4	++	+	+++	+	++	-	++	+	++	+
F5	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
F6	++	-	++	-	-	-	+	-	+	-
F7	++	-	++	+	+	-	-	-	-	-
F8	+	+	++	+	-	-	++	+	+	-
F9	+	-	++	+	+	-	+	-	+	-
F10	+	-	++	-	+	-	+	-	+	-
F11	+	-	+++	-	+	-	++	-	+	-
F12	++	-	+++	+	-	-	-	-	+	-
F13	++	+	+++	+	-	-	+	-	+	-
S14	+++	+	+++	++	++	+	++	-	+	-
S15	+++	+	+++	++	+	-	++	-	+	-
S16	+++	-	+++	-	-	-	++	-	+	-
S17	+++	+	+++	+	++	-	+	+	+	-
S18	+++	++	++	++	++	-	+	-	+	-
S19	+++	++	+++	++	++	-	+	+	+	-
S20	+++	+++	+++	-	+	-	++	+	++	-
S21	+++	+++	+++	-	+	-	+	+	++	-
S22	++	-	++	-	-	-	+++	++	++	+

<sup>a</sup>Halo claro: + = 6.0 - 10 mm, ++ = 10.1 - 15.0 mm, +++ = más de 15.0 mm  
A: Sobrenadante sin tratamiento (crudo), B: Sobrenadante neutralizado

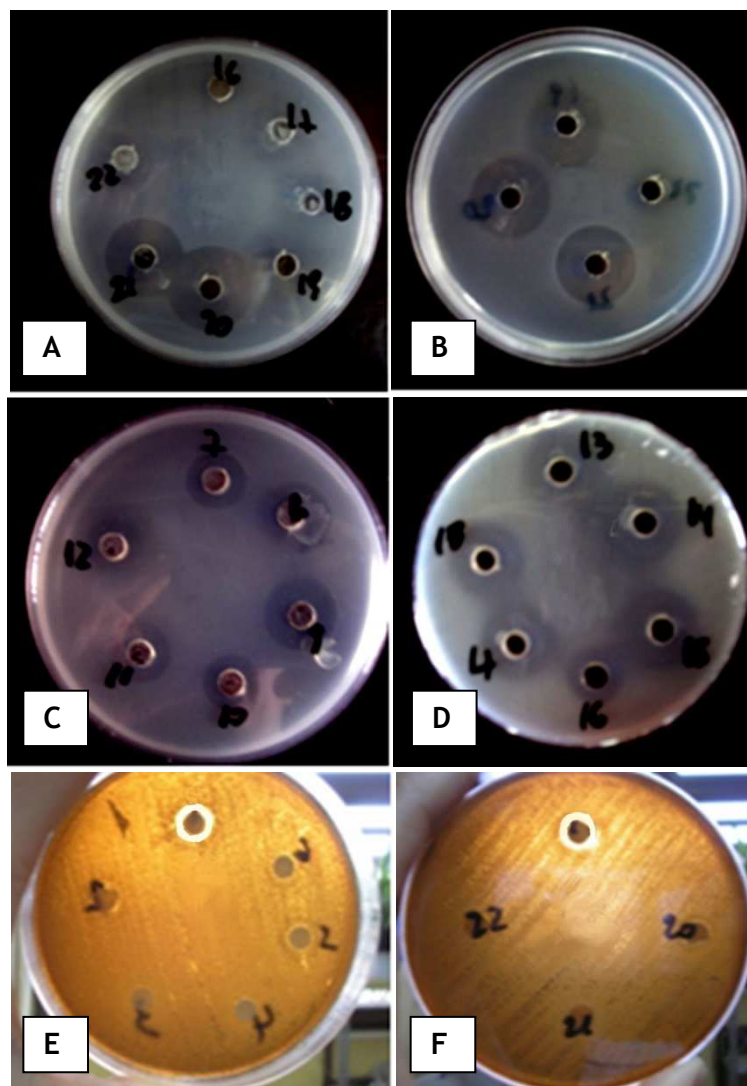
Los sobrenadantes neutralizados del 50 % de las cepas de BAL, mantuvieron su actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes*, 54,5 % contra *Y. ruckeri*, 4,5 % contra *A. salmonicida*, 40,9 % contra *L. garvieae* 03/8702 y 9,1 % contra *L. garvieae* 03/8460. Ninguna de las cepas ensayadas conservó su actividad antimicrobiana luego del tratamiento con enzima catalasa. En la Tabla 1.4, se especifica el criterio a seguir para interpretar los resultados en los ensayos de inhibición (Juárez Tomás *et al*, 2003 y 2004).

**Tabla 1.4** Interpretación de ensayos de inhibición por técnicas de difusión en placa

Tratamiento del sobrenadante	Halo de inhibición	Metabolito con efecto inhibitorio
Neutralizado	Presente	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> o bacteriocinas
	Ausente	Ácidos orgánicos
Neutralizado + tratamiento con catalasa	Presente	Bacteriocinas
	Ausente	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Tabla extractada de *Methods in Molecular Biology. Public Health Microbiology* (Juárez Tomás *et al*, 2004).

En la Foto 1.4 (A a F), se observan los halos de inhibición para los diferentes tratamientos ensayados para evaluar la actividad antimicrobiana de la cepas BAL aisladas del estuario de Bahía Blanca.



**Foto 1.4** Ensayos de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar, utilizando sobrenadantes de cultivos libres de células. Se observan los halos de inhibición. A: antagonismo frente a *L. monocytogenes*; B: frente a *L. garvieae* C y D: frente a *Y. ruckeri*; E y F, frente a *A. salmonicida*. A, C, E y F, corresponde a los ensayos con los sobrenadantes crudos; B y D, sobrenadantes neutralizados.

## 4 DISCUSIÓN

Es importante destacar, que las muestras de peces analizadas correspondieron a especies que desovan, nacen y crecen, al menos hasta la etapa juvenil, en el estuario de Bahía Blanca, con la excepción *Ramnogaster arcuata* que cumple todo su ciclo de vida en el estuario (López Cazorla, 1987, 2004; Sardiña, 2004).

La microbiota de los peces se ve afectada por factores nutricionales, fisiológicos, ambientales y además, se espera que la población microbiana de estos organismos pueda variar según la especie. Algunos autores han considerado que la época del año podría ser un factor decisivo en la variación de esta microbiota (Hagi *et al*, 2004). Bucio *et al* (2006) observaron cambios estacionales de lactobacilos en el intestino de los peces de agua dulce, con los más altos recuentos en el verano y casi una ausencia en invierno. Hagi *et al* (2004) indicaron que es muy probable que los hábitos de alimentación no tengan una influencia significativa en la composición de BAL en los peces, cuando las especies crecen en las mismas condiciones.

En este estudio se observó que todas las especies de peces capturadas durante el mes de mayo tuvieron una composición similar en BAL, representada por dos especies de *Leuconostoc* y *W. viridescens*. Las muestras correspondientes a *R. arcuata* obtenidas en el mes de diciembre mostraron una composición diferente de BAL, excepto por la presencia de *W. viridescens* (Tablas 1.1 y 1.2). Los aislamientos realizados de *R. arcuata* mostraron menor diversidad de BAL en el mes de mayo con respecto a diciembre. Este resultado es coincidente con aquellos autores que han propuesto a la estación del año, como principal factor de selección (Hagi *et al*, 2004; Bucio *et al*, 2006). Esta

selección podría estar generada por la tanto por la temperatura del agua como por cambios en la alimentación. Sin embargo, es necesario el análisis de un mayor número de peces durante un período más prolongado, con el objetivo de determinar la variación en la composición de BAL en las diferentes especies que crecen en el estuario y su relación con la estación del año.

*Weissella viridescens* fue la especie predominante en los aislamientos realizados a partir de muestras de peces (Tabla 1.2). Si bien varias especies de *Leuconostoc* y *Enterococcus* han sido frecuentemente aisladas del tracto digestivo y de las heces de peces (Ringo *et al*, 1995; Ringo y Gatesoupe 1998; Ringo *et al*, 2000), existe poca información sobre la ocurrencia de *Weissella viridescens* en peces marinos (Leisner *et al*, 1994).

Se observó una composición diferente de los aislamientos de BAL en las muestras de sedimentos, con respecto a los peces, la cual está representada por los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus* (Tabla 1.2).

Teniendo en cuenta el flujo de agua que pasa a través del tracto digestivo se esperaría una fuerte influencia del ambiente externo sobre la microbiota de los peces. Gatesoupe (1999) ha indicado que la mayoría de las bacterias son transitorias en el intestino de peces, con un continuo intercambio de microorganismos procedentes del agua y de los alimentos. Sin embargo, ninguna de las especies de BAL aisladas de peces fue encontrada en los sedimentos. Este resultado llamó la atención ya que, particularmente en el estuario de Bahía Blanca, el intercambio de microorganismos entre el agua y los sedimentos es significativo debido a que la energía de las mareas y la turbulencia afectan la columna de agua, resultando en una elevada concentración de sedimentos en suspensión (Piccolo y Perillo 1990). En base a



los resultados obtenidos, las diferencias observadas en la composición de BAL entre las muestras de peces y de sedimentos, podrían estar indicando adaptaciones específicas para cada entorno. Debido a que no era parte de los objetivos de esta tesis, estos estudios no se extendieron, sin embargo queda planteado el desafío para futuros estudios que permitan extender el conocimiento sobre la ecología de las BAL en el medio acuático.

Los resultados del aislamiento e identificación de BAL consignados en este capítulo constituyen el primer reporte de BAL en un ambiente estuarino, con alta influencia marina, de Argentina (Sica *et al*, 2010) y ha sido citado en una revisión reciente sobre el tema (Lauzon y Ringo, 2011).

La actividad antimicrobiana de las BAL aisladas fue estudiada a través del sobrenadante libre de células contra *L. monocytogenes* y tres patógenos frecuentes de salmónidos. *Listeria monocytogenes* se utilizó debido a que es un microorganismo frecuentemente asociado a productos pesqueros que actúan como vehículos para este patógeno y porque presenta una importante sensibilidad a las bacteriocinas, en particular las de tipo IIa (FAO 1999, Zewge, 2006; Jensen *et al*, 2008, Parihar *et al*, 2008). De acuerdo a la Tabla 1.4, la inhibición observada con el sobrenadante crudo (Tabla 1.3) podría estar principalmente asociada a la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas (Juárez Tomás *et al*, 2004). Cuando se ensayaron los sobrenadante neutralizados disminuyó el número de cepas de BAL con actividad inhibitoria. En este caso, el efecto inhibitorio de los mismos podrían deberse a la presencia de otros compuestos como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Jack *et al*, 1995; Nes *et al*, 1996, 1999; Sugita *et al*, 2002, 2007; Ammor *et al*, 2006). Sin embargo, la actividad

antimicrobiana desapareció cuando se trataron los sobrenadantes neutralizados con enzima catalasa, lo cual indicaría que el efecto inhibitorio podría deberse a la presencia de  $H_2O_2$ . Se sabe que las bacterias Gram negativas utilizadas en estos ensayos (*Y. ruckeri* y *A. salmonicida*) son microorganismos sensibles a los ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, producidos durante los procesos de fermentación de BAL. Como se mencionó anteriormente, las formas no disociadas de estos ácidos, pueden atravesar fácilmente la membrana celular de estos microorganismos y en el citoplasma disociarse con la consiguiente disminución del pH interno, expulsión del interior celular de iones  $H^+$  y desacople final de la bomba  $Na^+-K^+$  ATPasa (Gonçalves *et al*, 1997; Vázquez *et al*, 2005). Este hecho se vio reflejado en que 10 de 22 cepas BAL ensayadas, perdieron su efecto inhibitorio sobre *Y. ruckeri* y 14 de 15 cepas BAL sobre *A. salmonicida*, cuando el sobrenadante fue neutralizado. Si bien se esperaría que el género *Aeromonas* presentara una sensibilidad al ácido similar a *Y. ruckeri*, algunos autores han reportado la resistencia de *A. salmonicida* a los ácidos orgánicos en ensayos con extractos de BAL (Nikoskelainen *et al*, 2001).

Con respecto a *Listeria monocytogenes*, el 50 % de las cepas BAL ensayadas perdió su actividad inhibitoria luego de la neutralización del sobrenadante. Si bien se esperaría una mayor resistencia de esta especie al ácido láctico, algunos autores demostraron que la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta contribuyen a la fluidificación de la membrana celular de *L. monocytogenes*, por modificación en la composición de los ácidos grasos que forman parte de la doble capa lipídica de la membrana (Tokarsky y Marshall, 2008).

Muchos autores han reportado la producción de peróxido de hidrógeno durante el metabolismo de BAL (Juárez Tomás *et al*, 2004; Balcázar *et al*, 2006b; Otero y Nader Macías, 2006; Ammor *et al*, 2007; Balcázar *et al*, 2007c; Gatesoupe, 2008; Jung *et al*, 2009; Pasteris *et al*, 2009; Thirabunyanon, 2011). Como se mencionó anteriormente, el peróxido de hidrógeno es producido por BAL en presencia de oxígeno como resultado de la acción de oxidasas. El efecto antimicrobiano del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto para bacterias Gram positivas como para Gram negativas, resulta de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de enzimas, lo que provoca su desnaturalización y de la peroxidación de los lípidos de membrana lo que aumenta su permeabilidad. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede actuar como un precursor para la producción de radicales libres tales como los aniones superóxido e hidroxilo, ejerciendo su acción bactericida por dañar el ADN (Bykiyczkow y Gessner, 1988; Ammor *et al*, 2006; Zewge, 2006). Se ha reportado que *A. salmonicida* es capaz de producir una enzima catalasa en la membrana celular, inducible por la presencia de peróxido de hidrógeno exógeno, lo cual contribuiría a su resistencia a este metabolito y explica la baja sensibilidad observada a los extractos neutralizados (Barnes *et al*, 1999; Díaz Rosales *et al*, 2003).

Se puede concluir que la presencia de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, solos o actuando sinérgicamente, fueron los responsables de la inhibición de *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* y *L. monocytogenes*.

Un caso particular, fueron los resultados obtenidos en la inhibición de las dos cepas utilizadas de *L. garvieae*. Esta bacteria pertenece al grupo de BAL, por lo que fue sorprendente observar la pérdida de antagonismo de muchas cepas BAL cuando los sobrenadantes crudos fueron neutralizados y

neutralizados con posterior tratamiento de enzima catalasa, sugiriendo por lo tanto, que los ácidos producidos durante la fermentación y/o la presencia de peróxido de hidrógeno fueron los principales responsables de la inhibición. Pérez-Sánchez *et al* (2011) reportaron el aislamiento de 11 cepas de BAL de trucha arcoíris con efecto inhibitorio sobre *L. garvieae* cuando se ensayaron los extractos crudos y neutralizados; sin embargo, en solo 3 de ellas se pudo comprobar la presencia de metabolitos de naturaleza peptídica por su sensibilidad a los tratamientos con proteasas, asumiendo que en el resto de las cepas, el efecto inhibitorio podría deberse a la presencia de ácidos y/o peróxido de hidrógeno. También se sabe que las cepas de *L. garvieae* aisladas de alimentos, tienen características fenotípicas diferentes a las cepas aisladas de peces y se ha reportado a estas últimas como cepas lentas fermentadoras (Fortina *et al*, 2006 y 2009; Ricci *et al*, 2012). Teniendo en cuenta estos reportes, se determinaron los pH de todos los sobrenadantes crudos de las BAL ensayadas y las dos cepas de *L. garvieae* (datos no mostrados) cultivados en caldo MRS en las mismas condiciones. El pH de los sobrenadantes de las BAL fue de 4,0 mientras que los de las cepas de lactococos fue de 5,0 a 5,5. Si bien sería interesante confirmar estos hallazgos, podría sugerirse que las cepas de estos patógenos serían sensibles los ácidos orgánicos a pH menores a 5,0.

El objetivo principal de esta etapa fue seleccionar cepas de BAL que presentaran actividad antagónica en el extracto crudo frente a los microorganismos indicadores seleccionados. Sin embargo, sería importante continuar los estudios a fin de confirmar los metabolitos responsables del efecto inhibitorio observado.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo una primera selección de candidatos probióticos es en base a las pruebas de antagonismo frente a patógenos frecuentes de la especie a cultivar. En función de este criterio, se decidió seleccionar aquellas cepas de BAL que presentaran actividad inhibitoria en el extracto crudo sobre el crecimiento de los patógenos de salmónidos utilizados. En base a los resultados obtenidos en este capítulo en cuanto a la potencialidad antimicrobiana, a la identificación y a los antecedentes en la bibliografía se seleccionaron 12 cepas de BAL: F2, F4, F9, F10, F11, S14, S15, S17, S18, S19, S20, S21, para continuar los estudios que permitieran conocer la presencia de propiedades probióticas a fin de considerar su potencial para ser aplicada en los ensayos *in vivo* con trucha arcoíris (Capítulos 2 y 3).

## **CAPÍTULO 2**

### **Caracterización de las propiedades probióticas de bacterias lácticas aisladas del estuario de Bahía Blanca**

## 1 INTRODUCCIÓN

Con el desarrollo de la acuicultura a escala comercial, se ha puesto de manifiesto que las enfermedades infecciosas son un factor limitante del crecimiento del sector (Austin y Austin, 1999; Nepal *et al*, 2007; Balcázar *et al*, 2008). En la actualidad las principales alternativas son la utilización de vacunas, quimioterápicos y los probióticos.

Las bacterias probióticas han sido introducidas como aditivos en alimentos debido a su contribución en el mejoramiento de la salud del hombre, de los animales de granja y como agentes de control biológico en la acuicultura (Verschuere *et al*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al*, 2008; Gatesoupe, 2008). Merrifield *et al* (2010a) proponen una amplia lista de criterios para la selección de posibles cepas probióticas para su aplicación en la acuicultura, algunos de los cuales son esenciales y mientras que otros son considerados como meramente favorables, como se indicó en la Introducción General.

Los probióticos pueden proporcionar una forma alternativa para reducir el uso de los antibióticos en la acuicultura y evitar el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos, reduciendo la incidencia de la enfermedad o la severidad de los brotes de las mismas.

En el capítulo anterior se describió el aislamiento de cepas BAL del intestino de peces y sedimentos procedentes del Estuario de Bahía Blanca. Además se inició la selección de potenciales probióticos estudiando el efecto inhibitorio de las cepas BAL aisladas, frente a microorganismos patógenos de salmónidos.

Sin embargo, cuando se seleccionan microorganismos probióticos se deben cumplir muchos criterios. Entre ellos, la adhesión a superficies mucosas

se considera uno de los principales criterios de selección de nuevas cepas de probióticos. La razón original para el estudio de la adhesión de cepas probióticas es la hipótesis de que una cepa adherente fácilmente puede colonizar las superficies mucosas (Ouwehand y Salminen, 2003). Como primer paso en la colonización del hospedador, los microorganismos, incluyendo las cepas probióticas, deben ser capaces de adherirse al mucus que recubre el tejido epitelial, a las células epiteliales o a ciertos constituyentes del tejido conectivo o membrana basal (colágeno, fibronectina, etc.), a través de interacciones inespecíficas entre la bacteria y su hospedador, como interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o formación de puentes hidrógeno. Más tarde, otros componentes, como adhesinas, proteínas, ácidos lipoteicoicos, proteína S y polisacáridos de la superficie de las bacterias, facilitan una unión más estable a las superficies mucosas del hospedador. Una vez que el probiótico se ha adherido a la superficie mucosa, puede formar un biofilm protector, en el cual se expresarían propiedades que difieren notablemente de sus formas planctónicas (Mozzi *et al*, 2010). Varios factores pueden influir en los procesos de adhesión y colonización, lo que refleja propiedades relacionadas con la bacteria, con la célula epitelial productora de mucus y con factores exógenos, como el microambiente en el que ocurre el proceso. El primer paso importante en el proceso de adhesión es la atracción quimiotáctica de las bacterias a la superficie de la mucosa. Esto es seguido por la penetración y la captura dentro de la mucosa, pasiva o activamente, promovido por la motilidad y la quimiotaxis bacteriana, incluyendo la adherencia específica a los receptores en la mucosa epitelial (Hansen y Olafsen, 1999).



Los probióticos desarrollan mecanismos de protección contra los patógenos a través de la competencia por sitios de unión y por los nutrientes, el bloqueo de receptores específicos y/o impedimento estérico, producción de compuestos antimicrobianos y/o la modulación de la respuesta inmune.

En los organismos acuáticos el intestino no es el único sitio para colonizar. Contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de los sistemas terrestres, donde el intestino representa un hábitat húmedo inmerso en un ambiente deficiente en agua, en los sistemas acuáticos los microorganismos tienen la opción de vivir en asociación con diferentes superficies u órganos del hospedador potencial: tracto intestinal, branquias o piel (Verschuere, 2000), debido al contacto permanente con el agua, principal vehículo de muchos patógenos. La superficie externa del cuerpo de la trucha arcoíris constituye la primera barrera defensiva contra la invasión de microorganismos extraños, la misma está cubierta por una capa de mucus, secretado por células caliciformes especializadas, localizadas en la epidermis (Pickering, 1974). Esta superficie mucosa está relacionada con varias actividades importantes, como osmorregulación, locomoción, protección mecánica, y actividad antibacteriana, tales como la prevención de la colonización de patógenos, por competencia con la microbiota presente en el mucus. Puesto que la superficie corporal de estos organismos es una de las principales puertas de entrada para los patógenos, la adhesión bacteriana a mucus superficial es un requisito esencial para la infección por diferentes bacterias patógenas y por lo tanto, su capacidad de adhesión se considera un factor de virulencia clave (Bordas *et al*, 1996; Chabrilón *et al*, 2005 a, b; Jutfelt *et al*, 2006; Tobback, 2009; Yan *et al*, 2010). La piel, las branquias y el intestino son las principales vías de

---

infección que se han sugerido para *A. salmonicida*, *Y. ruckeri* y *Lc. garvieae* (Jutfelt *et al*, 2006; Vendrell *et al.*, 2006; Tobback, 2009; Yan *et al*, 2010). En general, los peces criados bajo sistemas de cultivos, a menudo producen una mayor cantidad de moco en respuesta a agresiones externas, que se cree que estimula la función de barrera mediante la prevención de contacto físico y la interacción con agentes patógenos. Hay varios factores que actúan en este mecanismo de defensa, como las inmunoglobulinas, complemento, lisozima, aglutininas y también el desprendimiento continuo de moco. Los daños traumáticos en la piel o la erosión de la capa mucosa pueden afectar esta línea de defensa y el desprendimiento inadecuado de moco puede dar lugar a la proliferación de bacterias en la superficie corporal (Hansen y Olafsen, 1999).

El mucus en el intestino tiene una función similar al del moco de la piel, pero hay otras interacciones complejas asociadas con la absorción de nutrientes de los alimentos, la producción de varios factores que ayudan a la digestión, el establecimiento de una microbiota normal en el entorno del intestino y la regulación de los mecanismos de defensa inmunológica (Kim *et al*, 2007; Cain and Swan, 2011).

Sobre la base de lo dicho anteriormente, es importante conocer la capacidad potencial que las bacterias probióticas poseen para adherirse al mucus de la piel de los peces y su capacidad para competir con microorganismos patógenos en este ambiente (Nikoskelainen *et al*, 2001; Ibrahim *et al*, 2004; Yan *et al*, 2010; Raj *et al*, 2011; Cain and Swan, 2011).

Las características de superficie de las células bacterianas, como la capacidad de adhesión, producción de biosurfactantes y capacidad de auto y

coagregación, pueden estar involucrados en la formación de biofilms (Lepargneur y Rousseau, 2002). La adhesión y/o la formación de biofilms de los probióticos sobre superficies mucosas, puede prevenir la entrada de microorganismos patógenos por un mecanismo de exclusión competitiva, ya sea porque están involucradas interacciones específicas o a través de un impedimento estérico, en el cual interacciones inespecíficas se establecen entre las células bacterianas y su hospedador (Lee *et al.*, 2003; Zárate y Nader Macías, 2006; Mozzi *et al*, 2010).

La agregación entre los microorganismos de la misma cepa (autoagregación), o entre diferentes especies y cepas (coagregación), así como su capacidad para desplazar a los patógenos, son propiedades importantes de organismos probióticos y pueden presentar una ventaja sobre microorganismos no agregantes. La interacción de los microorganismos probióticos con la microbiota normal de estas superficies es una propiedad importante para el éxito, en términos de la colonización y la persistencia a largo plazo. Se ha sugerido que la coagregación de cepas bacterianas probióticas les permite formar una barrera fisicoquímica que previene la colonización por bacterias patógenas. Algunos autores han reportado que los coagregados de BAL con algunas bacterias patógenas pueden inhibir su crecimiento (Chabrellón *et al*, 2005; Ekmekci *et al*, 2009; Gil *et al*, 2010; Taheri *et al*, 2009). Por otra parte, la autoagregación o agrupamiento puede aumentar significativamente el potencial de colonización del probiótico en ambientes con poco tiempo de residencia, tales como TGI o la superficie corporal de organismos acuáticos (Kotikalapudi, 2009).

La viabilidad y la supervivencia de las cepas probióticas en el TGI son condiciones primordiales para que estos microorganismos puedan colonizar y ejercer un efecto beneficioso en el hospedador. Por lo tanto, los microorganismos probióticos deben expresar alta tolerancia al pH gástrico y a la bilis (Nikoskelainen *et al*, 2001; Ouwehand y Salminen, 2003; Vine *et al*, 2006, Balcázar *et al*, 2008).

El bajo pH del estómago y la resistencia a la acción de la pepsina se sabe que proporcionan una barrera efectiva contra la entrada de bacterias en el tracto intestinal. El pH gástrico en las truchas es de aproximadamente 2,5 a 3,5, suficientemente bajo como para reducir la viabilidad y supervivencia de probióticos administrados oralmente (Nepal *et al*, 2007).

La bilis es una secreción hepática que funciona para promover la digestión y absorción de lípidos a nivel intestinal por la acción de ácidos o sales biliares y como medio para la excreción de metabolitos exógenos y endógenos. Es altamente tóxica para la supervivencia de numerosos microorganismos, motivo por el cual puede comportarse como una barrera para las cepas probióticas (Grosell *et al*, 2000). Cuando las cepas probióticas son tolerantes al pH ácido y a la bilis, son más propensas a sobrevivir durante su paso por el tracto gastrointestinal y pueden colonizar esta superficie, el tiempo suficiente para ejercer su efecto.

Un aspecto fundamental en la elección de un probiótico, es su nivel de seguridad. Las cepas de BAL que han sido mayormente utilizadas como probióticos, pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que son catalogados como seguros en la fermentación de alimentos (Salminen *et al*, 1998). Aunque teóricamente, el uso en la alimentación de estos

microorganismos podría tener efectos colaterales, los casos que relacionan infecciones sistémicas con el consumo de probióticos son escasos y todos se han detectado en pacientes inmunocomprometidos (Rodríguez González, 2009).

La cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud del hospedador. Aunque muchos microorganismos dentro del grupo de las BAL son considerados microorganismos GRAS (generally regarded as safe), en todos los casos es conveniente estudiar su seguridad con diferentes ensayos, entre los que se destacan: la resistencia a los antimicrobianos, la producción de compuestos tóxicos, capacidad hemolítica y ausencia de infectividad en el hospedador (Rodríguez González, 2009). Uno de los requisitos que deben cumplir las especies bacterianas probióticas es la baja resistencia a los antimicrobianos, porque debe evitarse el riesgo de que estas cepas puedan transferir genes de resistencia a antibióticos a bacterias patógenas o potencialmente patógenas presentes en las superficies mucosas de los peces (TGI y piel). De allí, que en la caracterización y selección de especies con potencialidades probióticas se incluya la evaluación de susceptibilidad a antimicrobianos. Recientemente la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica, (ANMAT, 2007; CAA artículo 1389) ha incluido en el marco regulatorio los probióticos, exigiendo para su utilización pruebas de inocuidad que incluyen la sensibilidad a los ATM y la capacidad hemolítica.

La presencia de plásmidos es común en enterococos, lactococos, leuconostoc, pediococos y algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias y se sabe que plásmidos conjugativos que codifican resistencias a antibióticos se transfieren entre BAL de diversos géneros. Idénticos genes responsables de

resistencias a Tetraciclina, Eritromicina, Cloramfenicol, y Aminoglucósidos, se han hallado en BAL, por lo que puede decirse que este grupo de bacterias, en ambientes sometidos a la presencia de antibióticos, participan en diversos sistemas de transferencia de genes de resistencia por encima de las fronteras de géneros y especies (van den Bogaard y Stobberingh, 2000; Zhou *et al*, 2005; Lonkar *et al*, 2005; Kastner *et al*, 2006; Ammor *et al*, 2007; Klare *et al*, 2007; Sánchez Ruiz *et al*, 2007; Rosander *et al*, 2008; Evergärn, 2009; Mayrhofer *et al*, 2010).

También, como ensayo complementario, debe investigarse la actividad hemolítica de los potenciales probióticos como indicador de la presencia de este factor de virulencia utilizado principalmente por ciertos microorganismos como fuente de hierro. La hemolisina está vinculada con la capacidad invasiva de las cepas, tiene actividad lítica frente a muchas células eucariotas y procariotas y es considerada una potente bacteriocina (ANMAT, 2007; Alvarado Rivas y Díaz Rivero, 2009; Duhutrel *et al*, 2010; Merrifield *et al*, 2010a).

El interés en el uso de probióticos en acuicultura, sobre todo en el cultivo de trucha arcoíris, se ha centrado en las BAL, sobre todo *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus faecium* y *Pediococcus* spp., entre otros (Nikoskelainen *et al*, 2001; Balcázar *et al*, 2007b; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al*, 2010a). En Argentina, las BAL han sido intensamente estudiadas como probióticos en los mamíferos y, más recientemente, en anfibios de agua dulce (Pasteris *et al*, 2009, 2011). Sin embargo, ningún estudio ha sido realizado en BAL aisladas de ambientes costeros marinos. Teniendo en cuenta el potencial probiótico de las BAL, la investigación de

estas cepas de estos ambientes se vuelve importante y podría ofrecer nuevas cepas con aplicación en acuicultura.

### **Segunda Hipótesis parcial**

Las cepas BAL seleccionadas en el capítulo anterior cumplen con los criterios de selección de probióticos para su aplicación en un cultivo de trucha arcoíris.

### **Objetivos**

Caracterizar las propiedades probióticas de 12 cepas de BAL cuyo aislamiento y selección se describe en el Capítulo 1, para considerar su aplicación en el cultivo de trucha arcoíris.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas seleccionadas para el estudio

Para continuar los estudios se seleccionaron 12 cepas en función de su capacidad inhibitoria frente a las cepas de patógenos de salmónidos, a la identificación y a los antecedentes en la bibliografía (Capítulo 1). Las cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Cepas seleccionadas en función de su actividad antagónica frente a patógenos de salmónidos

Cepa	Identificación
F2	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>
F4	<i>Weissella viridescens</i>
F9	<i>Weissella viridescens</i>
F10	<i>Weissella viridescens</i>
F11	<i>Weissella viridescens</i>
S14	<i>Lactobacillus pentosus</i>
S15	<i>Lactobacillus pentosus</i>
S17	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
S18	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
S19	<i>Lactobacillus pentosus</i>
S20	<i>Enterococcus mundtii</i>
S21	<i>Enterococcus mundtii</i>

F: peces; S: sedimentos

### 2.2 Ensayos de tolerancia a pH gástrico

Las cepas BAL seleccionadas fueron cultivadas en caldo MRS a 25 °C durante 48 h. Estos cultivos se centrifugaron 10 min a 2.000 x g, se lavaron dos veces con buffer fosfato salino 0,1 M (PBS: NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM; pH 7,2) y finalmente se suspendieron en el mismo buffer. La densidad óptica de las suspensiones se ajustó a una absorbancia de 0,250 a

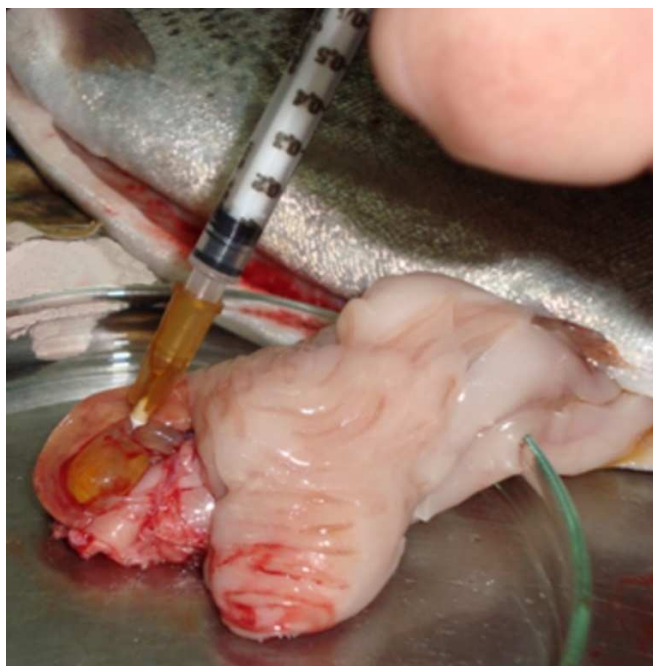


550 nm ( $DO_{550}$ ), utilizando un espectrofotómetro de luz visible (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA), que corresponde a  $10^8$  UFC/mL. Por otro lado, y para verificar la relación entre la  $DO_{550}$  y las unidades formadoras de colonia (UFC/ mL), se realizó el recuento en placa de viables en agar MRS.

Cada suspensión de cepas BAL fue diluida en PBS 0,1 M, a pH 6,5 (control), 3,0 y 2,0 (por la adición de HCl 1 N), de manera de lograr una concentración final de células de  $10^6$  UFC/mL; el pH final de la solución fue controlado con un pHmetro (PH Meter Lutron; PH 207, Taiwán). Se tomaron muestras de 1 mL de cada suspensión a cada pH a tiempo 0 y luego de 1,5 h de incubación a 18°C. Se realizaron diluciones decimales en PBS para determinar el recuento en placa en agar MRS. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 h (Prasad *et al*, 1998; Balcázar *et al*, 2008). Los resultados se expresaron como el logaritmo de las UFC/mL. La exposición a cada pH se ensayó por triplicado a partir de tres cultivos independientes de BAL (n = 9).

### 2.3 Ensayos de tolerancia a la bilis

Los ensayos para determinar la tolerancia a la bilis, se realizaron con bilis de trucha arcoíris. Para obtener la misma, se sacrificaron ejemplares de trucha arcoíris sanas por contusión cefálica, 72 horas después de la última comida. Luego se realizó una incisión lateral en la pared abdominal del cuerpo para revelar la cavidad peritoneal; la vesícula biliar fue identificada a simple vista. La bilis se recogió asépticamente por punción de este órgano y se almacenó a -20 °C hasta el momento del uso (Foto 2.1).



**Foto 2.1** Obtención de bilis de trucha arcoíris por punción de vesícula biliar.

Se realizaron suspensiones de cada una de las cepas en PBS, como se indicó en el punto anterior. Un mililitro de cada suspensión se inoculó en 10 mL de PBS estéril (control) y 10 mL de PBS con el agregado de bilis de trucha, a una concentración final de 10 % (v/v) (Nikoskelainen *et al*, 2001; Balcázar *et al*, 2008). Se tomaron muestras de 1 mL de cada suspensión a tiempo 0 y luego de 1,5 h de incubación a 18°C (Balcázar *et al*, 2008). Se realizaron diluciones decimales en PBS para realizar el recuento de viables en placa, en agar MRS. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h. Todos resultados se expresaron como el logaritmo de las UFC/mL. La exposición a la bilis se ensayó por triplicado a partir de tres cultivos independientes de BAL (n = 9).

## 2.4 Evaluación de las propiedades de superficie celular y de adhesión de las cepas BAL.

### 2.4.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de la superficie celular fue evaluada utilizando los ensayos de adhesión a solventes orgánicos (BATH: bacterial adherence to hydrocarbons), mediante el procedimiento descrito por Rosenberg (1984).

Las BAL fueron cultivadas en caldo MRS a 25 °C durante 48 h. Estos cultivos se centrifugaron 10 min a 1.200 x g, se lavaron tres veces con PBS 0,1 M y finalmente se suspendieron en el mismo buffer. La densidad óptica de las suspensiones se ajustó a una  $DO_{550}$  de 0,8 ( $10^8$  -  $10^9$  cél/mL). El ensayo se realizó en pequeños frascos de vidrio nuevos (de 15 mm de diámetro y 35 mm de longitud), previamente lavados con una solución sulfocrómica, enjuagados 5 veces con agua destilada y finalmente esterilizados en autoclave a 1 atm 15 min. Se colocaron 4 mL de la suspensión celular en los frascos y se agregó 1 mL de n-hexadecano (J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA). La suspensión celular y el solvente se mezclaron en un agitador vortex a máxima velocidad durante 2 minutos y se dejó reposar la mezcla hasta la completa separación de las dos fases (10 min). Posteriormente, se extrajo cuidadosamente con jeringa y aguja 1 mL de la fase acuosa y se leyó la  $DO_{550}$ . La disminución en la DO de la fase acuosa se tomó como una medida de la afinidad de la superficie celular por el solvente y por lo tanto de su hidrofobicidad y el porcentaje de células unidas a la fase orgánica (H %) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$H \% = [(DO_i - DO_f) / DO_i] \times 100$$

Donde  $DO_i$  y  $DO_f$  son las DO de la suspensión celular en el tiempo 0 min y luego

de 10 min de contacto con el solvente, respectivamente.

Tres cultivos independientes de cada cepa BAL fueron ensayados por triplicado (n = 9).

#### 2.4.2 Ensayos de autoagregación y coagregación

Las suspensiones de cepas BAL para los ensayos de auto y coagregación se obtuvieron como lo indicado en el apartado 2.2. Para los ensayos de agregación cada suspensión de BAL fue ajustada en 0,25 a DO<sub>550</sub> en PBS (aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL) (Vandervoorde *et al*, 1992; Ocaña y Nader Macías, 2002). Luego se midió la variación de la DO de 2 mL de cada suspensión de BAL, sin agitación a 18°C en el tiempo 0 y luego de 1 y 4 h. El porcentaje de autoagregación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Autoagregación (\%)} = [1 - (\text{DO}_f / \text{DO}_i)] \times 100$$

Donde DO<sub>i</sub> es la DO a t = 0 y DO<sub>f</sub>, a t final. Tres cultivos de cada cepa, fueron ensayados por triplicado (n= 9).

Para los ensayos de coagregación se utilizaron las cepas patógenas *L. garvieae* 03/8460, *Y. ruckeri* ATCC 29473 y *A. salmonicida* ATCC 33658 (Handley *et al*, 1987; Ekmekci *et al*, 2009; Taheri *et al*, 2009; Hutari *et al*, 2011). Los patógenos fueron cultivados como se indicó en el punto 2.2 del Capítulo 1. Cada suspensión tanto de BAL como de los patógenos, fue ajustada a DO<sub>550</sub> en 0,250 en PBS. En un tubo de vidrio limpio, se mezclaron 2 mL de cada suspensión de BAL y de cada cepa patógena, se agitó en vortex durante 10 seg y luego de una incubación de 4 h a 18°C, sin agitación, se removió cuidadosamente 1 ml de la fase superior de la suspensión a fin de medir la variación de la DO<sub>550</sub> de la mezcla BAL y patógeno. Como controles se

utilizaron las respectivas DO finales de cada microorganismo por separado a tiempo final. El porcentaje de coagregación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Coagregación (\%)} = [1 - (\text{DO}_{(\text{BAL}+\text{Patógeno})} / (\text{DO}_{\text{BAL}} + \text{DO}_{\text{Patógeno}}) / 2)] \times 100$$

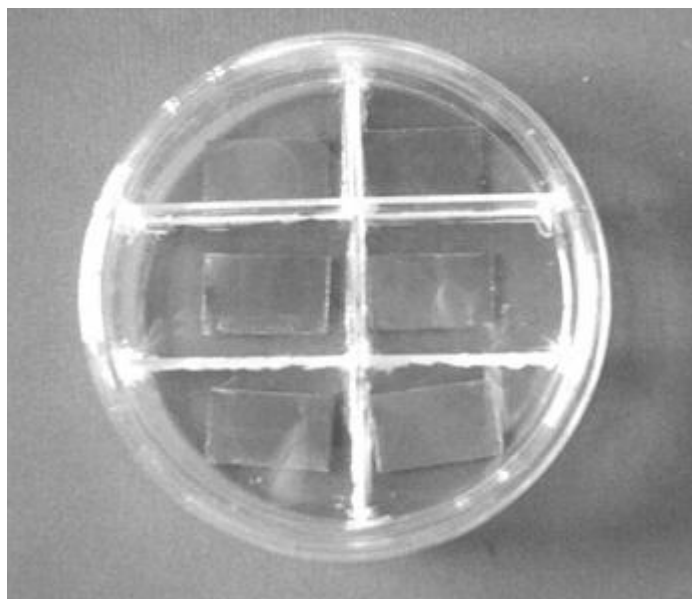
Donde  $\text{DO}_{\text{BAL}}$  y  $\text{DO}_{\text{Patógeno}}$ , son las DO finales de cada suspensión de BAL y patógeno por separado y  $\text{DO}_{(\text{BAL} + \text{Patógeno})}$ , la correspondiente a la mezcla, luego de 4 h de incubación. Tres cultivos de cada cepa, fueron ensayados por triplicado (n= 9).

### 2.4.3 Evaluación de las propiedades de adhesión

#### a) Adhesión inespecífica

Las superficies utilizadas para los ensayos de adhesión no específica, fueron cupones de acero inoxidable AISI 304 2B, cortado en áreas rectangulares (15 x 25 x 1 mm) y cubreobjetos de vidrio (18 x 18 x 1 mm). Antes de iniciar los ensayos, tanto los cupones de acero inoxidable como los de vidrio se remojaron durante 15 minutos en una solución de detergente al 2 % (v/v) (Extran MA 02 neutrales, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a 50 ° C y se enjuagaron cinco veces durante 5 minutos cada uno con agua caliente seguido por cinco enjuagues con agua destilada. Por último, los soportes se autoclavaron durante 15 minutos a 120 °C. Los ensayos se realizaron en placas de Petri estériles de vidrio divididas en 6 secciones, para evitar la superposición de los soportes durante el ensayo (Foto 2.2) descritas por Brugnoli *et al* (2007). Los soportes, de acero inoxidable o de vidrio, se colocaron en cada sección de una placa de Petri, utilizando una placa por cepa.

Para cada ensayo de adhesión, las cepas BAL fueron obtenidas a partir de un cultivo de 48 h en caldo MRS (Vine *et al*, 2004 a, b).



**Foto 2.2** Cajas de Petri divididas en seis secciones por material plástico autoclavable.

En cada sección se colocó una superficie de acero inoxidable (25 x 15 x 1 mm) o de vidrio (18 x 18 x 1 mm).

Para ello las cepas se cultivaron en caldo MRS durante 48 h a 25 ° C. Posteriormente los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 1.200 x g, se lavaron dos veces con PBS y finalmente se suspendieron en el mismo buffer. Se ajustó la densidad óptica de la suspensión a  $DO_{550}$  en 0,250 ( $10^8$  UFC/mL). A continuación, la suspensión celular se diluyó en PBS 0,1 M estéril hasta alcanzar una concentración de  $10^7$  células/mL, finalmente se añadieron 100  $\mu$ L de cada suspensión a la superficie respectiva, con el fin de cubrirla homogéneamente. Las placas se incubaron a 18 ° C durante 1 hora y, a continuación, las superficies se lavaron dos veces con 250  $\mu$ L de PBS para eliminar las bacterias sin adherir.

Para evaluar el número de células adheridas a las superficies de acero inoxidable, los soportes se colorearon con una solución acetónica de diacetato

de fluoresceína (DAF) en PBS 0,1 M (0,04 % p/v), pH 7,5 durante 90 minutos con agitación (50 rpm), a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, los soportes se lavaron dos veces con agua destilada y se dejaron secar. Las superficies coloreadas fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 51, Japón) con una combinación de filtros adecuados y con un objetivo de inmersión en aceite. Se examinaron 20 campos por cada soporte (área de campo: 0,038 mm<sup>2</sup>). (Ver Anexo).

La adhesión bacteriana a las superficies de vidrio se evaluó, después de la tinción de Gram, mediante microscopía de luz visible (Carl Zeiss, Primostar, Alemania) con objetivo de inmersión en aceite. Se examinaron 20 campos por cada soporte (área de campo: 0,0314 mm<sup>2</sup>) (Zárate y Nader-Macias 2006).

Todos los resultados se expresaron como el logaritmo en base 10 del número de células por cm<sup>2</sup>. Tres cultivos de cada cepa fueron ensayados por triplicado (n= 9).

#### b) Adhesión específica a mucus de trucha arcoíris

Para el ensayo de adhesión específica a mucus *in vitro*, el mismo se obtuvo de la superficie externa mucosa de truchas arcoíris sanas, inmediatamente después del sacrificio, raspando la superficie corporal con un portaobjeto estéril y recolectando el mucus directamente en tubos estériles con un pequeño volumen de PBS (Foto 2.3) (Chabrellón *et al*, 2005). Este material fue centrifugado dos veces a 3.500 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar las partículas y células. Luego el sobrenadante se trató con etanol al 60 % durante 12 h a 4 °C, finalmente se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min a 4 °C y el pellet resultante se disolvió en agua destilada (Miller y Hoskins, 1981; Allen, 1983).

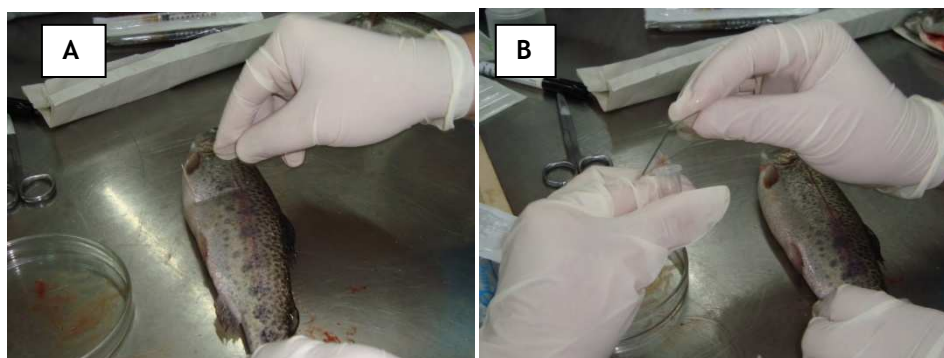


Foto 2.3 Obtención de mucus de trucha arcoíris

El mismo se obtuvo por raspado de la superficie corporal con un portaobjeto estéril (A) y posterior recolección en tubos estériles con un pequeño volumen de PBS (B).

El mucus así obtenido, se llevó a una concentración de proteínas de 0,5 mg / mL en PBS. La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry *et al* (1951) con las modificaciones sugeridas por Miller y Hoskins (1981), usando seroalbúmina bovina como estándar de referencia (Sigma, St. Louis, Missouri EE.UU.). Las suspensiones de mucus se almacenaron en alícuotas de 1 ml a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. (Ver Anexo).

Para inmovilizar el mucus, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  sobre cubreobjetos de vidrio, limpios y estériles (como se indicó en el apartado 2.4.3a), y se incubaron durante 16 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Luego, los cubreobjetos se lavaron dos veces con 150  $\mu\text{L}$  de PBS para eliminar el mucus no adherido al vidrio. Para esta experiencia, las cepas de BAL se prepararon como se indica en 2.2. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de bacterias a los soportes con mucus adherido. Después de la incubación durante 1 hora a  $18^{\circ}\text{C}$ , los cubreobjetos se lavaron dos veces con 250  $\mu\text{L}$  de PBS para eliminar las bacterias sin adherir. La adhesión bacteriana al mucus se evaluó, después de la tinción de Gram, mediante microscopía de luz visible, con objetivo de inmersión en aceite (Krovacek *et al*, 1987; Balebona *et al*, 1995; Vesterlund *et al*, 2005; van



Tassell y Miller, 2011). Fueron examinados 20 campos por cada soporte. Todos los resultados se expresaron como el logaritmo en base 10 del número de células por cm<sup>2</sup>. Tres cultivos de cada cepa fueron ensayados por triplicado (n= 9).

### 2.5 Ensayos de exclusión competitiva

Para estudiar la capacidad de las cepas BAL para bloquear la adherencia de microorganismos patógenos al mucus de trucha arcoíris, se realizaron tres tipos de ensayos: **competencia, exclusión y desplazamiento** (Osset *et al*, 2001; Lee *et al*, 2003). Los experimentos se realizaron como fue descrito por Zárate y Nader-Macías (2006) y adaptados para la adhesión al mucus. Las suspensiones de BAL fueron preparadas como se indica en 2.2. Las cepas patógenas estudiadas fueron *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* que se cultivaron según lo indicado en el Capítulo 1, apartado 2.2. Los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 6.000 rpm, se lavaron dos veces con PBS y finalmente, se suspendieron en el mismo buffer. La absorbancia de la suspensión se ajustó a DO<sub>550</sub> en 0,250 (10<sup>8</sup> UFC/mL). El mucus se inmovilizó en cubreobjetos de vidrio, como se indicó anteriormente y los mismos se colocaron en placas estériles divididas (Foto 2.3).

Para el ensayo de **competencia**, se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de BAL y el patógeno; 100 µL de la suspensión resultante se añadieron sobre los cubreobjetos con mucus inmovilizado. Las placas con los cubreobjetos se incubaron durante 1 hora a 18 °C. Luego estos soportes se lavaron dos veces con 250 µL de PBS para eliminar las bacterias no adheridas.

Para la prueba de **exclusión**, 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de BAL se añadieron sobre el cubreobjetos con mucus inmovilizado, se incubó durante 1 hora a 18 ° C y se lavaron 2 veces con 250  $\mu\text{L}$  de PBS. Luego, 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de patógenos se añadieron sobre los cubreobjetos, incubando otros 60 min a la misma temperatura. Por último, los soportes se lavaron como se indicó anteriormente.

Para la prueba de **desplazamiento**, 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión del patógeno se incubó durante 1 hora a 18 °C sobre el mucus inmovilizado y se lavó. Luego se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de BAL y la incubación se continuó durante otros 60 minutos a 18 °C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS.

En todos los ensayos se incluyeron controles donde 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de cada patógeno, sin el agregado de BAL y se dejaron adherir durante 1 h a 18 °C.

La adhesión bacteriana fue evaluada por microscopía de luz visible con un objetivo de inmersión en aceite, previa tinción de Gram. De esta forma, las BAL (Gram positivas) se distinguieron de las bacterias patógenas empleadas (Gram negativas).

Se examinaron veinte campos por cubreobjeto y se calculó el número de patógenos adheridos por  $\text{cm}^2$  en presencia y ausencia (control) de BAL (área de campo: 0,0314  $\text{mm}^2$ ). Los resultados se expresaron como % de inhibición. Los valores control se tomaron como el 100 % de adhesión y la inhibición de la adhesión de los patógenos se calculó restando cada porcentaje de adhesión de su respectivo valor control (100%).

Tres cultivos de cada cepa (BAL y patógeno) fueron ensayados por

triplicado (n= 9), para cada una de las situaciones seleccionadas: desplazamiento, competencia y exclusión.

Todos los ensayos de evaluación de propiedades probióticas citados anteriormente fueron realizados a una temperatura de 18 °C. La selección de esta temperatura se debió a que es la más cercana a la temperatura de cría de trucha arcoíris.

### 2.6 Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (ATM)

La sensibilidad a los ATM se estudió mediante el empleo del método descrito por Bauer *et al*, (1966) para los aislamientos clínicos. Como no existen métodos estandarizados de referencia para evaluar la sensibilidad a los ATM para los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, se utilizó la metodología sugerida por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005 y 2009) modificada por la utilización de agar MRS, para todas las cepas de BAL aisladas, excepto las cepas S20 y S21, correspondientes al género *Enterococcus*, en el cual se utilizó el agar Müeller Hinton (MH) (Ocaña *et al*, 2006; Otero *et al*, 2007; Ammor *et al*, 2007; Córdoba *et al*, 2009).

Las cepas conservadas a -70 °C, fueron recuperadas en caldo MRS como se indica en apartados anteriores y aisladas en agar MRS. A partir de 3 a 5 colonias aisladas de igual morfología se preparó una suspensión en PBS y se ajustó a una densidad final equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Hisopos embebidos en estas suspensiones ajustadas, se utilizaron para diseminar la superficie del agar MRS y MH.

Para los ensayos de susceptibilidad, se utilizaron los siguientes grupos de ATM:

**a- Inhibidores de síntesis de pared celular:**  $\beta$  lactámicos [Penicilina, Ampicilina y cefalosporinas (Cefuroxima, Cefalotina y Cefotaxima)] y Glucopéptidos (Vancomicina).

**b- Inhibidores de síntesis proteica:** Aminoglucósido (Gentamicina); Lincosamidas (Clindamicina); Macrólidos (Eritromicina); Tetraciclinas; Cloramfenicol.

**c- Inhibidores de replicación y reparación de ADN:** Fluorquinolonas (Ciprofloxacina) y Antimetabolitos (Trimetoprima+Sulfametoxazol).

**d- Nitrofurantoína**

En la Tabla 2.2 se muestran la carga de los discos de antibióticos utilizados (Laboratorios Britania SA, Argentina).

Los discos de antibióticos se colocaron en la superficie del agar (siete discos en cada placa) y las placas se incubaron durante 24 a 48 horas a 37 °C. Una vez finalizado este periodo se llevó a cabo la medición de los halos de inhibición e interpretación de los resultados. La prueba se interpretó de acuerdo a las recomendaciones del CLSI para bacterias Gram positivas del año 2005 y 2009 (Lonkar *et al*, 2005; Zhou *et al*, 2005; Ocaña *et al*, 2006; Reddy *et al*, 2007; Córdoba *et al*, 2009; Sornplang *et al*, 2011). Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados se expresaron como S (sensible), R (resistente) e I (resistencia intermedia), según los promedios de las mediciones realizadas, de acuerdo a puntos de corte especificados en el Anexo.

Con el fin de evaluar la exactitud y reproducibilidad del ensayo así como la calidad de los medios utilizados (Müller Hinton y MRS), se realizó un control de calidad utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, este último como control de la presencia de timidina/timina en los medios (Tabla 2.2) (Ver Anexo).

**Tabla 2.2** ATM utilizados en los ensayos de susceptibilidad de BAL y valores de referencia de los halos de inhibición de cepas control.

Antibiótico	Carga (µg / disco)	<i>E. coli</i> **	<i>S. aureus</i> **	<i>E. faecalis</i>
		ATCC 25922	ATCC 25923	ATCC 29212
PEN	10 *	-	26 - 37	-
AMP	10	16 - 22	27 - 35	-
CXM	30	20 - 26	27 - 35	-
CEF	30	15 - 21	29 - 37	-
CTX	30	29 - 35	25 - 31	-
VAN	30	-	17 - 21	≥ 17
CLI	2	-	24 - 30	-
CMP	30	21 - 27	19 - 26	-
TET	30	18 - 25	24 - 30	-
ERI	15	-	22 - 30	-
CIP	5	30 - 40	22 - 30	-
TMS	1.25/23.75	23 - 29	24 - 32	> 20
GEN	10	19 - 26	19 - 27	-
NIT	300	20 - 25	18 - 22	-

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, CXM: cefuroxima, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, CLI: clindamicina, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, GEN: gentamicina, NIT: nitrofurantoína.

(\*) Concentración de PEN expresada en UI/disco

(\*\*) Valores de referencia, en mm, para los halos de inhibición de cepas controles

## 2.7 Capacidad hemolítica

La hemólisis se evaluó utilizando agar base Columbia (Laboratorios Britania SA, Argentina), suplementado con sangre de carnero en una concentración final de 5 % v/v. Las cepas conservadas a -70 °C, fueron

recuperadas en caldo MRS e incubadas 48 h a 25 °C. Posteriormente, y a partir de estas suspensiones, se realizó una estría de cada cepa BAL en las placas de agar sangre. Las placas se incubaron 48 h a 37°C. El ensayo se realizó por triplicado.

## **2.8 Ensayo de la supervivencia y adhesión de la cepa F2 en el agua del sistema de cultivo de trucha arcoíris**

### **2.8.1 Supervivencia**

Para evaluar la supervivencia de la cepa F2 en el agua del sistema de cría, se preparó una suspensión de la misma tal cual lo indicado en el apartado 2.2, de manera de lograr una concentración final de células de  $10^6$  UFC/mL. Un mililitro de esta suspensión fue inoculada en 100 mL de agua sin esterilizar obtenida de uno de los tanques de cultivo experimental de trucha arcoíris donde se realizarían las experiencias *in vivo*. La suspensión se incubó 24 h a 18°C. La supervivencia fue evaluada por recuento en placa en agar MRS a las 0 h y 24 h. Se sembró agua de los tanques sin inocular como control. La experiencia se realizó por triplicado.

### **2.8.2 Adhesión a vidrio y mucus en condiciones estáticas de la cepa F2 en agua de cultivo de trucha arcoíris**

Para los ensayos de adhesión a vidrio y mucus en condiciones estáticas, se siguieron exactamente las técnicas descritas 2.4.3 en los apartados de “Adhesión inespecífica” y “Adhesión específica”, con la diferencia que la suspensión final de la cepa F2 fue preparada por dilución con agua del sistema

de cultivo de truchas sin esterilizar. Los resultados se registraron a partir de tres experimentos independientes y cada ensayo se realizó por triplicado.

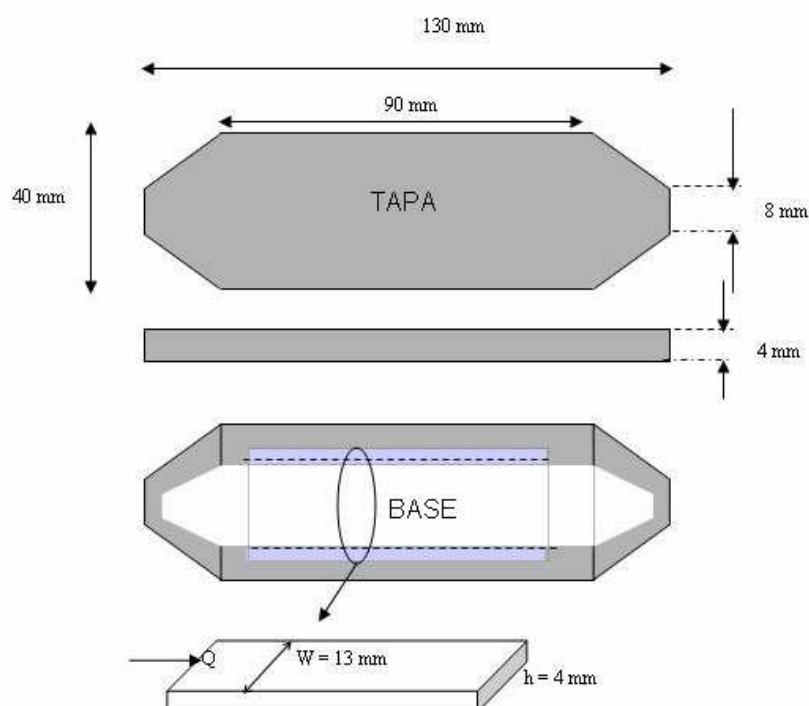
### **2.8.3 Adhesión a vidrio y mucus en condiciones de flujo dinámico**

Como la cepa F2, en el sistema de cría, estará sometida a un flujo constante de agua se decidió evaluar su capacidad de adhesión en condiciones que simularan esta situación. Para los ensayos de adhesión a vidrio y mucus en condiciones de flujo dinámico, se simularon los caudales de recirculación de agua del sistema de cultivo en una cámara diseñada en nuestro laboratorio (Brugnoni, 2008) (Figura 2.1). La misma consta de una base de acrílico con tapa que se mantiene en su lugar mediante tornillos de acero inoxidable. En el interior de la base se ha tallado un canal con las siguientes dimensiones: alto: 4,0 mm, ancho: 13,0 mm y largo: 90,0 mm, en el cual se colocan las superficies a ensayar (12 x 75 x 1 mm) de vidrio y mucus inmovilizado en soporte de vidrio, respectivamente. Las superficies se prepararon como se indica en 2.4.3.

El caudal, usualmente indicado como  $Q$  y expresado en nuestro caso en  $\text{cm}^3/\text{seg}$ , describe el volumen de fluido que circula a través del sistema, independientemente de las dimensiones del canal de la celda. Por otra parte, la velocidad del flujo ( $v$ ) es altamente dependiente de las dimensiones del canal y puede calcularse simplemente dividiendo  $Q$  por el producto de multiplicar el ancho ( $w$ ) por el alto ( $h$ ) de celda.

La cámara de flujo se conecta por ambos extremos (Foto 2.4) mediante mangueras de goma estériles a una bomba peristáltica y a un Erlenmeyer que contiene la suspensión de la cepa F2 preparada según el protocolo citado en

2.8.1. La circulación de la suspensión bacteriana se realizó, en todos los casos, con un caudal promedio de  $1 \text{ cm}^3/\text{seg}$  a  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $v = 1.9 \text{ cm}/\text{seg}$ , en condiciones de flujo laminar (Reynolds = 50), permitiéndose el contacto inóculo-superficie durante 1 h (adhesión). Luego, se hizo circular agua destilada estéril durante 1 min, a fin de remover las células no adheridas.



**Figura 2.1** Esquema de la celda de flujo utilizada en los ensayos de adhesión en condiciones de flujo laminar

La adhesión bacteriana al vidrio y al mucus se evaluó después de la tinción de Gram, mediante microscopía de luz visible, con objetivo de inmersión en aceite. Fueron examinados 20 campos por cada soporte. Todos los resultados se expresaron como el logaritmo del número de células por  $\text{cm}^2$ . Los resultados se registraron a partir de tres experimentos independientes.





**Foto 2.4** Cámara de flujo utilizada en los ensayos dinámicos de adhesión. La cámara se encuentra unida mediante mangueras de goma estériles a una bomba peristáltica que permite la recirculación de caudales en el rango de 0,1 a 1,6  $\text{cm}^3/\text{seg}$ . La superficie de acero inoxidable estéril se coloca en el canal interior (abajo a la derecha ampliación de canal con la superficie).

## 2.9 Análisis estadístico

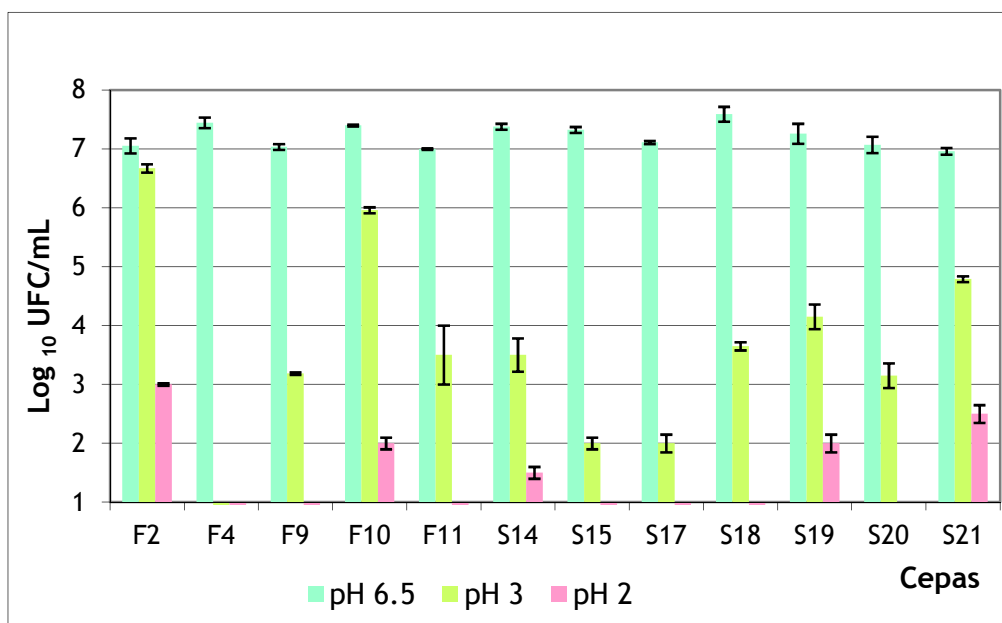
A fin de determinar diferencias estadísticas, en cada ensayo se aplicó a los resultados un análisis de varianza simple (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se aplicó un test  $t$  de Student para determinar las diferencias entre las cepas. En este último caso, una  $p < 0,05$  fue considerada estadísticamente significativa.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Tolerancia al ácido y a la bilis

Todas las cepas de BAL sobrevivieron durante 1,5 h de incubación en PBS con 10 % (p / v) de bilis de trucha arcoíris y no se observaron diferencias significativas en el recuento de bacterias viables en comparación con el control sin bilis (alrededor de  $10^7$  UFC/mL). El tiempo de contacto se estableció en función al tiempo de residencia medio del alimento en el intestino y a los ensayos realizados por otros autores (Balcázar *et al*, 2008).

La Figura 2.2 muestra la tolerancia al pH de las cepas estudiadas. En todos los casos se observaron diferencias significativas con respecto al pH control 6,5 ( $p < 0,05$ ). Todas las cepas, excepto F4, sobrevivieron 1,5 horas a pH 3,0. Las cepas F2, F10 y S21 mostraron mayor tolerancia, obteniéndose reducciones de células de viables no mayores a 2 unidades logarítmicas, en comparación con el control.



**Figura 2.2** Tolerancia de BAL a diferentes condiciones de pH. Los resultados están expresados como  $\text{Log}_{10}$  UFC/mL y corresponden a la media ( $n=9$ ); las barras indican el desvío estándar.

Sólo 5 cepas (F2, F10, S14, S19 y S21) se recuperaron viables luego de 1,5 h a pH 2,0. La cepa F2 manifestó la mayor tolerancia frente a los dos pH ensayados ( $p < 0,01$ ).

### 3.2 Propiedades de superficie y de adhesión de las cepas BAL

Las cepas fueron consideradas hidrofóbicas a valores de H % mayores al 50 %, moderadamente hidrofóbicas, con valores entre 20 - 50 % e hidrofílicas, cuando H % fuera menor al 20 % (Mattos-Guaraldi *et al*, 1999). Los valores de hidrofobicidad de los aislamientos, varió desde 0 hasta 15,3 %, clasificando a todas las BAL ensayadas como hidrofílicas (Tabla 2.3).

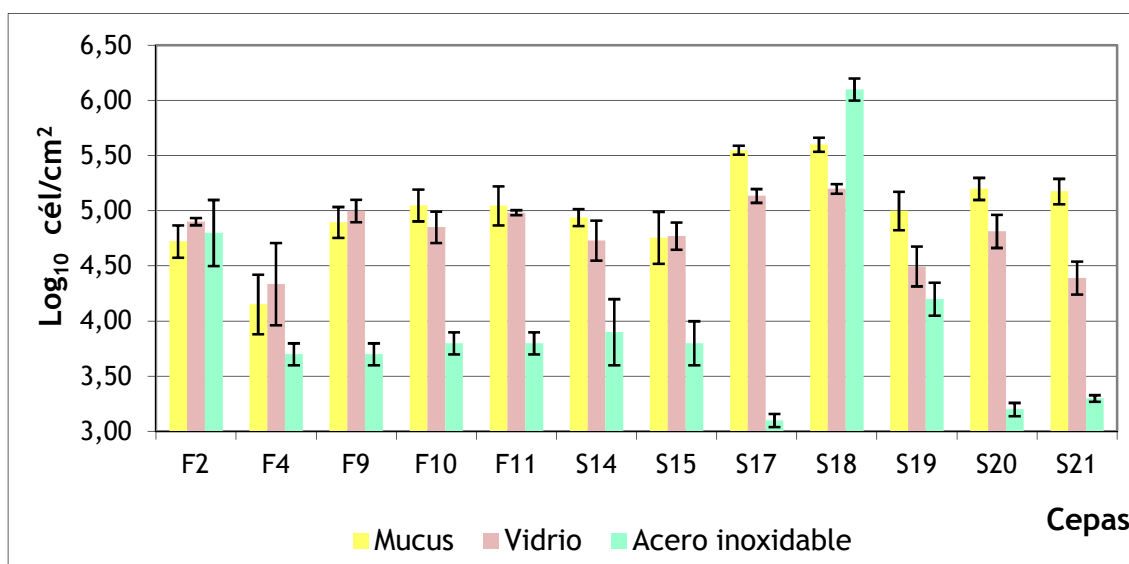
**Tabla 2.3** Hidrofobicidad de la superficie celular de BAL

Cepas	Afinidad (H %)*
F2 ( <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> )	7,19 ± 1,23
F4 ( <i>Weissella viridescens</i> )	15,33 ± 4,35
F9 ( <i>Weissella viridescens</i> )	1,30 ± 2,68
F10 ( <i>Weissella viridescens</i> )	0,01 ± 0,65
F11 ( <i>Weissella viridescens</i> )	0,48 ± 2,05
S14 ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )	5,89 ± 0,04
S15 ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )	0,01 ± 0,07
S17 ( <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	0,01 ± 0,08
S18 ( <i>Pediococcus pentosaceus</i> )	0,01 ± 0,38
S19 ( <i>Lactobacillus pentosus</i> )	3,95 ± 0,43
S20 ( <i>Enterococcus mundtii</i> )	0,58 ± 1,14
S21 ( <i>Enterococcus mundtii</i> )	0,05 ± 0,20

\*La hidrofobicidad fue calculada por la afinidad (H %) de las cepas BAL al n-hexadecano. Los valores están representados como la media ± desvío estándar.

La figura 2.3 muestra que todas las cepas BAL fueron capaces de adherir al mucus de trucha arcoíris y al vidrio (entre  $10^4$  a  $10^5$  células/cm<sup>2</sup>), y

en menor medida al acero inoxidable (entre  $10^3$ - $10^4$  células/cm<sup>2</sup>), excepto S18, que presentó la mayor adherencia con respecto al resto para el acero inoxidable ( $p < 0,01$ ). La adhesión de la cepa F2 fue similar en las tres superficies ensayadas ( $p > 0,05$ ).

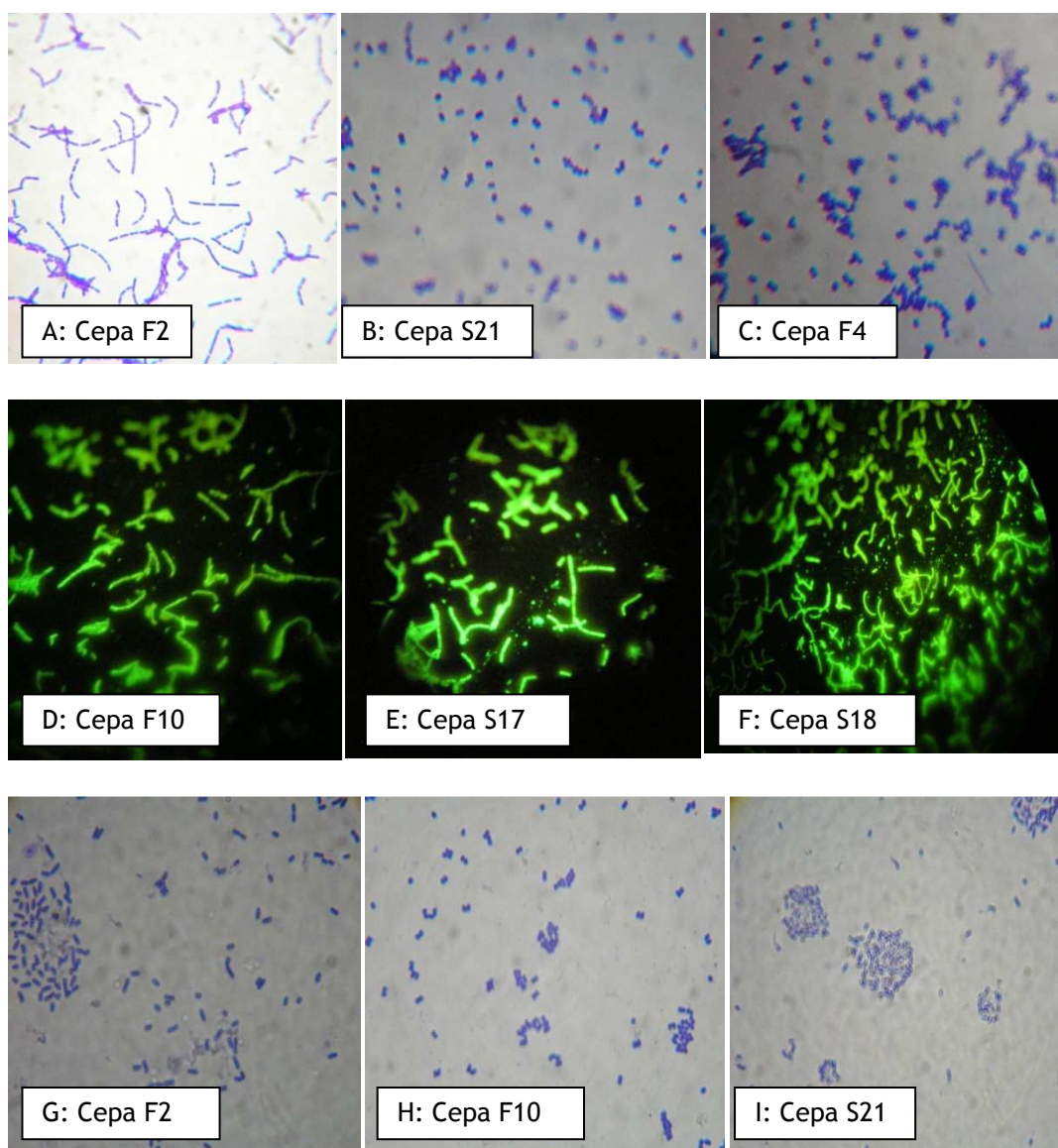


**Figura 2.3** Adhesión de BAL a vidrio, acero inoxidable y mucus de trucha arcoíris luego de 1 h de contacto.

Los resultados corresponden a la media de 3 ensayos realizados por triplicado (n=9); las barras indican el desvío estándar

Las cepas F4, F9, F10, F11, S14 y S15 no presentaron diferencias significativas entre su afinidad al mucus y al vidrio ( $p > 0,05$ ) y su adhesión al acero inoxidable fue significativamente menor que con los otros materiales ( $p < 0,01$ ). Las cepas S17, S18, S20 y S21 mostraron diferencias significativas en su adhesión a los tres materiales ( $p < 0,05$ ). Las cepas S17, S18, S19, S20 y S21 expresaron una mayor afinidad al mucus que a otros materiales ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, S17 y S18 mostraron la mayor adhesión al mucus, con respecto al resto de las BAL ensayadas ( $p < 0,01$ ).

La Foto 2.5, muestra la adhesión de BAL a los diferentes materiales ensayados.



**Foto 2.5 Adhesión de BAL.**

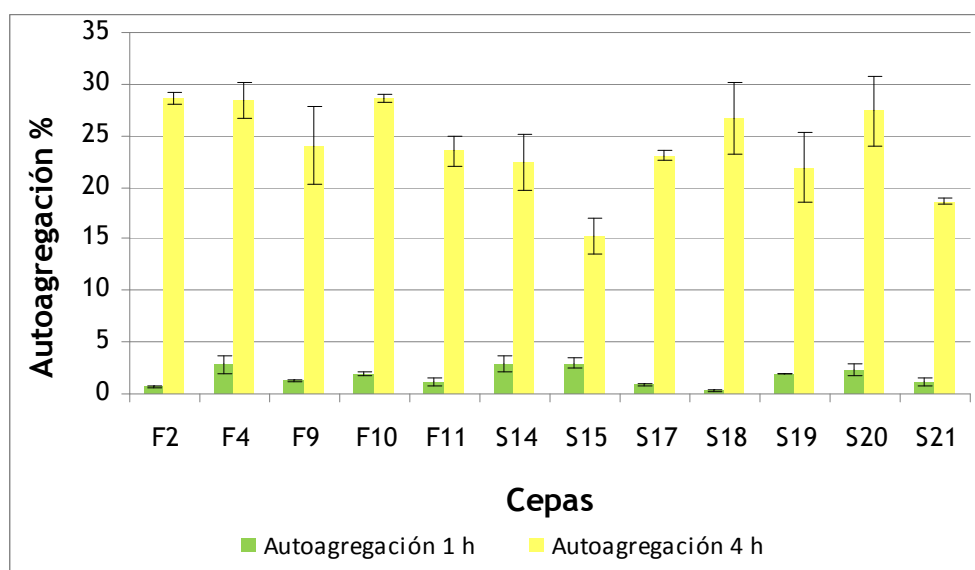
A, B y C: adhesión a vidrio. D, E y F: adhesión a acero inoxidable. G, H e I: adhesión a mucus de trucha arcoíris. Las adhesiones a vidrio y mucus, corresponden a tinción de Gram (100 x); la adhesión al acero inoxidable se visualizó con tinción con FDA (100 x).

### 3.3 Ensayos de auto y coagregación

Las Figuras 2.4 y 2.5, muestran los resultados de autoagregación y coagregación de las BAL seleccionadas, este último, ensayado frente a *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* y *L. garviae*.

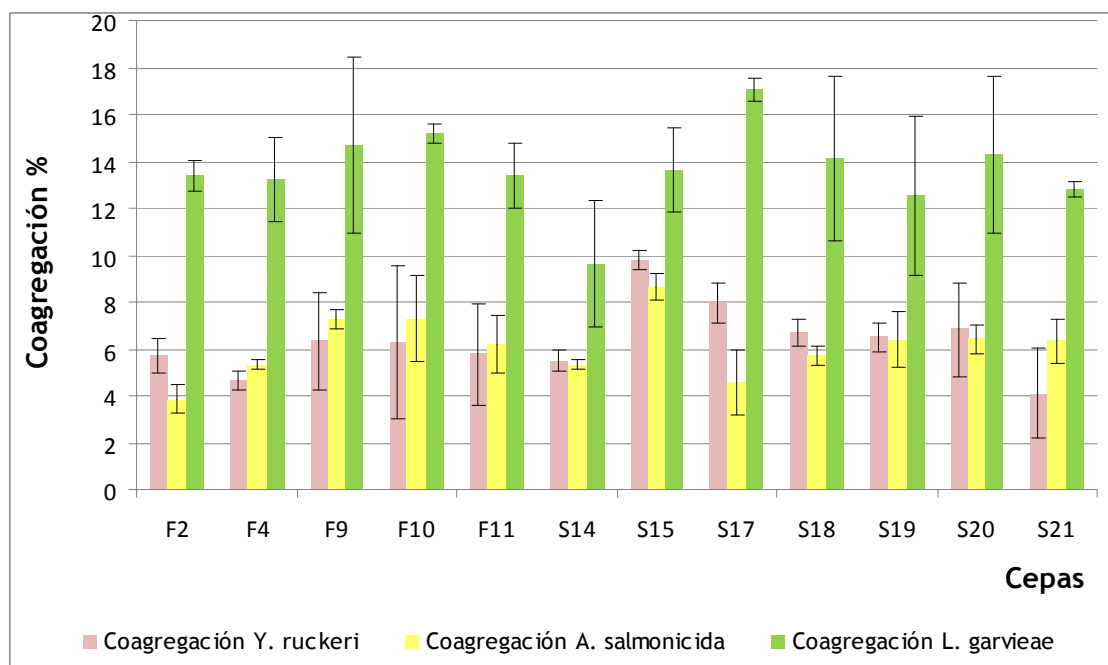
Todas las cepas estudiadas presentaron bajo nivel de autoagregación a las 4 h (entre 15 y 28 %, aproximadamente); estos valores fueron

significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) que los correspondientes a los valores de autoagregación medidos a la hora de ensayo (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Autoagregación (1 y 4 h) de BAL.

Los resultados están expresados como % de agregación y corresponden a la media de 3 ensayos realizados por triplicado(n=9); las barras indican el desvío estándar.



**Figura 2.5** Coagregación (4 h) de BAL frente a patógenos de salmónidos.

Los resultados están expresados como % de agregación y corresponden a la media de 3 ensayos realizados por triplicado(n=9); las barras indican el desvío estándar.

La coagregación frente a *L. garviae* fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la correspondiente a *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*, para todas las cepas ensayadas pero no se encontraron diferencias entre cepas BAL. Las coagregaciones con *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* fueron muy bajas sin encontrar diferencias entre las cepas.

### 3.4 Ensayos de exclusión competitiva

La tabla 2.4, muestra la inhibición de las cepas de BAL sobre la adhesión de *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* al mucus de trucha arcoíris, bajo condiciones de competencia, exclusión y desplazamiento, expresado en porcentaje. La adhesión de los patógenos de los peces ensayados a los preparados de mucus inmovilizado en ausencia de BAL fue de  $1,96 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> ( $\pm 3,55 \times 10^4$ ) y de  $1,77 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> ( $\pm 1,97 \times 10^4$ ) para *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*, respectivamente. Estos valores controles fueron considerados como el 100 % de adhesión.

De acuerdo con Lee *et al* (2003), los porcentajes superiores a 30 - 40 % son considerados altos índices de inhibición. En este estudio, los valores del 40 % o más de inhibición fueron considerados como exitosos.

Cuando se enfrentó las cepas BAL con *Y. ruckeri*, el 58 % de las cepas demostró la capacidad de competir por los sitios de adhesión y de excluir este patógeno (% inhibición medio > 40 %) y el 100 % fue capaz de desplazarlo. En cuanto a *A. salmonicida*, los resultados indican que el 75 % de las BAL fue capaz de competir, el 58 % pudo excluirlo y el 50 % desplazarlo exitosamente.

La cepa F2 mostró el mayor grado de competencia contra *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*, seguido de S15.

**Tabla 2.4** Porcentaje de inhibición de la adhesión de *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* al mucus de trucha arcoiris

Cepas	Competencia % inhibición*		Exclusión % inhibición*		Desplazamiento % inhibición*	
	<i>Y. ruckeri</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>A. salmonicida</i>
F2	92,3 ± 2,9 <sup>aa</sup>	97,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	75,5 ± 2,9 <sup>a</sup>	41,0 ± 8,2 <sup>b</sup>	45,2 ± 8,3 <sup>c</sup>	92,1 ± 5,2 <sup>a</sup>
F4	36,2 ± 4,8 <sup>e</sup>	83,9 ± 4,4 <sup>b</sup>	33,5 ± 3,8 <sup>e</sup>	45,2 ± 8,0 <sup>b</sup>	82,6 ± 6,0 <sup>a</sup>	47,3 ± 13,1 <sup>b</sup>
F9	34,5 ± 3,7 <sup>e</sup>	53,6 ± 4,5 <sup>d</sup>	43,7 ± 3,0 <sup>d</sup>	77,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	87,7 ± 5,1 <sup>a</sup>	16,7 ± 4,2 <sup>d</sup>
F10	19,8 ± 0,6 <sup>f</sup>	75,8 ± 3,1 <sup>c</sup>	61,8 ± 2,8 <sup>b</sup>	76,0 ± 6,2 <sup>a</sup>	63,6 ± 11,4 <sup>bc</sup>	84,4 ± 10,0 <sup>a</sup>
F11	41,5 ± 3,8 <sup>e</sup>	60,0 ± 4,2 <sup>d</sup>	55,8 ± 2,9 <sup>c</sup>	74,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	91,1 ± 5,3 <sup>a</sup>	52,3 ± 16,1 <sup>b</sup>
S14	56,8 ± 5,3 <sup>d</sup>	76,3 ± 3,1 <sup>c</sup>	18,2 ± 2,9 <sup>f</sup>	10,7 ± 2,9 <sup>c</sup>	84,8 ± 5,4 <sup>a</sup>	11,1 ± 2,2 <sup>d</sup>
S15	84,4 ± 3,4 <sup>b</sup>	88,6 ± 2,8 <sup>b</sup>	23,3 ± 2,6 <sup>f</sup>	7,6 ± 3,8 <sup>c</sup>	87,5 ± 6,4 <sup>a</sup>	22,9 ± 8,0 <sup>c</sup>
S17	69,9 ± 8,3 <sup>c</sup>	20,0 ± 8,5 <sup>f</sup>	60,6 ± 8,6 <sup>b,c</sup>	18,1 ± 9,0 <sup>c</sup>	62,5 ± 10,9 <sup>bc</sup>	9,2 ± 2,8 <sup>d</sup>
S18	51,3 ± 5,0 <sup>d</sup>	5,6 ± 4,5 <sup>e</sup>	40,7 ± 5,0 <sup>d,e</sup>	5,6 ± 3,0 <sup>c</sup>	56,8 ± 7,1 <sup>bc</sup>	13,7 ± 4,7 <sup>d</sup>
S19	71,9 ± 6,2 <sup>c</sup>	53,6 ± 4,5 <sup>d</sup>	75,1 ± 3,9 <sup>a</sup>	10,7 ± 2,9 <sup>c</sup>	85,9 ± 7,3 <sup>a</sup>	83,3 ± 11,5 <sup>a</sup>
S20	23,8 ± 3,0 <sup>f</sup>	18,7 ± 4,8 <sup>f</sup>	7,6 ± 2,7 <sup>f</sup>	83,3 ± 4,2 <sup>a</sup>	63,5 ± 10,1 <sup>b</sup>	90,6 ± 7,6 <sup>a</sup>
S21	36,2 ± 4,4 <sup>e</sup>	41,1 ± 4,5 <sup>e</sup>	19,1 ± 6,0 <sup>e</sup>	76,9 ± 2,5 <sup>a</sup>	81,6 ± 3,9 <sup>b</sup>	26,3 ± 5,1 <sup>c</sup>

\*La adhesión de los patógenos al mucus fue cuantificada en ausencia (valor control: 100%) y presencia de las cepas BAL bajo las tres condiciones ensayadas. Los porcentajes de inhibición se calcularon restando cada porcentaje de adherencia de su valor de control correspondiente.

\*\*Los valores medios con distinta letra como superíndice en una misma columna presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En los ensayos de exclusión, se destacan las cepas F2 y S19 para *Y. ruckeri* y las cepas F9, F10, F11, S20 y S21 para *A. salmonicida*. La cepa F10 presentó buena exclusión con ambos patógenos.

En cuanto al desplazamiento, se destaca a S19 por su capacidad de inhibir ambos patógenos.

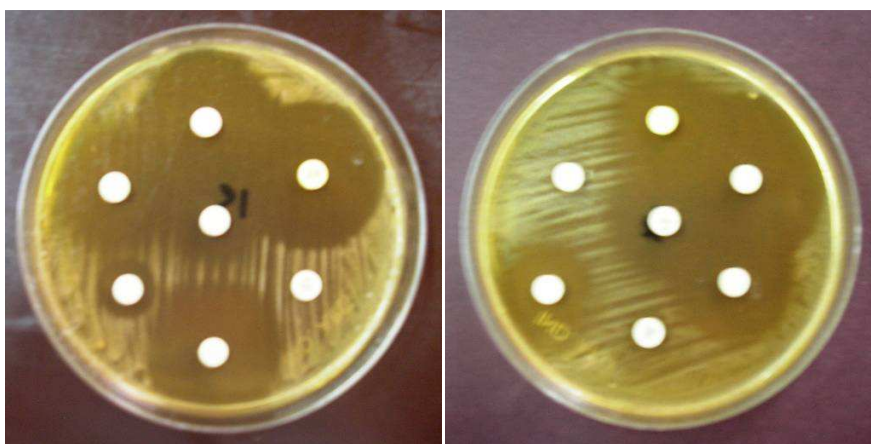
Cabe destacar la actividad antagónica de la cepa F2 por su capacidad de competir con ambos patógenos y de desplazar *A. salmonicida*, con porcentajes de inhibición superiores al 90 %.

### 3.5 Ensayo de susceptibilidad a los ATM

La Foto 2.6 (A y B) muestra los halos de inhibición claramente definidos de las cepas ensayadas, lo que facilitó su medición. La Tabla 2.5 muestra los resultados obtenidos del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de las



cepas de BAL. Para decidir si una cepa es sensible o resistente, los halos de inhibición obtenidos fueron comparados con los halos sugeridos para el género *Enterococcus* sp., excepto para cefalosporinas, clindamicina y gentamicina que fueron comparados con los del género *Staphylococcus* sp (CLSI, 2005 y 2009, Anexo).



**Foto 2.6** Ensayo de determinación de sensibilidad a los ATM por difusión en agar MRS para la cepa F2 (*L.paracasei* subsp *tolerans*).

Los valores obtenidos para las cepas control se muestran en el anexo. Los halos de inhibición obtenidos con estas cepas ensayadas, fueron comparables a los valores de referencia, tanto en medio Müller Hinton como en agar MRS. Es importante aclarar que no se obtuvo halo de inhibición en agar MRS cuando se ensayó trimetoprima-sulfametoxazol utilizando como cepa de referencia a *E. faecalis* ATCC 29212, comprobando así la presencia de timidina/timina en este medio de cultivo.

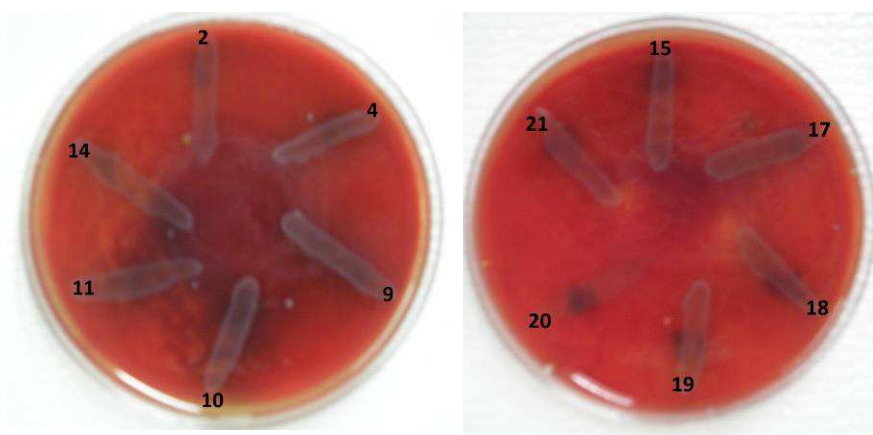
Tabla 2.5 Susceptibilidad de BAL a los Antimicrobianos

Cepa	F2	F4	F9	F10	F11	F14	F15	F17	F18	F19	F20	F21
BAL												
ATM												
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PEN	30	S	29	S	14	R	29	S	26	S	20	S
AMP	30	S	30	S	25	S	30	S	25	S	30	S
CXM	25	S	25	S	30	S	30	S	28	S	30	S
CEF	18	S	10	R	20	S	15	I	20	S	15	I
CTX	20	I	30	S	32	S	20	I	25	S	30	S
VAN	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
CLI	28	S	11	R	11	R	15	I	20	I	12	R
CMP	27	S	30	S	30	S	30	S	30	S	35	S
TET	26	S	25	S	25	S	30	S	40	S	24	S
ERI	30	S	30	S	33	S	36	S	40	S	35	S
CIP	26	S	0	R	0	R	21	S	25	S	0	R
TMS	0	R	25	S	0	R	0	R	0	R	24	S
GEN	0	R	10	R	13	R	0	R	8	R	10	R
NIT	20	S	30	S	33	S	19	S	20	S	35	S

\* Diámetro promedio medido en mm; \*\* S: Sensible; R: Resistente; I: Resistencia Intermedia. F: Aislamientos de peces; S: Aislamientos de sedimentos  
 PEN: penicilina, AMP: ampicilina, CXM: cefuroxima, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, CLI: clindamicina, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, GEN: gentamicina, NIT: nitrofurantoina.

### 3.6 Capacidad hemolítica

Se pueden poner de manifiesto tres tipos de hemólisis:  $\alpha$  hemólisis o hemólisis incompleta, que se observa como una zona de clarificación parcial del medio de cultivo alrededor de las colonias;  $\beta$  hemólisis o hemólisis total, y  $\gamma$  hemólisis, que corresponde a las cepas no hemolíticas. Todas las cepas BAL estudiadas demostraron ser no hemolíticas (Foto 2.7).



**Foto 2.7** Evaluación de la capacidad hemolítica de BAL en agar sangre.

Las 12 cepas BAL fueron consideradas no hemolíticas.

### 3.7 Evaluación de la supervivencia y de las propiedades de adhesión de la cepa F2 en el agua del sistema de cultivo de trucha arcoíris

No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los recuentos de la suspensión de la cepa F2 en el agua del sistema cultivo de trucha a tiempo 0 ( $1,15 \times 10^6 \pm 1,80 \times 10^5$  UFC/mL de agua) y luego 24 h ( $9,57 \times 10^5 \pm 6,11 \times 10^4$  UFC/mL de agua). No se detectaron BAL en el agua de cultivo sin inocular, utilizada como control.

No se encontraron diferencias significativas en la adhesión de la cepa F2 a vidrio ( $4,84 \pm 0,10$  y  $4,86 \pm 0,09$ ) y a mucus ( $4,80 \pm 0,08$  y  $4,77 \pm 0,11$ ),

en condiciones estáticas y de flujo laminar, respectivamente, expresadas como el logaritmo del número de células adheridas por  $\text{cm}^2$ .

## 4 DISCUSIÓN

Todos los ensayos realizados concuerdan con la bibliografía científica en los que se citan los criterios generales para la selección de probióticos, los cuales son complementarios pero no restrictivos. En función de los resultados de los ensayos para determinar la potencialidad antimicrobiana, a la identificación y a los antecedentes en la bibliografía, descritos en el Capítulo 1, se seleccionaron las cepas F2, F4, F9, F10, F11, S14, S15, S17, S18, S19, S20 y S21 (Tabla 2.1), para continuar los estudios de evaluación de sus propiedades probióticas.

Cuando los probióticos son tolerantes al ácido y a la bilis, tienen mayores probabilidades de sobrevivir al tránsito gastrointestinal, alcanzar el intestino en un número apreciable y en consecuencia aumentar sus probabilidades de colonización. El pH gástrico de trucha arcoíris se estima en 2,5 a 3,5 (Lavelle y Harris, 1997). La cepa F2 demostró la mayor tolerancia tanto a pH 2,0 como 3,0. Las cepas F10 y S21 mostraron buena tolerancia a pH 3,0; sin embargo, ésta disminuyó a pH de 2,0 (Figura 2.2). La baja tolerancia al pH gástrico observada en las cepas restantes, parecería ser una limitación; sin embargo, este problema se podría superar con la elección de un vehículo adecuado para la administración del probiótico, con la finalidad de protegerlos de las condiciones gástricas adversas (Lee *et al*, 2003).

En este estudio, la supervivencia de las BAL a la bilis se determinó con una concentración de bilis de trucha arcoíris relativamente alta (10 %). Balcázar *et al* (2008) indicaron que en los salmónidos, la concentración fisiológica de bilis en el intestino se estima entre 0,4 y 1,3 %. Sin embargo,

todavía no hay consenso acerca de la concentración exacta de bilis en el intestino de trucha arcoíris y por lo tanto a la cual el probiótico debería ser tolerante. Algunos autores han recomendado utilizar el 10 %, dando un margen mayor de seguridad (Nikoskelainen *et al*, 2001). La tolerancia observada en todas las cepas a una alta concentración de la bilis es un resultado prometedor para la supervivencia de las mismas en el intestino.

Es importante conocer la capacidad potencial que los candidatos probióticos poseen para adherirse al mucus de la piel de los peces y su capacidad para competir con microorganismos patógenos en este ambiente (Ibrahim *et al*, 2004; Yan *et al*, 2010; Raj *et al*, 2011; Cain y Swan, 2011). Muchos autores han estudiado las propiedades de adhesión de bacterias probióticas utilizando mucus intestinal y mucus de la superficie corporal de peces (Nikoskelainen *et al*, 2001; Ouwehand y Salminen 2003; Chabrilón *et al*, 2005; Balcázar *et al*, 2008) no encontrando diferencias significativas en la capacidad que tienen las BAL de adherir a ambas superficies. Además, la superficie mucosa externa del cuerpo de la trucha arcoíris constituye la primera barrera defensiva contra la invasión de microorganismos extraños (Pickering, 1974).

La adhesión de bacterias patógenas a mucus superficial es un requisito esencial para el inicio de la infección (Bordas *et al*, 1996; Chabrilón *et al*, 2005; Jutfelt *et al*, 2006; Tobback, 2009; Yan *et al*, 2010). Por esta razón los ensayos de adhesión y exclusión competitiva se realizaron en mucus superficial obtenido de trucha arcoíris.

Cuando se trata de seleccionar cepas de BAL que presenten una mayor capacidad de colonización, para aumentar y facilitar su permanencia en las

superficies mucosas como la piel y el TGI, algunas características de la superficie celular tienen que ser estudiadas. Estas son las razones por las que el grado de hidrofobicidad de superficie y los patrones de autoagregación fueron evaluados en todas las cepas de BAL seleccionadas.

Ha sido postulado que la hidrofobicidad puede utilizarse para predecir la potencialidad de adhesión de las cepas. Un alto porcentaje de hidrofobicidad facilitaría su contacto con la superficie hidrofóbica de las células epiteliales eucariotas, o con el carácter hidrofílico de la capa mucosa que cubre el epitelio de estas superficies cuando la hidrofobicidad es baja (van Loosdrecht *et al*, 1987; Peng *et al*, 2001; Gilbert *et al.*, 1991; Iwabuchi *et al*, 2003; Liu *et al*, 2004; Nader Macías *et al*, 2008). Las cepas de BAL seleccionadas en este estudio fueron clasificadas como hidrofílicas (Tabla 2.3). Estos resultados difieren de aquellos obtenidos por otros autores, con cepas aisladas del TGI de peces y mamíferos (Nader Macías *et al*, 2008; Pérez Sánchez *et al*, 2011). Sin embargo, Lee y Salminen (2009) indicaron que las características de hidrofobicidad de las BAL muestran una gran heterogeneidad.

El comportamiento de adhesión observado entre las cepas se debe en gran parte a la naturaleza química de la superficie de las células (Kos *et al*, 2003). Los diferentes patrones de adherencia expresados por las cepas BAL, a tres soportes diferentes, puede ser parcialmente explicados, por las características de hidrofiliidad de su superficie celular. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 2.3, la cepa S18 mostró la mayor adhesión ( $p < 0,01$ ) al acero inoxidable (la más hidrofóbica de la superficies ensayadas) y expresó % H = 3,97, lo que indica una superficie celular altamente hidrofílica.

La cepa F2 no mostró diferencias significativas en la adhesión a las tres superficies, a pesar de su H %. Aunque la regla general ha sido que la adhesión aumenta con el aumento de la hidrofobicidad y disminuye con su disminución (Van Loosdrecht *et al*, 1987), una serie de estudios han mostrado resultados contradictorios (Mattos-Guaraldi *et al*, 1999; Coquet *et al*, 2002). Balebona *et al* (2001) reportaron que los valores de hidrofobicidad de 44 cepas de *Vibrio* spp aisladas a partir de un brote infeccioso en un cultivo de besugo dorado (*Sparus aureata*) no se relacionaban con la capacidad de adhesión de estas bacterias a mucus o células de peces. La hidrofobicidad no es el único factor involucrado en el proceso de adhesión, que se considera un proceso multifactorial. Según nuestros resultados, un valor bajo de hidrofobicidad no indica que la cepa tenga menores posibilidades de adherirse, puesto que podrían estar involucrados diferentes constituyentes de la superficie celular y mecanismos de adhesión que interactúan de manera secuencial para vencer las fuerzas repulsivas (Frizzo, 2007). Las interacciones hidrofóbicas (atractivas) entre la célula microbiana y el sustrato pueden resultar en grandes sistemas de energía libre los cuales conducen a la adhesión. Esto se debe a que las interacciones entre las regiones hidrofóbicas de la célula y el sustrato son de menor energía que las interacciones entre las respectivas regiones hidrofóbicas y el agua. Así, la adhesión debería estar teóricamente maximizada en las superficies más hidrofóbicas y minimizadas en las más hidrofílicas; en estas últimas debería ser más difícil para la célula desplazar el agua adsorbida (Fletcher, 1996). En apoyo a lo anterior, Hermansson (1999) encontró que las bacterias adhieren mejor al sustrato Teflón (hidrofóbico) que al vidrio (hidrofílico, negativamente cargado, dador de electrones). Por el



contrario, en otros estudios, la correlación fue débil (Fletcher, 1996). Éstos y otros resultados contradictorios llevaron a concluir que, sumado a propiedades generales como la hidrofobicidad, la adhesión microbiana también depende fuertemente de la presencia de químicas complementarias entre el sustrato y la superficie de la célula (van Loosdrecht *et al*, 1987; Gilbert *et al*, 1991; Sorongon *et al*, 1991; Fletcher, 1996; Peng *et al*, 2001; Iwabuchi *et al*, 2003; Liu *et al*, 2004)

Las cepas S17, S18, S19, S20 y S21 mostraron mayor afinidad por el mucus que otras superficies (Figura 2.3). Este comportamiento podría estar indicando la presencia de estructuras o moléculas de la superficie celular con cierta especificidad al mucus.

Las cepas F4, F9, F10, F11, S14 y S15 no mostraron diferencias significativas en sus adhesiones a mucus y vidrio y la adhesión en forma similar de la cepa F2 a los 3 materiales ensayados, indican que la capacidad de adhesión de estas cepas a la superficie mucosa se debe al desarrollo de interacciones inespecíficas.

Como se indicó antes, el comportamiento observado en la adhesión a los tres sustratos entre las cepas de BAL estudiadas, es causado por la naturaleza química de la superficie celular (Kos *et al*, 2003) y podría estar reflejado por el hecho de que cepas de la misma especie mostraron un comportamiento similar. Por ejemplo: *Weissella viridescens* (F4, F9, F10 y F11), *Lactobacillus pentosus* (S14 y S15) y *Enterococcus mundtii* (S20 y S21) (Figura 2.3). Sin embargo, la cepa S19, identificada también como *L. pentosus*, mostró un comportamiento diferente a las cepas S14 y S15. El mismo caso ocurrió con los diferentes patrones observados entre las cepas S17

---

y S18, ambos identificados como *Pediococcus pentosaceus*. Estas observaciones no son sorprendentes, ya que varios autores han indicado que la composición química de la superficie de las bacterias puede ser diferente entre las especies, serotipos o cepas de una misma especie, lo cual implicaría la expresión variable de los componentes de superficie entre las cepas (Sorongon *et al*, 1991; Mattos-Guaraldi *et al*, 1999).

La autoagregación también puede utilizarse para predecir la capacidad de las cepas de BAL para formar una biofilm, por lo que esta propiedad sería favorable para una cepa probiótica. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron un fenotipo agregativo débil en las cepas de BAL estudiadas (Figura 2.4) cuando el ensayo se realizó durante 4 h, mientras que fueron consideradas no agregantes con una hora de ensayo. Este resultado coincidiría con la baja hidrofobicidad determinada en todas las cepas (Morelli y Callegari, 2006; Nuraida *et al*, 2011). Según estas observaciones, las cepas BAL estudiadas no contarían con esta ventaja al momento de formar un biofilm. Sin embargo, la formación de un biofilm es un proceso multifactorial que no depende solamente de las características de la superficie celular, sino también de una variedad de factores tales como el pH, la fuerza iónica del medio y los factores ambientales (temperatura, disponibilidad de nutrientes, condiciones de flujo, etc.). Por otro lado, estos ensayos se realizaron de acuerdo a la bibliografía y no consideran procesos que ocurren en ambientes naturales ni los fenómenos de “quorum sensing”. Por la multiplicidad de factores que involucran estos mecanismos, es que no sería prudente extrapolar estos resultados al comportamiento que las cepas tendrían *in vivo* en un hospedador (Nader Macías *et al*, 2008; Van Houdt y Michiels, 2010).

La capacidad de coagregación de un probiótico puede favorecer la generación de un microambiente alrededor del microorganismo patógeno con una elevada concentración de sustancias inhibitorias, pudiendo incluso, bloquear la diseminación del patógeno a los receptores tisulares (Gil *et al*, 2010). Las cepas BAL mostraron una baja coagregación con los patógenos ensayados (Figura 2.5). Por lo tanto, sobre esta base, estos aislamientos podrían ser considerados no protectores. Si bien estas determinaciones pueden dar una idea de las características de superficie celular de las cepas, no son restrictivas a la hora de seleccionar un microorganismo probiótico y deben ser completados con los estudios de adhesión y competencia.

Se ha hipotetizado que la presencia de probióticos puede restringir el acceso de los patógenos a los receptores de los tejidos por impedimento estérico o bloqueando el receptor con análogos específicos de adhesinas (Tuomola *et al*, 1999; Vine *et al*, 2004a; Abbass *et al*, 2010). En esta tesis se investigó el bloqueo de la adhesión a mucus de bacterias patógenas específicas de salmónidos como parte del estudio de las propiedades probióticas de las BAL seleccionadas, por tres mecanismos diferentes: competencia, exclusión, y desplazamiento. Sobre la base de los resultados obtenidos, se puede decir que la capacidad de adhesión de BAL a mucus (Figura 2.3), no sería el único factor determinante en la exclusión competitiva de los patógenos. Las cepas que mostraron la mayor adhesión al mucus, S17 y S18, no mostraron actividad importante como barrera contra la colonización de bacterias patógenas con respecto a otras cepas que mostraron una menor capacidad de adhesión, como por ejemplo F2 (Tabla 2.4).

La capacidad de las cepas BAL estudiadas para inhibir la adhesión de los patógenos de salmónidos demostró ser específica y depender tanto de la cepa BAL, del patógeno y de la condición impuesta en el ensayo (competencia, exclusión o desplazamiento) (Tabla 2.4). Este comportamiento podría estar determinado por la afinidad de adhesinas sobre las respectivas superficies bacterianas y/o a la posible activación de otros procesos metabólicos característicos de cada cepa e inducidos por cada situación.

Los bajos niveles de coagregación obtenidos en este estudio y la importante capacidad de exclusión competitiva de muchas de las cepas estudiadas frente a los patógenos podría explicarse por el comportamiento diferencial que presentan las cepas en estado planctónico y de aquellas que están adheridas o han comenzado el proceso de adhesión (Mozzi *et al*, 2010). Esta condición podría desregular en la célula la expresión de componentes de superficie diferentes a los expresados en suspensión. Varios autores han reportado que cuando las células están adheridas o durante el proceso de adhesión, se pueden manifestar cambios fenotípicos con el objetivo de colonizar las superficies. Durante la competencia con los patógenos, la producción de algunos compuestos inhibidores o la expresión de algún factor de unión específico, podrían haber sido expresadas en las células BAL (Kuipers *et al*, 1998; Delissalde y Amabile-Cuevas 2004; Jude *et al*, 2009).

De acuerdo a la bibliografía consultada y a la legislación para la selección de probióticos (CAA), se realizaron dos tipos de ensayos para establecer la seguridad de las cepas preseleccionadas anteriormente: pruebas de susceptibilidad a los ATM y capacidad hemolítica (ANMAT, 2007; Sánchez *et*

---

al, 2007; Alvarado Rivas y Díaz Rivero, 2009; Rodríguez González, 2009; Merrifield *et al*, 2010a).

La actividad hemolítica está relacionada con la posible patogenicidad de las cepas. Se deben seleccionar aquellas cepas caracterizadas como gamma hemolíticas puesto que en éstas están ausentes los factores de virulencia que puedan representar un problema para el hospedador cuando se administra un probiótico (Rodríguez González, 2009). Ninguna de las BAL estudiadas, presentó hemólisis. Este hallazgo, es particularmente importante para las cepas S20 y S21, pertenecientes al género *Enterococcus* (Semedo *et al*, 2003, Botes *et al*, 2008; Trivedi *et al*, 2011). Muchas cepas pertenecientes a este género producen una beta hemolisina o citolisina, con capacidad de lisar eritrocitos y otras células y que también se reconoce como una bacteriocina. Esta toxina/bacteriocina posee un interés especial porque su actividad incrementa la virulencia de los enterococos en diferentes modelos de infección (Sánchez *et al*, 2007).

La resistencia de las BAL a los antibióticos ha sido extensamente debatida durante la última década. Estas cepas, añadidas intencionalmente a la cadena alimentaria, no deben transferir genes de resistencia a los ATM. Teuber *et al* (1999) sugieren que debe ser investigado el potencial de las bacterias comensales para transferir sus genes de resistencia a los ATM, desde los alimentos a la microbiota autóctona del hospedador.

Las cepas S20 y S21, identificadas como *Enterococcus mundtii*, solo presentaron resistencia a vancomicina y ciprofloxacina y resistencia intermedia a tetraciclinas (Tabla 2.5). Estos resultados concuerdan con los patrones de resistencia a los ATM en otros países observados para el género

*Enterococcus* aislados a partir de muestras ambientales y de animales (Cetinkaya *et al*, 2000; Guardabassi y Dalsgaard, 2004; Prakash *et al*, 2005; Zirakzadeh *et al*, 2006; Fatholahzadeh *et al*, 2006; Rahimi *et al*, 2007; Anderson *et al*, 2008; Ghidan *et al*, 2008; Trivedi *et al*, 2011; Werner, 2012). El uso terapéutico y profiláctico (quizás también como suplemento dietario para engorde) de tetraciclina es muy frecuente en medicina veterinaria y por lo tanto, la presencia de enterococos resistentes a este ATM es muy frecuente tanto en animales de granja como en el ambiente (Martín *et al*, 2005; Cassenego *et al*, 2011; Lopardo, 2011). El aislamiento en esta tesis de dos cepas *E. mundtii* resistentes a vancomicina difiere a lo reportado por Baldini y Selzer (2008). En dicho reporte se aislaron 103 cepas de enterococos sensibles a glucopéptidos a partir de muestras de agua del estuario de Bahía Blanca y ninguno fue identificado como *E. mundtii*. Si bien sería apresurado sacar una conclusión al respecto, puesto que en este trabajo solo se aislaron dos cepas de enterococos, este hallazgo resulta llamativo.

El resto de las cepas BAL estudiadas (F2, F4, F9, F10, F11, S14, S15, S17, S18 y S19) presentaron resistencia a vancomicina y gentamicina (Tabla 2.5). Muchas BAL, entre ellas el género *Lactobacillus*, son intrínsecamente resistentes a los glucopéptidos, como la vancomicina (Flores *et al*, 2006; Evergärn *et al*, 2009, 2007a y 2007b), probablemente debido a modificaciones del péptidoglucano. La resistencia intrínseca a los aminoglucósidos se atribuye a la ausencia de transporte de electrones mediado por citocromos, mecanismo necesario para la absorción del ATM (Charteris *et al*, 2001). Como se observa en la Tabla 2.5, muchas de las cepas BAL presentaron resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol, resistencia que también ha sido señalada como

una característica intrínseca (Evergärn, 2009). Sin embargo, estos resultados deben interpretarse cuidadosamente puesto que la presencia de timina y timidina en los medios de crecimiento, puede resultar antagónica a la actividad de este ATM (CLSI, 2005 y 2009) y esto se vio reflejado por la resistencia a trimetoprima-sulfametoxazol que presentó la cepa control *E. faecalis* ATCC 29212 en el medio de cultivo MRS y no así en el agar Müeller Hinton (ver resultado en anexo). Se ha propuesto que las BAL presentarían resistencia intrínseca a las quinolonas por un mecanismo desconocido (Evergärn, 2009).

Los resultados obtenidos en el ensayo de susceptibilidad a los ATM, concuerdan con la bibliografía consultada, en cuanto a la presencia de resistencia intrínseca para vancomicina, gentamicina y ciprofloxacina como así también por la presencia de resistencias adquiridas al resto de los ATM ensayados (Teuber *et al*, 1999; Flores *et al*, 2006; Ammor *et al*, 2007; Evergärn *et al*, 2007a, 2007b, 2009). Se puede concluir en general, que las cepas BAL estudiadas presentaron un bajo perfil de resistencia a los ATM ensayados.

Este es el primer estudio sobre el potencial probiótico de BAL aisladas del estuario de Bahía Blanca. La buena capacidad de adhesión de la mayoría de las cepas BAL, la capacidad de algunas de ellas de competir y/o inhibir agentes patógenos, la estabilidad observada frente a la bilis de trucha arcoíris, la ausencia de beta hemólisis junto con el bajo perfil de resistencia a los ATM observado en muchas cepas, indicarían que varias de las cepas de BAL aisladas de peces y sedimentos del estuario de Bahía Blanca, podrían ser

---

consideradas como candidatos probióticos y utilizados en el cultivo de trucha arcoíris.

En base de los resultados obtenidos en los ensayos realizados, se decidió seleccionar la cepa F2 para continuar los estudios tendientes a su aplicación en el cultivo experimental de trucha arcoíris. Esta selección se basó en el hecho que dicha cepa presentó la mayor tolerancia a pH 2,0 y 3,0, altos niveles de competencia frente a los patógenos ensayados y baja a resistencia a los antibióticos. Sumado a esto, se consideró su pertenencia al género *Lactobacillus*, el cual ha sido extensamente utilizado y considerado GRAS.

Antes de incluir a la cepa F2 en los ensayos de engorde de trucha arcoíris, era importante establecer su capacidad de supervivencia en el agua de cultivo y la conservación de su potencial de colonización en ese medio.

Los resultados obtenidos indicaron que F2 sobrevive en el agua del sistema durante 24 h sin producirse cambios significativos en el número de células viables. Este tiempo de incubación se seleccionó por ser el intervalo que existe entre cada administración del suplemento del probiótico (Capítulo 3). Además, no se observaron diferencias en la adhesión de la cepa a mucus en condiciones de flujo continuo, con respecto a los ensayos en condiciones estáticas en PBS o en agua de cultivo, indicando que la cepa mantiene su capacidad de adherencia en condiciones de flujo dinámico. Este resultado debe ser destacado ya que la cepa será aplicada a un sistema de cría con circulación permanente de agua, lo cual podría afectar su adhesión y provocar su rápida eliminación de los tanques. Cabe destacar que la dinámica empleada en el ensayo es mayor que la correspondiente al sistema de cría,



indicando el potencial de adhesión que expresaría la cepa en esas condiciones. Estos resultados fueron considerados favorables para su aplicación en un sistema de engorde de trucha arcoíris (Capítulo 3).

## CAPÍTULO 3

**Aplicación de *Lactobacillus paracasei*  
subsp. *tolerans* F2 en un sistema  
experimental de cultivo de trucha  
arcoíris**

## 1 INTRODUCCIÓN

La necesidad de alimentos en el mundo conduce a la realización de grandes esfuerzos para asegurar los requerimientos de una población en continuo crecimiento, que demanda tanto dietas básicas como alimentos de alta calidad. Un desafío mundial es superar la brecha entre demanda y abastecimiento de alimentos. Cabe destacar que más de un billón de personas dependen del pescado como su principal fuente de proteínas y su número probablemente se incremente debido a que la población mundial está creciendo a una tasa anual del 2 % (Lückstädt, 2005). La certeza de que el problema de la alimentación mundial no se podría resolver solamente incrementando la captura de alimentos marinos, indujo a la búsqueda de alternativas que permitieran pasar de la pesca-recolección hacia el cultivo de los organismos acuáticos. La acuicultura ha tenido adelantos significativos en cuanto a la producción de una amplia variedad de organismos que proporcionan proteínas de origen animal.

El pescado constituye el 20 % de la proteína animal en la alimentación de más de 2.800 millones de personas. En regiones de África y Asia puede alcanzar el 50 % y hasta el 90 % en los pequeños estados insulares y zonas costeras en desarrollo. Actualmente, la acuicultura representa el 45 % del abastecimiento mundial de pescado para alimentos y se espera que en 2015 alcance el 50 %. La producción actual tiene un valor en granja de U\$S 70,3 billones, que se incrementa significativamente cuando llega al consumidor final.

En Argentina, la acuicultura avanza tanto en producción como en aporte de ingresos, puestos de trabajo, desarrollo tecnológico, capacitación,

mejoramiento sanitario y aumento de acuicultores de diferentes escalas de inversión. El territorio argentino posee todas las condiciones agroecológicas necesarias para la producción acuícola, tales como diversidad climática, abundante agua de calidad y diversas zonas aptas tanto en el continente como en el litoral marino. Nuestro país cuenta además con la ventaja de poder producir, a bajo costo y en forma local, el alimento balanceado que representa el insumo de mayor importancia para apoyar el crecimiento de la actividad. Estas características son favorables para que el desarrollo de la acuicultura contribuya a las economías regionales y se convierta en una alternativa productiva sustentable destinada a abastecer el mercado externo e interno y el fomento de la pesca deportiva (Plan provincial de acuicultura, Neuquén, 2008).

El esquema de desarrollo de la acuicultura nacional incluye tres tipos de actividades diferenciadas (Plan provincial de acuicultura, Neuquén, 2008):

- a) Cultivo de truchas en sistemas intensivos en estructuras flotantes, denominadas jaulas y estanques, emprendimientos que en el 2006 alcanzaron 1.760 Ton de producción.
- b) Acuicultura rural o agraria, especialmente basada en el cultivo de peces como el pacú (más de 500 Ton de producción en 2006) y de langostas de agua dulce.
- c) Cultivo de moluscos bivalvos, principalmente ostras y mejillones, sobre el litoral marítimo, desde Buenos Aires a Tierra del Fuego (iniciada hace pocos años).

La actividad de la acuicultura comercial semi-industrial en Argentina comenzó a crecer a partir de la década de los 90 y si bien su crecimiento no

ha sido acelerado, se ha mantenido firme hasta la actualidad. El cultivo que se desarrolla principalmente en el país es el de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); según estadísticas de la Secretaría de Agricultura y Pesca de la Nación, la producción de trucha arcoíris en el año 2003 alcanzó 1.231 Ton al año con un valor de US\$ 5.420.000, lo que equivale al 66 % de la producción acuícola nacional. En un futuro cercano se estima que esta producción alcance 1.900 Ton/año, debido al funcionamiento de concesiones otorgadas en el embalse de Alicurá en Nordpatagonia. La especie fue introducida junto a otros salmónidos a principios del siglo XX y los cultivos comerciales semi-industriales crecieron a partir de la década de los 90 en concesiones otorgadas para la implantación de cultivos en jaulas en los embalses de producción hidroeléctrica sobre el río Limay (Región Cuenca II). En la cuenca templada-fría, los salmónidos pueden considerarse como "asilvestrados", ya que se han adaptado exitosamente a los cuerpos de agua de toda la región patagónica. Este hecho también constituye un importante ingreso gracias a los permisos otorgados para la práctica de la pesca deportiva, ampliamente explotada en la región. El cultivo de pacú figura en segundo lugar, con un 22 % del total de producción del país. El tercer lugar en importancia productiva lo ocupa el cultivo de moluscos bivalvos (FAO, 2006).

El cultivo de trucha se desarrolla en dos sistemas. El primero utiliza raceways de cemento sobre tierra, para producción de carne a bajo tonelaje y alevines para sus propias producciones y otros productores. El segundo, incluye las fases de pre-engorde y engorde, realizadas en jaulas suspendidas en cuerpos de aguas provinciales concesionados. El sistema de cultivo es intensivo, con cargas finales de 8 a 10 kg/m<sup>3</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la acuicultura a nivel mundial se encuentra en franco crecimiento. Para lograr la sustentabilidad es necesario intensificar los cultivos, valiéndose de tecnologías como sistemas de recirculación de agua (SRA), optimizando la utilización de un recurso tan valioso. El uso de esta tecnología se limita en cierta medida, a países desarrollados como Estados Unidos, Japón y los países europeos como Noruega, España, Alemania, Francia y otros. Cabe destacar que países en vía de desarrollo como Chile, México, Brasil y Ecuador utilizan esta tecnología en diferentes etapas de cultivo. Los SRA para acuicultura presentan un creciente interés debido al enorme potencial que exhiben para reducir los requerimientos de agua en las actividades acuícolas, ahorrando hasta un 90 % de agua comparado con los sistemas tradicionales que involucran un flujo continuo de agua. Además permiten una disminución sustancial en la eliminación de efluentes, ahorro en el consumo de energía, mayores índices de crecimiento que en la naturaleza o en sistemas de agua corriente, clima controlado, mejores condiciones de trabajo y suministro constante al mercado con productos de alta calidad. Un sistema de recirculación de agua es un sistema cerrado. Los peces están en depósitos (tanques) y el agua circula continuamente para garantizar las mejores condiciones para su desarrollo. La corriente de agua lleva el oxígeno a los peces y elimina los productos metabólicos de desecho que son transformados en los biofiltros en compuestos menos perjudiciales o su concentración es reducida hasta valores que no afectan la salud ni el crecimiento de los peces (Golz, 1995; Betancourth *et al*, 2004; King *et al*, 2008). Los desechos sólidos son recogidos en decantadores.

La piscicultura requiere una óptima calidad del agua y los SRA tienen la ventaja de permitir el control del ambiente y los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la misma, obteniéndose así un óptimo crecimiento de los animales y una prevención en salud (Galli Merino y Sal, 2007). Para garantizar la mejor calidad posible del agua en los depósitos, debe establecerse un flujo continuo de agua de tal manera que permita su recambio de 2 a 4 veces por hora. Si bien este gran flujo de agua transporta, comparado con el agua de desagüe doméstica, una cantidad relativa menor de desechos por m<sup>3</sup>, es necesaria la implementación de un tratamiento específico. La eliminación diaria de los desechos sólidos (heces y alimento no consumido) de los tanques de cría y decantadores es un paso importante a implementar como parte de estos tratamientos y contribuyen a mantener una calidad óptima del agua del sistema. Sin embargo, el corazón del sistema es la unidad de tratamiento de agua o biofiltro, constituido por un consorcio de microorganismos, capaces de colonizar el sistema y producir biofilms.

En la mayoría de los casos, estas biopelículas están formadas por microorganismos presentes habitualmente en el agua, sin ocasionar problemas de enfermedad en los peces, siempre que se eviten situaciones de estrés. De ahí la importancia de la aplicación de buenas prácticas de acuicultura. La función principal de estos consorcios microbianos es degradar materia orgánica disuelta y detoxificar el agua de componentes nitrogenados (amonio, nitritos, nitratos), principales compuestos de eliminación del metabolismo de los peces. La presencia de estos compuestos en concentraciones elevadas es tóxica para los peces, generando inmunosupresión, lo que hace más factible el desarrollo de enfermedades infecciosas y por lo tanto, un aumento en la

mortalidad, con grandes pérdidas económicas para el sector (Golz, 1995; Betancourth *et al*, 2004; King *et al*, 2008).

Si bien la producción de trucha arcoíris en Argentina está estabilizada en aproximadamente 1.200 Ton anuales, el potencial productivo es sustancialmente mayor, ya que se cuenta con importantes recursos. Desde este contexto, cambios leves en la eficiencia de la producción en una industria de tal magnitud, pueden representar importantes beneficios económicos. Particularmente, la alimentación es uno de los aspectos productivos más influyentes; una utilización más eficiente del alimento se puede traducir en una importante disminución en los costos de producción (Morales, 2004). El uso de probióticos en acuicultura se presenta como una excelente alternativa no sólo para el control de enfermedades, sino también como promotores de crecimiento de los organismos (Ringo y Gatesoupe, 1998; Hansen y Olafsen, 1999; Vine *et al*, 2004; Panigrahi *et al*, 2004; Vázquez *et al*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos probióticos ejercen su acción por diferentes mecanismos: exclusión competitiva de patógenos; incremento de la respuesta inmune innata y específica; mejoramiento de la calidad del agua en los sistemas de producción y mejora del estado nutricional y promoción de crecimiento de los peces (Verschuere *et al*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Lara-Flores *et al*, 2003; Balcázar *et al*, 2006; Merrifield *et al*, 2010a).

Muchos estudios sobre probióticos en acuicultura se han basado en demostrar su efecto como controles biológicos de enfermedades (Andlid *et al*, 1998; Vine *et al*, 2004; 2006; Li y Gatlin, 2004; Shelby *et al*, 2006). Sin



embargo, el efecto benéfico que poseen en la eficiencia de la alimentación y la promoción del crecimiento cuando estas cepas son administradas como suplementos en la dieta, han despertado un mayor interés en los últimos años (Gatesoupe, 2008; Lara-Flores *et al*, 2003, Merrifield *et al*, 1010b).

El probiótico luego del tránsito a través del estómago, se adhiere a la mucosa intestinal, comienza a utilizar un gran número de hidratos de carbono para su crecimiento y produce importantes enzimas (amilasas, proteasas y lipasas) que contribuyen a aumentar la digestibilidad del alimento, produciendo un mayor crecimiento, prevención de trastornos intestinales y producción y/o estimulación de la digestión secundaria de compuestos presentes en las fuentes de proteínas vegetales (Lara-Flores *et al*, 2003;. El-Haroun *et al*, 2006). Esto se traduce en un aumento en la tasa de crecimiento y en la utilización eficiente del alimento balanceado (Lara Flores, 2011). Como se mencionó anteriormente, el alimento y la alimentación generalmente representan el mayor costo operativo en una explotación intensiva de engorde y pueden constituir hasta el 65 % de los costos totales anuales de producción en los criaderos comerciales de truchas. Leves cambios en la eficiencia de utilización del alimento se pueden traducir en una importante disminución de los costos de producción (Morales, 2004).

En el caso específico de animales acuáticos, los microorganismos utilizados como probióticos corresponden a especies de los géneros *Bacillus* (Panigrani *et al*, 2007, Salinas *et al*, 2008), *Carnobacterium* (Kim y Austin, 2006) y *Lactobacillus* (Panigrahi *et al*, 2004; Balcázar *et al*, 2007 a, b; Vendrell *et al*, 2007), y en menor medida, especies de los géneros *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Aeromonas* y *Vibrio* también han sido

utilizadas con el mismo fin (Irianto y Austin, 2002; Brunt *et al*, 2007; Merrifield *et al*, 2009).

Los probióticos pueden ser proporcionados al hospedador:

- A través de un alimento vivo, es decir asociados a organismos vivos como rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y pequeños crustáceos (*Artemia franciscana*) (Gómez-Gil *et al*, 1998; Hernández-Martínez *et al*, 2009).
- Inmersión del hospedador en una suspensión del probiótico (Austin *et al*, 1995; Gram *et al*, 1999.)
- Adición directa al agua de cultivo (Moriarty, 1998; Spanggaard *et al*, 2001)
- Adición del probiótico en el alimento balanceado (Rengpipat *et al*, 2000)

En Argentina, las BAL como probióticos han sido intensamente estudiadas en mamíferos y, más recientemente en anfibios de agua dulce (Pasteris *et al*, 2009). Sin embargo, son escasos los estudios realizados tendientes a su aplicación en piscicultura y nulos en cultivos de salmónidos.

### Tercera Hipótesis parcial

*Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, aislada de *Ramnogaster arcuata*, presenta efectos beneficiosos en el cultivo intensivo de trucha arcoíris.

### Objetivos

Evaluar los efectos de la cepa F2 *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, seleccionada en el Capítulo 2 sobre el crecimiento de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema cerrado de recirculación de agua.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Preparación del suplemento probiótico

a) *Liofilización*: Con la finalidad de establecer una metodología adecuada para conservar viable y estable a la cepa F2, hasta el momento de su incorporación al sistema de cría, ya sea en el agua de cultivo o en el alimento balanceado, se realizaron ensayos de liofilización y posteriormente se evaluó la supervivencia de la cepa durante 1 año de almacenamiento. Para este fin, la cepa F2 se cultivó en caldo MRS a 25 °C durante 48 h; este cultivo se centrifugó a 1.200 x g por 10 min y se lavó dos veces con PBS. El pellet lavado se resuspendió en 1 mL de una suspensión de leche descremada en agua destilada estéril. Se ensayaron concentraciones de leche de 20 % y 10 % p/v. La densidad final de la cepa F2 en cada concentración de leche se controló mediante un recuento en placa en agar MRS. Cada suspensión se congeló a -70 °C y finalmente se liofilizó en un equipo Rificor Mod. L-A-B4, (Argentina) (Foto 3.1). El número de células viables en el liofilizado almacenado a 4 °C fue controlado semanalmente con un recuento en placa en agar MRS, hidratando cada vial con 1 mL de PBS y dejando reposar 10 min a 18 °C, para permitir la recuperación de las células.



Foto 3.1 Cepa F2 liofilizada

b) *Preparación del suplemento probiótico en el alimento*: Un vial de F2 liofilizado, se hidrató en 1 mL de PBS y se dejó reposar 10 min a 18 °C, para permitir la recuperación de las células. Para eliminar la leche, el contenido del vial se centrifugó y el pellet resultante se lavó dos veces con PBS. Finalmente el pellet lavado, se resuspendió en 10 mL de PBS, con una densidad final de células de  $10^{11}$  UFC/mL. La suspensión así preparada fue adicionada a 100 g de alimento balanceado por medio de un spray, con agitación manual constante. El alimento se secó a 25 °C durante 1 hora para evitar cambios en la flotabilidad de los pellets y se almacenó a 4 °C en un recipiente estéril (Balcázar *et al*, 2007b; Ghosh, *et al*, 2007; Panigrahi *et al*, 2010). El número de células viables en el alimento almacenado a 4 °C fue controlado diariamente con un recuento en placa en agar MRS. Como control se utilizó el alimento balanceado tratado de igual forma que el alimento suplementado pero sin el agregado del probiótico. Los resultados se expresaron como el logaritmo en base diez de las UFC/g de alimento de alimento seco.

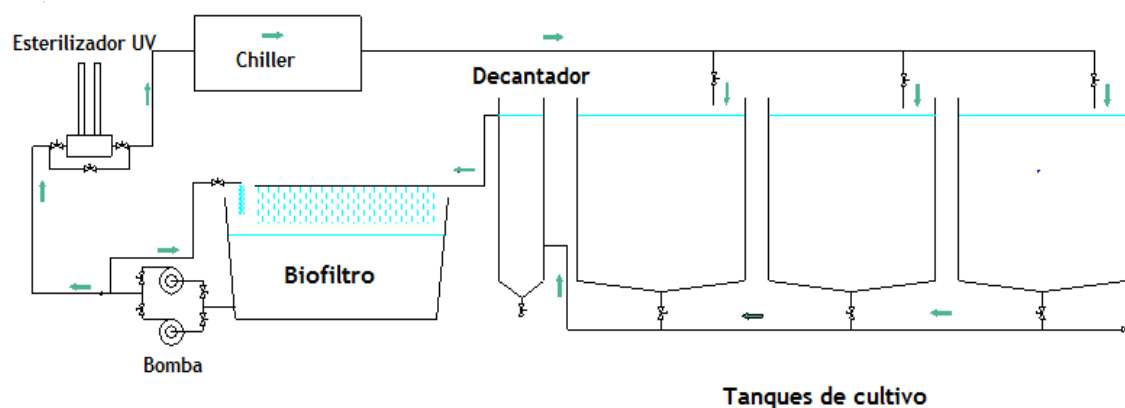
Para determinar el peso seco del alimento, una porción del alimento control y suplementado con el probiótico se secó a 105 °C en recipientes de aluminio hasta obtener peso constante. Las cajas se pesaron en una balanza de precisión (AND ER-180 A) antes y después del secado, para calcular el contenido de agua del alimento.

## 2.2 Condiciones experimentales en el cultivo de trucha arcoíris

La experiencia se llevó a cabo en dos unidades independientes con sistema cerrado de recirculación de agua. Cada unidad está constituida por

tres estanques circulares con capacidad de 500 L cada uno, un tanque decantador, un tanque de fibra de vidrio con biofiltros, un filtro de luz ultravioleta y un sistema enfriador de agua (chiller) (Figura 3.1; Fotos 3.2, 3.3 y 3.4). En la base de los tanques con biofiltros se colocaron seis bolsas de red con pequeños trozos de caño corrugado de plástico flexible, de aproximadamente 2 cm de largo, para aumentar la superficie de contacto para la formación de los biofilms. Una unidad fue destinada al tratamiento con el probiótico seleccionado (UT) y la otra, como unidad control (UC). El flujo de agua de entrada a cada tanque fue de 0,1 L/seg; la temperatura del agua se mantuvo en  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , los niveles de oxígeno en aproximadamente 80 % de saturación, fotoperiodo natural a  $39^{\circ}\text{S}$  y la máxima densidad de biomasa se estableció en de  $15\text{ kg/m}^3$ . Los cambios de agua de cada unidad de cría, aproximadamente el 15 % del volumen, se realizaron cada 72 h y los tanques de sedimentación de cada unidad se limpiaron todos los días antes de la hora de suministrar el alimento. También, diariamente se sacaron los peces que se encontraran flotando en el agua de los tanques, registrando previamente su número para los cálculos de supervivencia. El agua para el sistema de cría fue provista a través de una perforación. Para verificar la aptitud de la fuente de agua para su utilización en el cultivo de trucha arcoíris, se tomaron muestras del agua de la perforación y fueron enviadas al laboratorio LANAQUI (Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur; CONICET), donde se analizaron dureza, pH, salinidad, sulfatos, fosfatos, calcio, manganeso, níquel, arsénico, cromo, berilio, boro, estroncio, antimonio y estaño. Además se realizaron análisis microbiológicos en nuestro laboratorio. Los resultados indicaron que la fuente de agua para el sistema era adecuado

para la cría de trucha arcoíris (Klonz, 1991; Boyd *et al*, 1998; Kotsanis *et al*, 2008) (ver Anexo).



**Figura 3.1** Esquema de una unidad del sistema cerrado de recirculación de agua para acuicultura.



**Foto 3.2** Tanques de cultivo (A); Formas juveniles de trucha arcoíris en tanques de cultivo (B).

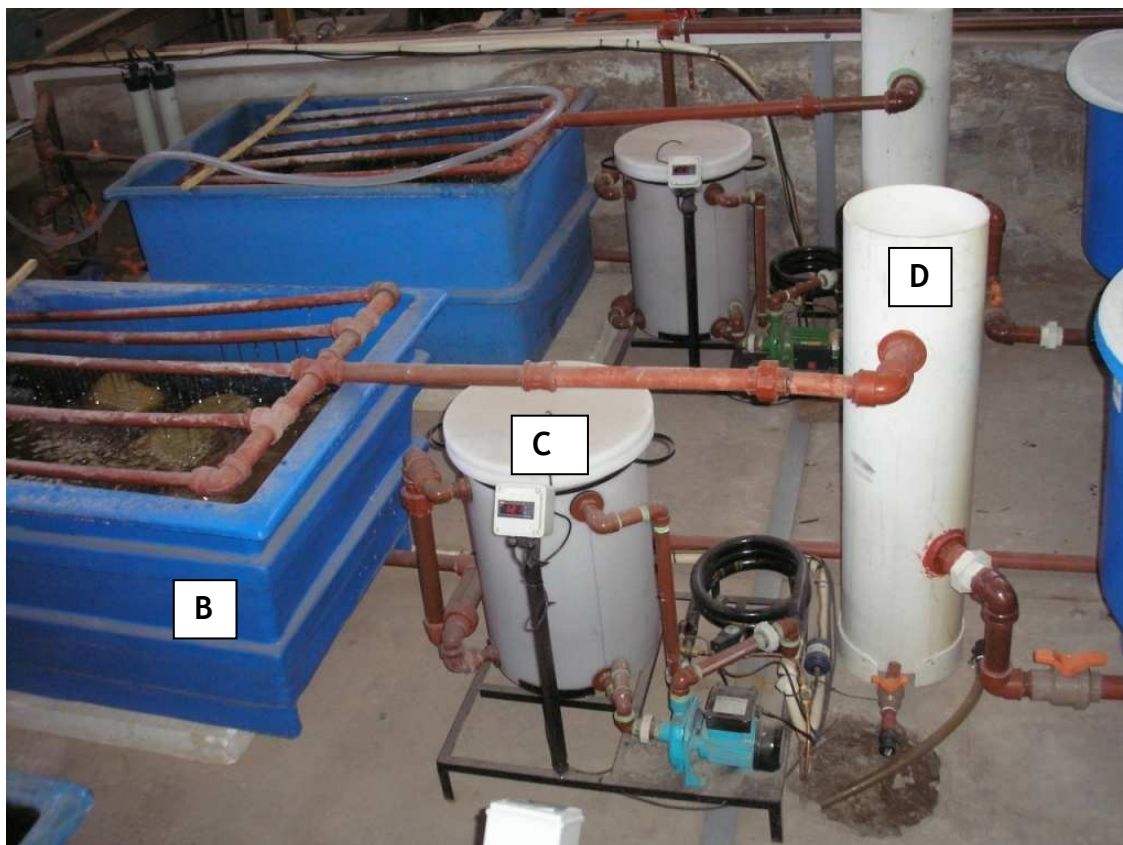


Foto 3.3 Decantador (D), chiller (C) y biofiltro (B).

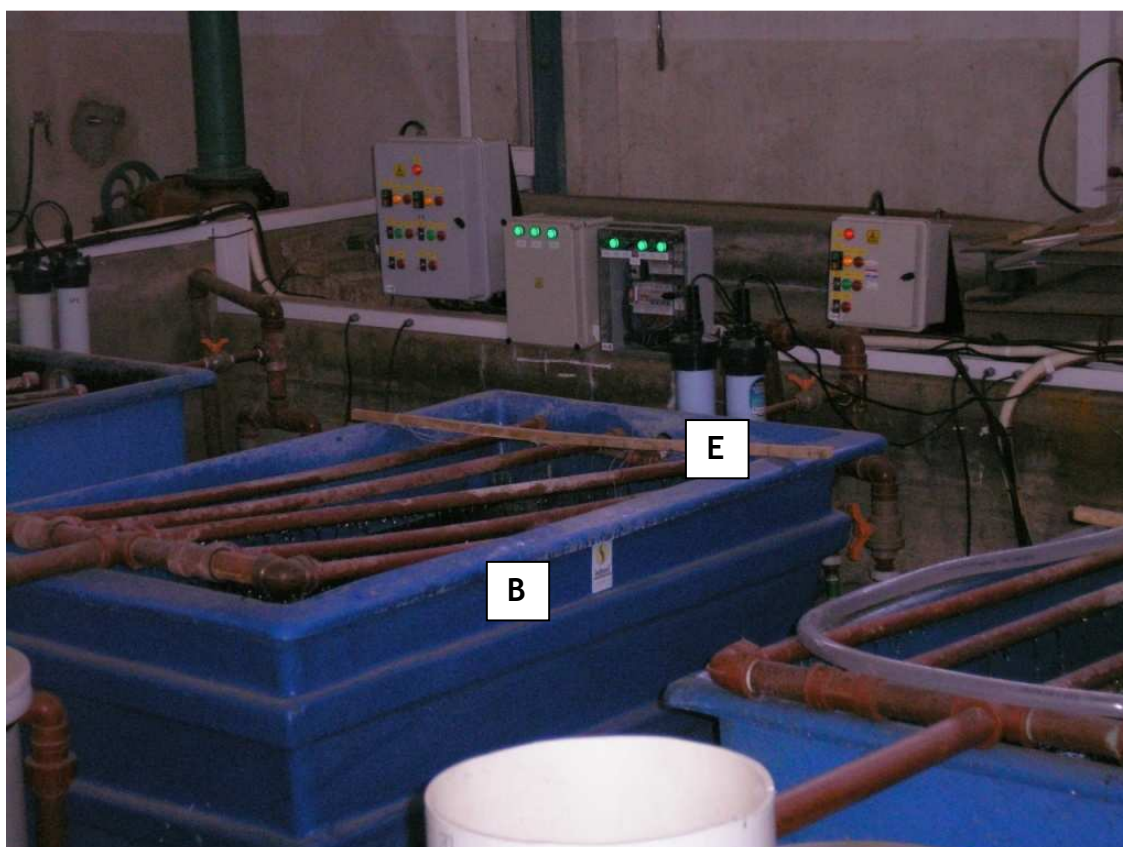


Foto 3.4 Esterilizador UV (E) y biofiltro (B).





Foto 3.5 Vista general del sistema de cría

Los animales utilizados en los diferentes ensayos, fueron provistos por una granja experimental del Centro Regional Bariloche, dependiente de la Universidad Nacional del Comahue y aclimatados durante 4 semanas antes del inicio de las experiencias.

El suministro de alimento se llevó a cabo en forma manual y controlada, tratando de minimizar las pérdidas por deriva, teniendo la precaución de restar el alimento no consumido de la ración diaria en aquellos casos que los animales no comieran. Los peces se alimentaron a razón del 2 % de biomasa por día siempre en raciones iguales a las 9:00 y 14:00 h. Las raciones se estimaron teniendo en cuenta el peso corporal de los animales y la temperatura del agua (Leitritz, 1959). La ración diaria inicial se aumentó suponiendo una conversión del alimento de 1:1 y se corrigió cada 2 semanas por pesaje completo del lote. Los animales fueron alimentados con alimento

comercial (Alimentos Pilar S.A., Argentina), en pellets de 3 mm de diámetro, con la siguiente composición centesimal:

Proteína bruta (mín).....	46,0 %
Extracto etéreo (mín).....	17,0 %
Fibra cruda (máx).....	2,0 %
Humedad (máx).....	10,0 %
Minerales totales (máx).....	18,0 %
Calcio.....	4,0 a 5,0 %
Fósforo.....	1,7 a 2,7 %
Energía metabolizable.....	2.700 Kcal/Kg m.seca

### 2.3 Ensayo de seguridad de la cepa F2 sobre trucha arcoíris

Para este ensayo, se utilizaron formas juveniles (4 meses de edad) de trucha arcoíris, y en cada tanque de la UT y UC, se colocaron al azar 25 animales. Con la finalidad de determinar efectos nocivos de la cepa F2 sobre el hospedador, el contenido de un vial de liofilizado (0,1 g) se pulverizó, se mezcló directamente con la ración de alimento balanceado correspondiente y se administró a la UT, durante 15 días. La UC fue alimentada con el alimento balanceado, únicamente. Se evaluó la supervivencia de los animales y la posible presencia de efectos adversos, como por ejemplo, cambios en el comportamiento en el nado y la alimentación. La supervivencia, expresada en % (S %), se calculó mediante la siguiente fórmula (Ai *et al*, 2011):

$$S \% = PF/PI \times 100$$

Donde PF, es el número de peces al final de la experiencia y PI, el número de peces al inicio de la experiencia.

## 2.4 Evaluación del efecto de la aplicación de la cepa F2 en ensayos de engorde de trucha arcoíris

### 2.4.1 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el agua de cultivo

Para este ensayo, se utilizaron los mismos animales del ensayo de seguridad, los cuales al inicio de la experiencia presentaron pesos promedios de  $108,52 \text{ g} \pm 3,88$  para la UC y  $97,57 \text{ g} \pm 4,83$  para la UT.

Diariamente, un vial de F2 liofilizado se hidrató en 1 mL de PBS y se dejó reposar 10 min a  $18^\circ\text{C}$ , para permitir la recuperación de las células. Para eliminar la leche, el contenido del vial se centrifugó y el pellet resultante se lavó dos veces con PBS. Finalmente el pellet lavado, se resuspendió en 1.000 mL de agua del sistema de cultivo y se homogeneizó a 250 rpm durante 10 minutos. Trescientos mililitros de la suspensión así obtenida, se agregó a cada tanque de la UT para alcanzar una densidad final del probiótico de  $10^4$  UFC/mL de agua de cultivo. El ensayo se realizó durante 77 días. Los peces se pesaron quincenalmente para calcular la Tasa Específica de Crecimiento (TEC; %/día), el Índice de Conversión del Alimento (ICA; g de alimento/g de pez) y la Ganancia de Peso Promedio Porcentual (GPP, %), mediante las siguientes fórmulas (De Silva y Anderson, 1995; Hevroy *et al*, 2005):

$$\text{TEC} = 100 \times [(\ln \text{Pf} - \ln \text{Pi})/T]$$

$$\text{ICA} = \text{AC} / (\text{Pf}^* - \text{Pi}^*)$$

$$\text{GPP} = (\text{Pf} - \text{Pi}) \times 100/\text{Pi}$$

Donde Pf y Pi, 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; Pf\* es la biomasa total al final de la experiencia y Pi\*, la inicial.

También se evaluó la S % de los animales y la posible presencia de efectos adversos.

#### **2.4.2 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el alimento**

Para el ensayo de adición del probiótico a la dieta, se utilizó el alimento comercial como dieta para la UC y como base para ser suplementada con el probiótico, para la UT. La suspensión preparada en 10 mL de PBS fue adicionada a la ración diaria de alimento de la UT por medio de un spray, como se indicó en 2.1.b. Mediante este procedimiento se alcanzó una densidad final de aproximadamente  $10^6$  UFC/g de alimento (Panigrahi *et al*, 2010; Balcázar *et al*, 2007b; Ghosh, *et al*, 2007). Se utilizó esta densidad de la cepa F2 debido a que en la bibliografía la misma fue considerada apropiada para los ensayos de crecimiento de trucha arcoíris (Balcázar, 2006; Balcázar *et al*, 2007c).

Para este ensayo, se utilizaron 28 animales distribuidos aleatoriamente en cada tanque, de diferente lote a los ensayos anteriores, con un peso promedio inicial de  $31,19 \text{ g} \pm 0,43$  para la UC y  $31,25 \text{ g} \pm 0,69$  para la UT. Los peces se alimentaron a razón del 2 % de biomasa por día siempre en raciones iguales a las 9:00 y 14:00 h. Los peces se pesaron al inicio y al finalizar la experiencia para calcular TEC, ICA y GPP, según lo indicado en el punto

anterior. El ensayo se realizó durante 66 días. También se evaluó la S % de los animales y la posible presencia de efectos adversos.

## 2.5 Análisis microbiológico y fisicoquímico

### 2.5.1 Análisis de agua del sistema de cría

La evaluación de la calidad sanitaria del sistema durante la experiencia de cultivo de trucha arcoíris, se realizó mediante estudios semanales de la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua, en ambas experiencias de engorde. Las muestras se tomaron directamente de los tanques de cría (UC y UT) y—antes de su alimentación. Se determinaron: amonio (Amonium test Merck art. 1.14657.0001), nitritos (Nitrite test- art. 1.14658.0001), oxígeno disuelto y pH (Water Quality Checker Horiba U10, Japan) y los siguientes indicadores microbiológicos (la composición de los medios utilizados se detalla en el Anexo):

- Recuento de bacterias heterótrofas, aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas totales: en Agar Plate Count (PCA, Merck, Germany), por técnica de agar volcado, incubado a 25 °C por 72 h.
- Recuento de bacterias coliformes totales e investigación de *Escherichia coli*: el grupo coliformes totales se cuantificó por técnica de número más probable (NMP; Hoskins, 1934) usando una combinación de tubos 3-3-3, utilizando caldo Mac Conkey (Britania, Argentina). Los tubos se incubaron a 37°C por 48 h. Se consideraron positivos los tubos que exhibieron viraje del indicador por la utilización de lactosa con producción de ácido y gas. Los resultados se expresaron como NMP/100 mL. Para investigar la presencia de *E. coli* se filtraron 100 mL de agua,

utilizando filtros estériles de acetato de celulosa de diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Germany). Los filtros se colocaron en caldo Mac Conkey y se incubaron por 48 h a 43°C. Los resultados se expresaron como presencia/ausencia en 100 mL. Para confirmar la presencia de *E. coli*, a partir de tubos positivos Mac Conkey (viraje del indicador por la utilización de lactosa y producción de gas) se hicieron repiques en agar eosina azul de metileno (EMB, Merck, Germany). Las colonias sospechosas se reislaron en agar nutritivo (Merck, Germany) para su posterior identificación con pruebas bioquímicas.

- Recuento de *Pseudomonas* grupo fluorescente: este grupo se cuantificó por técnica de NMP usando una combinación de tubos 3-3-3, utilizando caldo King B (King, 1954). Los tubos se incubaron a 25°C por 96 h. Se consideraron positivos los tubos que exhibieron fluorescencia a la luz UV. Los resultados se expresaron como NMP/100 mL.
- Recuento de BAL: se realizó en agar MRS por técnica de agar volcado, incubado a 25°C por 72 - 96 h, en condiciones de tensión disminuida de oxígeno. Los resultados se expresaron como UFC/mL.

### 2.5.2 Análisis microbiológico de residuos sólidos

Este ensayo se realizó durante la experiencia de engorde con el agregado del probiótico en el alimento. Las muestras se obtuvieron semanalmente de los tanques de sedimentación de las UC y UT, con anterioridad a la limpieza diaria de decantadores, en envases estériles y se transportaron al laboratorio a 4 ° C para su procesamiento inmediato. Diez mililitros de detritos se centrifugaron a 4.000 RPM durante 1 min para eliminar el exceso de agua. Se realizaron diluciones decimales sucesivas a

partir de 1 g de la muestra centrifugada en solución fisiológica estéril. Los parámetros microbiológicos estudiados durante el ensayo fueron:

- Recuento de enterobacterias: se realizó en agar bilis rojo violeta glucosado (VRB-Glucose Agar, Biokar, France), por técnica de agar volcado, incubado aeróbicamente a 37°C por 72 h. Los recuentos se expresaron como el logaritmo en base diez de las UFC por g de residuo sólido seco.
- Recuento de mohos y levaduras: se realizó en agar papa dextrosa (PDA, Merck, Germany) a pH final de 3.5, por el agregado de ácido cítrico al 10 %. Se sembró por técnica de disseminación en superficie y se incubó a 25°C por 5 días. Los recuentos se expresaron como el logaritmo en base diez de las UFC por g de residuo sólido seco.
- Recuento de BAL: tal cual lo indicado en el punto 2.5.1 Los recuentos se expresaron como el logaritmo en base diez de las UFC por g de residuo sólido seco.

Para determinar el peso seco de los detritos, una porción de la muestra centrifugada, se secó a 105 °C en recipientes de aluminio hasta obtener peso constante. Las cajas se pesaron en una balanza de precisión (AND ER-180 A) antes y después del secado, para calcular el contenido de agua de los residuos sólidos.

## **2.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada ensayo se realizó con el paquete estadístico GraphPad InStat. Para la confrontación de los

resultados y verificación de la diferencias entre control y tratamiento, se realizó la prueba  $t$  de Student para medias de muestras independientes. Se tomaron como diferencias significativas aquellas que presentaron un valor de probabilidad  $p < 0,05$ . Previamente se comprobó la distribución normal de los valores por el método de Kolmogorov y Smirnov. Para evaluar el tamaño o la magnitud del efecto en los parámetros de crecimiento, se realizó el test de Cohen, donde un valor entre 0,2 y 0,5, corresponde a una magnitud de efecto pequeña, entre 0,5 y 0,8, mediana y mayor a 0,8, un tamaño de efecto grande (Cohen, 1992).

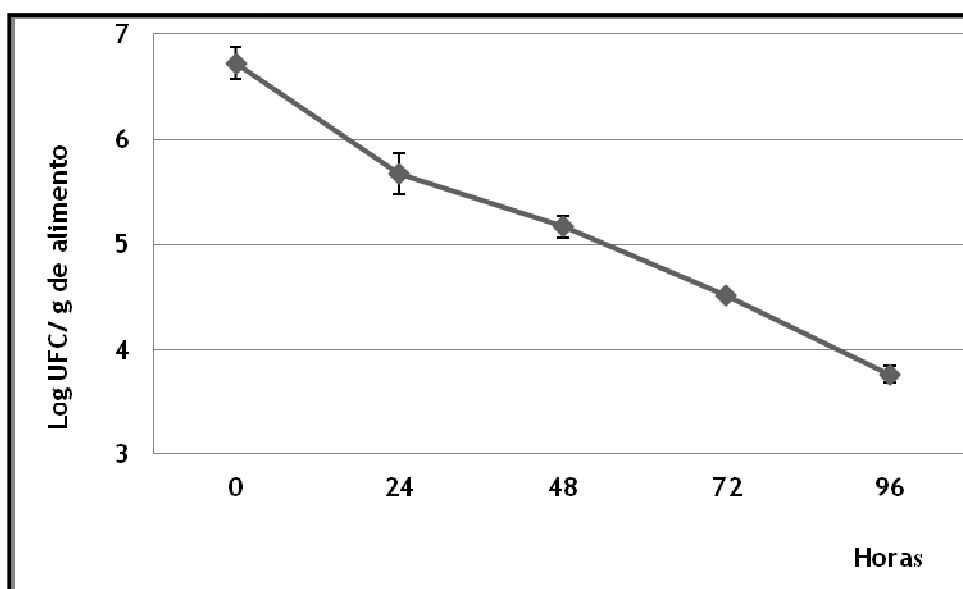


### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Preparación del suplemento probiótico

a) *Liofilización*: El número de células viables en el liofilizado fue controlado semanalmente con un recuento en placa en agar MRS; el recuento se mantuvo durante un año en aproximadamente  $10^{12}$  UFC/mL tanto para las muestras liofilizadas con 10 % de leche descremada como para aquellas en las que se utilizó 20 % de la misma. Al no observarse cambios en los recuentos, se decide usar la concentración de 10 % de leche como crioprotector para la conservación de la cepa F2.

b) *Preparación del suplemento probiótico en el alimento*: La Figura 3.2 muestra la viabilidad de la cepa F2 en el alimento en el tiempo. Debido a la disminución observada en el recuento, se decide preparar diariamente el suplemento probiótico para los ensayos de engorde de los animales.



**Figura 3.2** Supervivencia de la cepa F2 en el alimento. Las barras de error indican la desviación estándar de los resultados con respecto a la media.

### **3.2 Ensayo de seguridad de la cepa F2 sobre trucha arcoíris**

En esta experiencia, un vial de liofilizado se mezcló directamente con la ración diaria de alimento. Es importante señalar que luego de 48 o 72 h de alimentar los peces con el alimento mezclado con el liofilizado, se observaron cambios en el comportamiento, movimientos infrecuentes y rechazo al alimento. Sin embargo, no hubo mortalidad de los animales por este motivo, y pocos días después de suspendido el alimento, los animales recuperaron su comportamiento normal. Debido a esto se sacrificó un animal de cada tanque de la UT y personal de la cátedra de Patología de Animales Acuáticos de la UNS, realizó disecciones de estos animales, no observando daños en los órganos estudiados. Estos efectos fueron adjudicados a la presencia de la leche utilizada como crioprotector de la cepa. Una consulta con el Dr. José Luis Balcázar (Universidad de Girona, España) confirmó que la leche podría provocar trastornos gastrointestinales, y por lo tanto, se decide eliminarla por lavados sucesivos con PBS para continuar los ensayos de inocuidad durante 10 días más, con la adición del probiótico directamente al agua de cultivo, siguiendo la metodología explicada en el punto 2.1.4. En esta nueva etapa no se observaron cambios en el comportamiento de los peces, la alimentación fue normal y la supervivencia general del ensayo fue del 100 % por lo que la cepa F2 fue considerada inocua para la realización de los ensayos de engorde.

### **3.3 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el agua de cultivo**

Luego de la administración del probiótico, directamente al agua de cultivo durante 77 días, no se observaron patologías ni cambios en el comportamiento de los peces, confirmando los resultados observados en la

experiencia anterior. No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia en ambas unidades: 94.67 %  $\pm$  2.31 y 93.33 %  $\pm$  2.31 para UC y UT, respectivamente ( $p > 0.05$ ). La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos en este ensayo. La Figuras 3.3 y 3.4 muestran los resultados obtenidos de la TEC e ICA en cada período de muestreo.

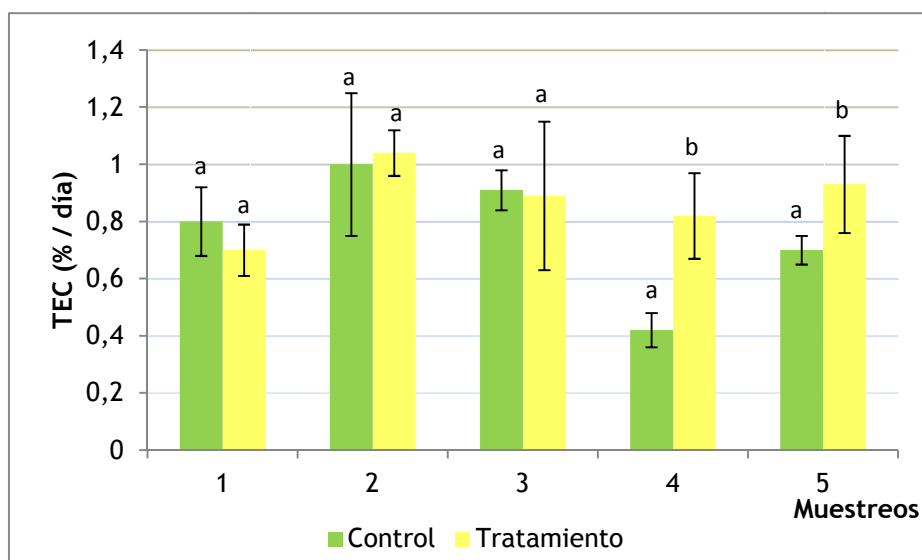
**Tabla 3.1** Parámetros de crecimiento de trucha arcoíris durante el engorde con la administración del probiótico en el agua

	UC	UT	$p^*$	TE
Peso medio inicial (g $\pm$ DS)	108,52 ( $\pm$ 3,88)	97,57 ( $\pm$ 4,83)	0,037	-
Peso medio final (g $\pm$ DS)	199,25 ( $\pm$ 3,89)	195,84 ( $\pm$ 8,64)	0,57	-
GPP (% $\pm$ DS) )	83,7 ( $\pm$ 3,0)	100,8 ( $\pm$ 6,1)	0,012	3,5
TEC (%/día $\pm$ DS)	0,78 ( $\pm$ 0,02)	0,87 ( $\pm$ 0,01)	0,0021	5,6
ICA (g alim/g pez $\pm$ DS)	1,47 ( $\pm$ 0,07)	1,48 ( $\pm$ 0,05)	0,94	-

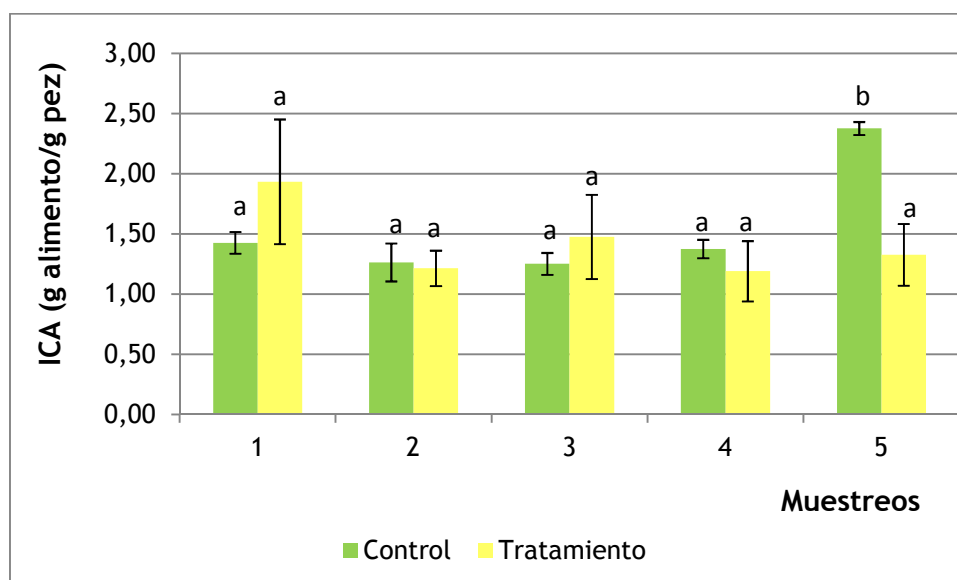
Valores medios obtenidos de 3 tanques para la unidad control (UC) y la unidad tratamiento (UT)

TEC: tasa específica de crecimiento; ICA: índice de conversión del alimento; GPP: ganancia promedio de peso

\*Probabilidad asociada con la prueba t de Student a dos colas. DS: desvío estándar. TE: tamaño del efecto



**Figura 3.3** Tasa específica de crecimiento de trucha arcoíris durante el ensayo de engorde con la administración del probiótico en el agua en los muestreos quincenales. Las barras de error indican la desviación estándar de los resultados con respecto a la media. Letras diferentes en el mismo período indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.4** Índice de conversión alimentaria de trucha arcoíris durante el ensayo de engorde con la administración del probiótico en el agua en los muestreos quincenales. Las barras de error indican la desviación estándar de los resultados con respecto a la media. Letras diferentes en el mismo período indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Experiencia de engorde con la administración del probiótico en el alimento

Luego de la administración del probiótico como suplemento de la dieta base, no se observaron patologías ni cambios en el comportamiento de los peces. Tampoco se observaron diferencias en la supervivencia en ambos sistemas ( $p > 0.05$ ): 100 %  $\pm$  0,00, para la UC y 98,81 %  $\pm$  2,06, para la UT.

La Tabla 3.2 muestra los valores de los parámetros de crecimiento.

**Tabla 3.2** Parámetros de crecimiento de trucha arcoíris durante el engorde con la administración del probiótico en el alimento

	UC	UT	$p^*$	TE
Peso medio inicial (g $\pm$ DS)	31,19 ( $\pm$ 0,43)	31,25 ( $\pm$ 0,69)	0,95	-
Peso medio final (g $\pm$ DS)	97,21 ( $\pm$ 1,64)	102,60 ( $\pm$ 2,81)	0,015	1,3
GPP (% $\pm$ DS) )	211,63 ( $\pm$ 0,66)	228,55 ( $\pm$ 4,50)	0,003	5,0
TEC (%/día $\pm$ DS)	1,71( $\pm$ 0,01)	1,81 ( $\pm$ 0,04)	0,015	3,3
ICA (g alim/g pez $\pm$ DS)	1,25 ( $\pm$ 0,04)	1,19 ( $\pm$ 0,06)	0,02	1,2

Valores medios obtenidos de 3 tanques para la unidad control (UC) y la unidad tratamiento (UT)

TEC: tasa específica de crecimiento; ICA: índice de conversión del alimento; GPP: ganancia promedio de peso

\*Probabilidad asociada con la prueba t de Student a dos colas. DS: desvío estándar. TE: tamaño del efecto

### 3.5 Controles microbiológicos y fisicoquímicos del agua

Durante las experiencias de engorde, por adición del probiótico al agua o como parte del alimento, las muestras de agua mostraron valores de RHP menor o igual a  $10^4$  UFC/mL y no se detectaron bacterias coliformes totales ni pseudomonas del grupo fluorescente en 100 mL (NMP < 3/100 mL), para ambas unidades UC y UT. Los recuentos de BAL para ambas unidades fueron menores a 10 UFC/mL.

El pH del agua se mantuvo entre 7,5 y 7,8, los valores de amonio no excedieron los 0,2 mg/L, los nitritos se mantuvieron a valores menores a 0,5 mg/L mientras que el oxígeno, en 5,8 mg/L (Klontz, 1991; Buttner *et al*, 1993). Los resultados microbiológicos y físicoquímicos indicaron que la calidad del agua se mantuvo durante toda la experiencia, adjudicando estos resultados al buen manejo del sistema de cultivo (WHO, 1989, El-Shafai *et al*, 2004).

### **3.6 Estudios microbiológicos de detritos en la experiencia de engorde con el agregado del probiótico con el alimento**

Los recuentos de hongos enterobacterias y BAL de muestras de detritos tomadas de los tanques de sedimentación de cada unidad se muestran en las Figuras 3.5, 3.6 y 3.7, respectivamente. Cabe aclarar que en las placas de recuento de hongos solo desarrollaron levaduras. Cabe destacar que en los residuos sólidos obtenidos de la UT, los recuentos de enterobacterias y hongos se mantuvieron por debajo de los niveles observados en la UC desde la tercera y cuarta semana del experimento respectivamente, resultados que coinciden con el aumento de BAL en la UT. Es importante aclarar que no hay réplicas de este análisis puesto que cada unidad contaba con un solo decantador.

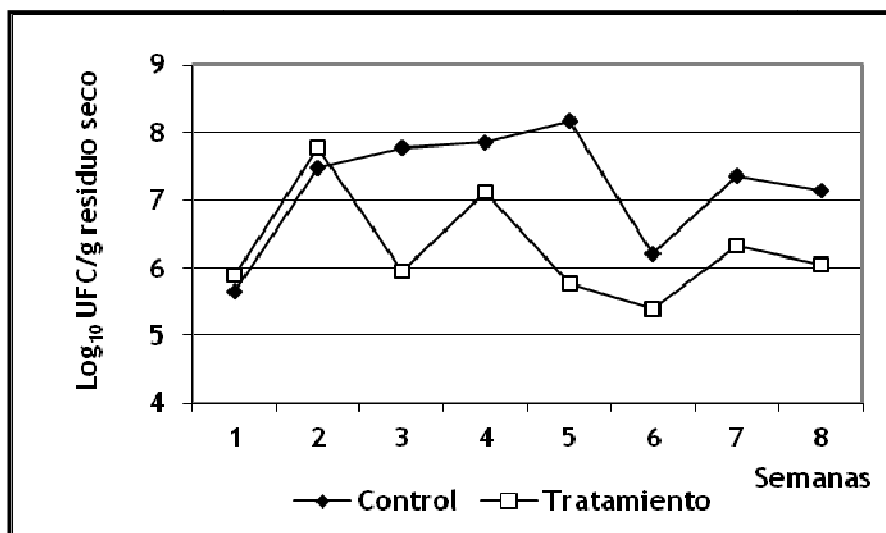


Figura 3.5 Recuento de Enterobacterias en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.

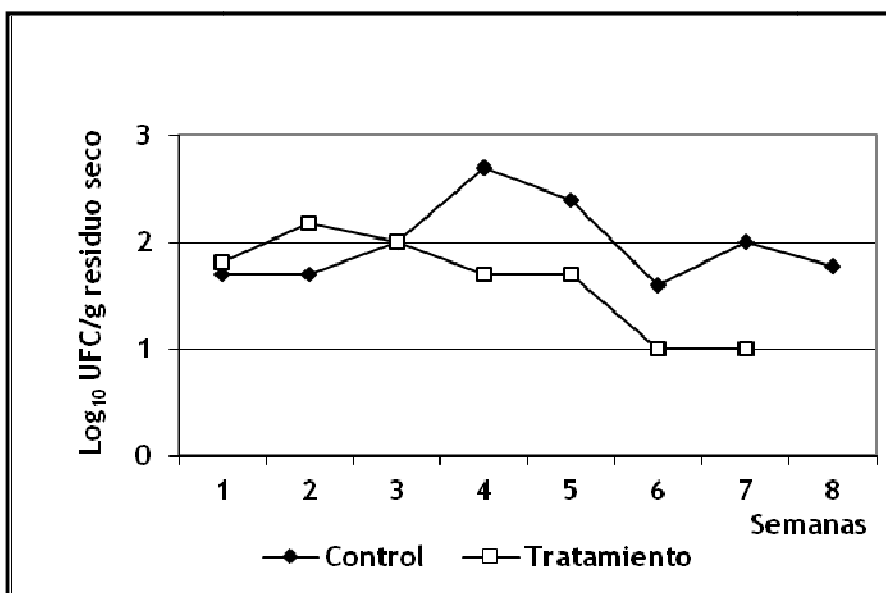


Figura 3.6 Recuento de Hongos en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.

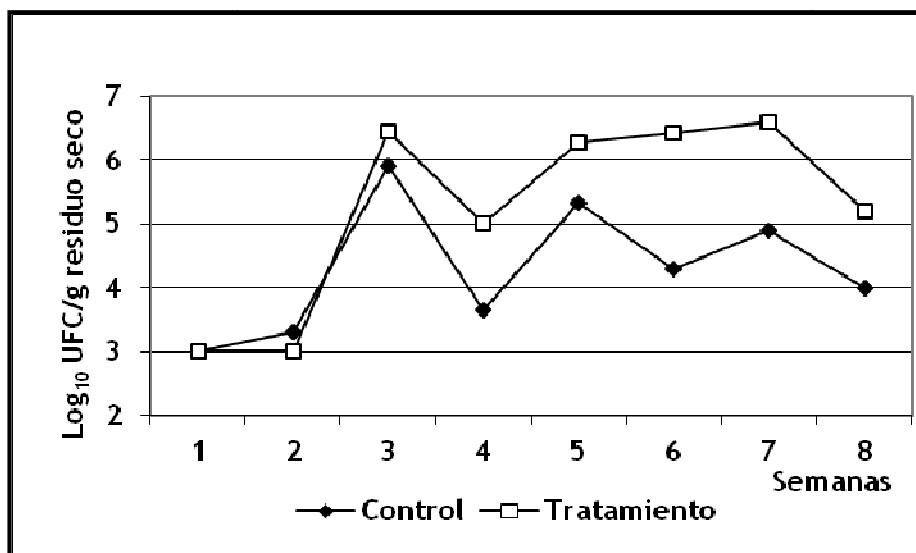


Figura 3.7 Recuento de BAL en los detritos durante el ensayo de engorde con la adición del probiótico en el alimento.



## 4 DISCUSIÓN

Los ensayos de evaluación de efectos beneficiosos de la cepa F2 en el engorde de trucha arcoíris fueron realizados en un modelo experimental de cría de juveniles de esta especie con sistemas de recirculación de agua, modelo que se adecua a la industria de cría de peces en nuestra región.

La liofilización de la cepa F2 utilizando leche descremada al 10 % resultó ser un método adecuado de conservación de la cepa, manteniendo un alto recuento de células viables por un lapso de un año. Sin embargo, como se explicó anteriormente, la leche descremada no puede formar parte del alimento de las truchas, debido a los efectos observados en los animales. Por este motivo, se tomó la decisión que cada vez que se aplicara el probiótico, ya sea con el alimento o directamente en el agua, se debía eliminar la leche del liofilizado por medio de lavados. Sería importante continuar estudiando diferentes crioprotectores que no presenten efectos adversos sobre los animales, para optimizar tanto la conservación de la cepa como la manera de suplementar el alimento.

Como se observa en la Figura 3.2, la viabilidad de la cepa F2 en el alimento, cuando ésta fue agregada al mismo utilizando una técnica de spray, disminuyó diariamente, indicando una baja supervivencia de la misma. Debido a esto y a fin de asegurar una densidad apropiada del la BAL, se decide preparar diariamente el alimento suplementado con el probiótico para los ensayos de engorde.

Los sistemas cerrados de recirculación de agua son utilizados frecuentemente para el cultivo de peces y tienen como principal ventaja la

reutilización del agua y la disminución sustancial, cercana al 90 %, en la eliminación de efluentes. Para sustentar un sistema de engorde de los animales es necesario implementar medidas adecuadas para mantener la calidad del agua en condiciones óptimas debido a que la misma es de vital importancia en el éxito o fracaso de la acuicultura.

En nuestro caso, el agua fue provista por una perforación sin tratamientos previos, considerada apta tras la realización de análisis físicos, químicos y microbiológicos. El flujo de agua establecido en los tanques y los recambios periódicos de la misma, permitieron una correcta aireación del sistema. La temperatura se mantuvo en  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , por el correcto funcionamiento de los sistemas enfriadores utilizados. Los residuos sólidos fueron eliminados diariamente de los tanques de engorde y de los decantadores por método “sifón”. El mantenimiento de estas prácticas permitió el correcto funcionamiento de los biofiltros (Francis-Floyd, 2003; Çağırğan, 2009).

El proceso de reacondicionamiento y renovación del agua fue adecuado y esto fue reflejado con los grupos microbianos estudiados y las determinaciones fisicoquímicas del agua durante ambas experiencias que, sumado a las buenas prácticas de acuicultura implementadas durante todos los ensayos, se puede concluir que la calidad del agua fue buena durante las experiencias (Buttner *et al*, 1993). Estas observaciones son consistentes con el estudio de Arredondo-Figueroa *et al* (2006) en un sistema de recirculación de agua para el cultivo intensivo de trucha arcoíris.

En los ensayos de inocuidad y debido a los efectos adversos observados por la leche descremada utilizada como crioprotector (aún en pequeñísimas

cantidades), se decide suspender la experiencia y ayunar los peces, hasta su recuperación; esto trajo como consecuencia una reducción en el peso de los animales de la UT. Es importante aclarar que el efecto adverso observado no produjo reducción del número de peces por mortalidad. El ensayo de inocuidad se completó en días posteriores, con el agregado de la cepa F2 directamente al agua de cultivo, previa eliminación de la leche descremada. Los resultados demostraron que *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans* F2, aislada de *R. arcuata*, no fue perjudicial para la trucha arcoíris puesto que no se observó la ocurrencia de ninguna patología ni modificaciones en el comportamiento de los animales. Tampoco se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los animales, tanto en los ensayos de seguridad como cuando el probiótico fue suministrado al agua de cultivo o como parte del alimento balanceado, ambos comparados con el control, sin la adición del probiótico.

Cuando se realizó el ensayo de engorde con la adición de la cepa F2 al agua, los pesos iniciales de los peces de la UC fueron significativamente superiores a los de la UT (Tabla 3.1), puesto que se utilizaron los mismos animales del ensayo de inocuidad, previo a realizar nuevamente el pesaje del lote. La TEC global calculada para la primera experiencia fue significativamente mayor para la UT comparada con la UC, al igual que la GPP. Sin embargo, como se observa en la Figura 3.3, esta diferencia entre las TEC para ambas unidades no fue significativa en los diferentes muestreos quincenales, excepto en el cuarto y quinto muestreo. Si bien el ICA global para esta experiencia no mostró diferencias significativas, en el último muestreo quincenal se observó un importante aumento de este parámetro

para la UC, mientras que se mantuvo constante en la UT (Figura 3.4), lo que podría estar indicando una mejor eficiencia en la conversión del alimento para los peces de la UT, es decir, se necesitó menos cantidad de alimento para convertirlo en 1 g de biomasa. La demora en la aparición de efectos benéficos podría deberse a la baja densidad final del probiótico en el agua y a la dinámica del sistema, que debido a la recirculación de agua en los tanques, probablemente existió poco tiempo de contacto del probiótico con el hospedador. Estos resultados nos animaron a continuar los ensayos con la adición del probiótico en el alimento asegurando la ingestión de una dosis mayor de la cepa F2. Además, esta estrategia nos aseguraría la llegada del probiótico al intestino.

Para la experiencia de engorde con el agregado del probiótico en el alimento en una concentración final de  $10^6$  UFC/g de alimento, se decide pesar los peces solamente al inicio y final del ensayo, debido al estrés observado en los pesajes quincenales del ensayo de engorde anterior. En esta nueva experiencia, se observaron diferencias significativas en la UT con respecto a la UC, en todos los parámetros de crecimiento testeados (Tabla 3.2). Estos datos demuestran una mejora tanto en el crecimiento como en la eficiencia en la utilización del alimento, cuando se administró la cepa F2. La misma tendencia fue observada por Merrifield *et al* (2010b) al alimentar juveniles de trucha arcoíris con una dieta suplementada con *Enterococcus faecium*.

Es importante destacar que la TEC media registrada en las dos experiencias, tanto para la UT como para la UC, son concordantes con la

---

reportada en la literatura por Noel y Le Bail (1997) para esta especie (0.75 a 2.25 %/día).

En ambos ensayos de engorde, no se detectaron BAL en las muestras de agua analizada y este hallazgo concuerda con los resultados de otros autores (Suzer *et al*, 2008; Barbosa *et al*, 2011). Como se mencionó anteriormente, la dinámica del sistema podría favorecer la colonización en el mismo (tanques, cañerías, biofiltros) y éste podría ser el motivo de la no recuperación de estas bacterias a partir de muestras del agua. Teniendo en cuenta los resultados de la supervivencia de F2 en el agua de cultivo y los efectos beneficiosos observados en el crecimiento de los animales, la ausencia de F2 en el agua también podría estar indicando la colonización de este grupo de bacterias en los peces. Sin embargo, esta observación debería confirmarse con la recuperación de la cepa F2 a partir de muestras de peces.

El análisis microbiológico de los residuos sólidos o detritos presentes en los tanques decantadores, tuvo la finalidad de evaluar en forma indirecta, cambios en la microbiota del contenido intestinal de los peces debido al tratamiento con el probiótico. Estos análisis se realizaron durante la experiencia de engorde de los animales con la administración del probiótico como suplemento del alimento. El alimento se administró manualmente de modo de reducir la probabilidad de que éste no fuera consumido, por lo que se puede decir que los detritos estaban formados principalmente por la materia fecal de los animales, acumulada durante 24 h, desde la última limpieza de los decantadores. En un principio, se sospechó que el incremento de BAL observada en la UT respecto a la UC podría deberse a la presencia de pequeños restos de alimentos inoculados con la cepa (Figura 3.7). De ser así,

el incremento se debería haberse observado desde las primeras semanas de experiencia. Sin embargo el aumento de BAL se comenzó a detectar en la tercer semana, el mismo se mantuvo y profundizó en el resto del ensayo. Esto nos lleva a proponer que el incremento de BAL en los detritos de la UT respecto a la UC fue debido a la supervivencia y colonización de la cepa F2 en el intestino de los peces. La disminución de los hongos y las enterobacterias observadas en la UT respecto a la UC (Figuras 3.5 y 3.6), podría ser debida a un efecto antagónico de la cepa F2 contra estos microorganismos (Gatesoupe, 1999; Balcazar *et al*, 2006a, 2008).

Las diferencias estadísticas detectadas en el crecimiento en las dos experiencias, nos alientan a decir que el uso de *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans* F2 puede mejorar el rendimiento del crecimiento del cultivo de juveniles de trucha arcoíris en un sistema de recirculación de agua. No obstante, se deben continuar los estudios para determinar la dosis y manera de suministrar un probiótico para optimizar su aplicación en un cultivo intensivo.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, el potencial productivo de la acuicultura en nuestro país es sustancialmente importante (SAGPyA, 2001) y cambios leves en la eficiencia de producción en una industria de tal magnitud, pueden representar beneficios por miles o millones de dólares, siendo la alimentación uno de los aspectos productivos más influyentes. Nuestros ensayos se realizaron en un diseño experimental a nivel laboratorio utilizando pocos animales y permitieron demostrar un efecto benéfico de la cepa F2 en el crecimiento de juveniles de trucha arcoíris, siendo la magnitud del tamaño del efecto testeado grande (mayor a 0,8) en

todos los parámetros de crecimiento. Sin embargo, es necesario profundizar los estudios para que los mismos puedan extrapolarse a un cultivo intensivo comercial de trucha arcoíris, con el fin de lograr una producción más eficiente y rentable.

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

El objetivo general de esta tesis fue aislar y seleccionar cepas de bacterias del ácido láctico con potencialidad probiótica del estuario de Bahía Blanca, a fin de considerar su aplicación en el mejoramiento del cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Este estudio es el primer reporte sobre el aislamiento de BAL a partir de sedimentos y peces de un ambiente costero de la Argentina. El valor del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral radica en la extensión del conocimiento de las propiedades probióticas de BAL aisladas de un hábitat no estudiado en nuestro país, para su potencial aplicación en salmonicultura. Además, los ensayos de evaluación *in vivo* de efectos beneficiosos fueron realizados en un modelo de cría experimental con recirculación de agua, que se adecua a la industria de cría de peces en nuestra región semiárida.

En respuesta a la primera hipótesis parcial:

- Se aislaron 22 cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus*. En función de los resultados obtenidos, se observó que la composición de BAL en los sedimentos fue diferente a la hallada en los peces estudiados, lo que podría estar indicando algún tipo de adaptación a cada hábitat. Sin embargo, es necesario continuar los estudios para verificar esta observación.
- Cuando se ensayaron los sobrenadantes crudos de los cultivos de las BAL aisladas, todas las cepas presentaron efectos inhibitorios, al

menos frente a una bacteria patógena indicadora, tres de ellas, frecuentes patógenos asociados a salmónidos. Se puede concluir que la presencia de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, solos o actuando sinérgicamente, fueron los responsables de la inhibición de *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae* y *Listeria monocytogenes*.

- Solo 12 cepas demostraron poseer actividad antagónica frente a todos los patógenos seleccionados. Por su potencialidad antimicrobiana, su identificación y por ser considerados GRAS (a excepción del género *Enterococcus*), estas 12 cepas de BAL fueron seleccionadas para completar los estudios de evaluación de sus propiedades probióticas.

Para dar respuesta a la segunda hipótesis parcial y en función de la evaluación de las propiedades probióticas, se concluye:

- La mayoría de las cepas estudiadas mostraron características promisorias ya que presentaron buena capacidad de adhesión, estabilidad frente a la bilis de trucha arcoíris, baja ocurrencia de resistencia adquirida a ATM y ausencia de actividad hemolítica. Además, todas ellas exhibieron la capacidad de inhibir la adhesión al mucus de alguno de los patógenos ensayados, en al menos una modalidad (competencia, exclusión o desplazamiento), con un porcentaje de inhibición medio  $\geq$  al 40 %, tomado como línea de

corte. Las cepas F2 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*), F10 y F11 (ambas identificadas como *Weissella viridescens*) y S19 (*Lactobacillus pentosus*) fueron las cepas que mejor cumplieron con los criterios de selección de probióticos para su utilización en acuicultura. Estos resultados abren la posibilidad de futuros estudios en esta línea de investigación.

- Para realizar los ensayos *in vivo* en un cultivo de trucha arcoíris, se seleccionó la cepa F2, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*. Esta selección se basó en que esta cepa, además de cumplir con los criterios de selección, presentó buena tolerancia al pH gástrico de trucha arcoíris y ausencia de resistencia adquirida a los antimicrobianos. F2 mantuvo su capacidad de adhesión a mucus de trucha arcoíris en el agua de cultivo, tanto en condiciones estáticas como en condiciones de flujo laminar y fue capaz de sobrevivir, al menos 24 h, en el agua del sistema de cría

En respuesta a la tercera hipótesis parcial, se concluye:

- Durante la administración de la cepa F2 a los juveniles de trucha arcoíris, se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia y ausencia de cambios en el comportamiento de los animales. Por lo cual la cepa F2 fue considerada inocua para esta especie.

- En los ensayos de engorde de juveniles de trucha arcoíris, la adición de F2 al agua de cultivo o como suplemento de la dieta base, produjo cambios significativos en los parámetros de crecimiento evaluados. Sin embargo, la mejora en la eficiencia de la conversión alimentaria, solo se puso de manifiesto cuando la cepa F2 fue administrada con el alimento, concluyendo que la dosis y el modo de administrar este probiótico son importantes para obtener un beneficio en el crecimiento de los animales.

Como conclusión final, se puede decir que la cepa F2, *Lactobacillus paracasei* subsp *tolerans*, aislada de intestino de *Ramnogaster arcuata*, especie que cumple su ciclo de vida completo en el estuario de Bahía Blanca, muestra buenas perspectivas para su aplicación como probiótico en el cultivo de trucha arcoíris. Son necesarios futuros estudios para optimizar las dosis, la forma y el tiempo de suplementación. Especial atención debe centrarse en la elaboración del alimento suplementado con el probiótico, en los estudios inmunológicos, en el desarrollo de desafíos *in vivo* con patógenos y estudios de respuesta al estrés. También sería importante el ensayo de otras de las cepas de BAL estudiadas, como por ejemplo las correspondientes a *Weissella viridescens*, puesto que fue una especie aislada de tracto gastrointestinal de todos los peces estudiados. Este estudio además demuestra que BAL provenientes de un ambiente acuático con influencia marina presentan potencialidad probiótica para ser utilizadas en el cultivo de una especie de agua dulce. Estos conocimientos podrán ser aplicados para el desarrollo de alimentos probióticos para acuicultura, preparados con cepas indígenas, que

tendrán impacto en un sector de la producción cuyo desarrollo en el país se debe fortalecer, evitando el uso de cepas importadas y de antimicrobianos, con los riesgos ambientales y sanitarios que esto implica.

# ANEXO

## ANEXO

### 1 Medios de cultivo

#### 1.1 Caldo y agar MRS

Proteosa Peptona	10,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
Extracto de carne	8,0 g
D (+) glucosa	20,0 g
Monoleato de sorbitán	1 mL
Fosfato dipotásico	2,0 g
Acetato de sodio	5,0 g
Citrato de amonio	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH = 6,4 ± 0,2	

Se agarifica con el agregado de agar-agar en proporción del 1,2 % (p/v)

#### 1.2 Caldo y agar MRS modificado

De igual composición al caldo MRS, sin el agregado de citrato de amonio y acetato de sodio

Se agarifica con el agregado de agar-agar en proporción del 1,2 % (p/v). Tanto el caldo como el agar se alcalinizan con NaOH 1N hasta pH 8,0

#### 1.3 Agar Eosina Azul de metileno Lactosa según Levine

Peptona de carne	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Di-potasio hidrogenofosfato	2,0 g
Eosina	0,065 g
Azul de metileno	13,5 g
Agar-agar	12 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH= 7,0 ± 0,2	

#### 1.4 Agar Müeller Hinton

Peptona ácida de caseína	17,5 g
Infusión de carne	300,0 g
Almidón	1,5 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH= 7,3 ± 0,1	

**1.5 Agar nutritivo**

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Agar-agar	12,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH=	7,0 ± 0,2

**1.6 Agar-papa-dextrosa**

Infusión de papa	4,0 g
D (+) glucosa	20,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH=	5,6 ± 0,1

**1.7 Agar Plate Count (Agar peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura)**

Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
D (+) glucosa	1,0 g
Agar-agar	14,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH=	7,0±0,1

**1.8 Agar sangre**

Infusión de corazón	375,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH=	7,3 ± 0,2

Esterilizar 20 minutos a 121°C. Enfriar a 45-50°C agregar sangre desfibrinada de carnero al 5 % (v/v). Homogeneizar y distribuir en placas.

**1.9 Agar tripticasa de soja**

Tripteína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
NaCl	5,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH=	7,3 ± 0,2



**1.10 Agar Violeta cristal Rojo neutro Bilis glucosa**

Peptona de carne	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
NaCl	5,0 g
Glucosa	10,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Violeta cristal	0,002 g
Agar-agar	13,0 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH= 7,4 ± 0,1	
<u>No autoclavar</u>	

**1.11 Caldo King B**

Peptona de caseína	10,0g
Peptona de carne	10,0 g
SO <sub>4</sub> Mg	1,5 g
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	1,5 g
Glicerina	10,0 mL
Agua destilada c.s.p	1 L
pH= 7,2 ± 0,1	

**1.12 Caldo Mac Conkey**

Peptona de caseína	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Bilis de buey desecada	5,0 g
Púrpura de Br. Cresol	0,01g
Agua destilada c.s.p	1 L
pH= 7,1±0,1	

**1.13 Caldo tripticasa de soja**

Tripteína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
NaCl	5,0 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada c.s.p.	1 L
pH= 7,3 ± 0,2	

## 2 Buffer Fosfato Salino (PBS)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,87 g	Concentración final 0,1 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68 g	
NaCl	8,77 g	
Agua destilada c.s.p.	1 L	
pH = 7,2 ± 0,1		

## 3 Pruebas bioquímicas

### 3.1 Prueba de la catalasa

Con una aguja de inoculación o ansa bacteriológica recta estéril, tomar el centro de una colonia pura de BAL de 18 a 48 h y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 30%, sobre la colonia puesta en el portaobjetos, usando un gotero o pipeta Pasteur. La prueba se considera positiva al observar de inmediato la formación de burbujas.

## 4 Recuento directo por microscopía de epifluorescencia

La solución stock de diacetato de fluoresceína (FDA; C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, Sigma-Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) se preparó disolviendo 20 mg de FDA en 10 mL de acetona (Dorwil, Industria Argentina) para una concentración final de 2 mg/mL (0.2 % p/v) conservada a -18 °C. La solución de uso (0.04 % p/v) se preparó disolviendo 1 mL de la solución stock en 50 mL de PBS 0.1 M pH 7.2 para ser utilizada en el momento.

Para el recuento celular las superficies de acero inoxidable se sumergieron durante 90 min con la solución de uso de FDA a 25 ± 1 °C en la oscuridad, con agitación a 50 rpm.

La observación se realizó con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX 51 usando un objetivo apocromático de inmersión en aceite con una escala de reproducción 100 X, dando un aumento total de 1000 X. Se

contaron como mínimo 20 campos por segmento. El área de campo se calculó según la siguiente fórmula:

$$A = \pi \cdot (1/2 D)^2$$

$$D = n^\circ \text{ del ocular} / \text{ER}$$

Donde D = diámetro del campo en observación; ER = escala de reproducción del objetivo utilizado para la observación; A = área del campo en observación.

### 5 Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Halos de inhibición obtenidos para las cepas de referencia

Para el control de calidad del ensayo de susceptibilidad de BAL a los antimicrobianos, se utilizaron las siguientes cepas control ATCC (WHONET, 2010):

<b>Cepa</b>	<b>Factores que evalúa e interpretación</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Calidad de los discos de ATM.</li> <li>- Concentración de cationes Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> del medio de cultivo: halos por debajo del rango de referencia para aminoglucósidos y tetraciclinas cuando aumenta la concentración de estos cationes.</li> <li>- pH: aumento de de las zonas de inhibición para tetraciclina y el efecto opuesto para aminoglucósidos cuando el pH del medio disminuye. Todo lo contrario cuando el pH aumenta.</li> </ul>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Calidad de los discos de ATM.</li> <li>- pH: disminución de de las zonas de inhibición para macrólidos cuando el pH del medio disminuye. Todo lo contrario cuando el pH aumenta.</li> </ul>
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de timina/timidina: este compuesto interfiere en la actividad de trimetoprima-sulfametoxazol. Timina/timidina en exceso en el medio de cultivo determina halos de inhibición &lt; a 20 mm para esta cepa.</li> <li>- Control negativo de screening de resistencia a van.</li> </ul>

**Tabla A.1 Halos de Inhibición para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Halos de inhibición*			
Antimicrobiano	Valores de referencia	Agar MRS	Agar Müeller Hinton
VAN	≥ 17	19	21
TMS	> 20	0	23

VAN: vancomicina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol. (\*) Valores de referencia y del control, en mm, para los halos de inhibición.

**Tabla A.2 Halos de Inhibición para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
Halos de inhibición*			
Antimicrobiano	Valores de referencia	Agar MRS	Agar Müeller Hinton
PEN	26-37	27	30
AMP	27-35	27	32
CXM	27-35	35	31
CEF	29-37	30	33
CTX	25-31	27	29
VAN	17-21	17	19
CLI	24-30	25	29
CMP	19-26	20	24
TET	24-30	22	28
ERI	22-30	22	27
CIP	22-30	23	27
TMS	24-32	0	26
GEN	19-27	19	24
NIT	18-22	19	21

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, CXM: cefuroxima, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, CLI: clindamicina, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, GEN: gentamicina, NIT: nitrofurantoína. (\*) Valores de referencia y del control, en mm, para los halos de inhibición.

Tabla A.3 Halos de Inhibición para *Escherichia coli* ATCC 25922

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Halos de inhibición*			
Antimicrobiano	Valores de referencia	Agar MRS	Agar Müeller Hinton
AMP	16-22	17	21
CXM	20-26	20	24
CEF	15-21	16	19
CTX	29-35	29	33
CMP	21-27	21	26
TET	18-25	25	23
CIP	30-40	31	38
TMS	23-29	11	25
GEN	19-26	19	22
NIT	20-25	21	24

AMP: ampicilina, CXM: cefuroxima, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, GEN: gentamicina, NIT: nitrofurantoína. (\*) Valores de referencia y del control, en mm, para los halos de inhibición.

Tabla A.4 Puntos de corte de los halos de inhibición de los géneros *Enterococcus* y *Staphylococcus* (CLSI 2009)

ATM	<i>Enterococcus</i> sp			<i>Staphylococcus</i> sp		
	Puntos de corte del diámetro del halo de inhibición (mm)					
	S	I	R	S	I	R
PEN	≥ 15	-	≤ 14	≥ 29	-	≤ 28
AMP	≥ 17	-	≤ 16	≥ 29	-	≤ 28
CXM	-	-	-	≥ 18	15 - 17	≤ 14
CEF	-	-	-	≥ 18	15 - 17	≤ 14
CTX	-	-	-	≥ 23	15 - 22	≤ 14
VAN	≥ 17	15 - 16	≤ 14	-	-	-
CLI	-	-	-	≥ 21	15 - 20	≤ 19
CMP	≥ 18	13 - 17	≤ 12	≥ 18	13 - 17	≤ 12
TET	≥ 19	15 - 18	≤ 14	≥ 19	15 - 18	≤ 14
ERI	≥ 23	14 - 22	≤ 13	≥ 23	14 - 22	≤ 13
CIP	≥ 21	16 - 20	≤ 15	≥ 21	16 - 20	≤ 15
TMS	-	-	-	≥ 16	15 - 11	≤ 10
GEN	-	-	-	≥ 15	13 - 14	≤ 12
NIT	≥ 17	15 - 16	≤ 14	≥ 17	15 - 16	≤ 14

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, CXM: cefuroxima, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, VAN: vancomicina, CLI: clindamicina, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, ERI: eritromicina, CIP: ciprofloxacina, TMS: trimetoprima-sulfametoxazol, GEN: gentamicina, NIT: nitrofurantoína. S: sensible; I: resistencia intermedia; R: resistente.

## 6 Determinación de proteínas por el método de Lowry

### 6.1 Preparación de reactivos

Reactivo A =  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % P/V en NaOH 0,1N.

Reactivo B =  $\text{CuSO}_4$  0.5 % P/V en tartrato de sodio y potasio 1 % P/V.

Reactivo C = 50 mL de A + 1 mL de B.

Reactivo D = Folin diluido al medio con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada (HCl 0,2N)

### 6.2 Solución stock de seroalbumina bovina (BSA)

Se prepara un patrón stock de BSA pesando la misma y se lleva a volumen con agua, hasta obtener una concentración final de 1,0 mg/mL.

### 6.3 Técnica

- Agregar a la muestra/patrón 3 mL del reactivo de Lowry (A + B).
- Mezclar bien e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 300  $\mu\text{L}$  de solución D. Homogeneizar inmediata y vigorosamente en vortex.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y leer en espectrofotómetro a 500 nm.

### 6.4 Curva de calibrado\*

	Patrón 1 mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	DO* (500 nm)	Proteínas (mg/mL)
Blanco	-	500	0,011	-
T1	25	475	0,052	0,5
T2	50	450	0,092	1,0
T3	75	425	0,123	1,5
T4	100	400	0,168	2,0
T5	150	350	0.229	3,0
T6	200	300	0.307	4,0
T7	250	250	0.359	5,0
D1**	50 $\mu\text{L}$ de muestra	450	0,273	3,6

\* El ensayo se realizó por duplicado y los valores de DO son promedios

\*\* D1: muestra de mucus de la superficie corporal de trucha arcoíris

## 7 Análisis físico químico y microbiológico del agua de perforación para cultivo de trucha arcoíris

### 7.1 Análisis físico-químico: resultados (LANAQUI, Laboratorio de análisis químico; CERZOS - CONICET - UNS)

**PROCEDENCIA Y TIPO DE MUESTRA:** Muestra de agua - Piletas piscicultura.

**ANÁLISIS SOLICITADO:** Análisis multi-elemental cuali-cuantitativo por espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) con nebulización convencional, excepto As (vía generación de hidruros volátiles).

#### Estrategia:

- 1) Análisis Cualitativo: monitoreo de 20 elementos metales/ metaloides tóxico-pesados (berilio, boro, aluminio, vanadio, cromo, hierro, cobalto, níquel, cobre, cinc, arsénico, estroncio, molibdeno, cadmio, estaño, antimonio, mercurio, talio y plomo).
- 2) Aquellos elementos que en la muestra dieron señal significativamente mayor a la presentada por los mismos en el agua tri-destilada fueron sometidos al Análisis cuantitativo, por comparación contra curva de calibración estándar acuosa.

#### RESULTADOS:

**Tabla 1** Intensidades de emisión atómica (análisis cualitativo)

Be	B	Al	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu
0.0011	0.0026	0.011	0.0016	0.0014	0.0002	0.0009	0.0007	0.011	0.0029
Zn	As	Sr	Mo	Cd	Sn	Sb	Hg	Tl	Pb
0.0002	0.0075	0.0001	0.0016	0.0003	0.0019	0.0049	0.0020	0.0089	0.0065
<b>Be</b>	<b>B</b>	<b>Al</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>
<b>0.0032</b>	<b>0.029</b>	<b>0.018</b>	<b>0.060</b>	<b>0.0021</b>	<b>0.043</b>	<b>0.0012</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.020</b>	<b>0.0030</b>
Zn	As	Sr	Mo	Cd	Sn	Sb	Hg	Tl	Pb
<b>0.0004</b>	<b>0.0049</b>	<b>0.19</b>	<b>0.0014</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0031</b>	<b>0.0063</b>	<b>0.0018</b>	<b>0.0083</b>	<b>0.0051</b>

**Referencia:** los valores superiores corresponden al agua tri-destilada; abajo, en negrita los valores obtenidos para la muestra.

**Análisis cualitativo:** Como se observa en Tabla A.4, los elementos berilio, boro, aluminio, vanadio, cromo, manganeso, níquel, estroncio, estaño y antimonio fueron seleccionados para el examen cuantitativo. Los restantes mostraron señales comparables al nivel base del agua tri-distilada, utilizada rutinariamente en este laboratorio debido a su alta pureza.

**Análisis cuantitativo:** los valores hallados se presentan en la siguiente tabla expresados como mg/L (ppm) en solución.

**Tabla 2** Niveles de concentración (contenido total).

<b>Be</b>	<b>B</b>	<b>Al</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>As</b>
< 0.020	0.68	0.313	1.21	< 0.010	0.079
<b>Mn</b>	<b>Ni</b>	<b>Sr</b>	<b>Sn</b>	<b>Sb</b>	
0.812	< 0.020	0.865	0.179	0.244	

Límites máximos tolerables\* (en mg/L):

Be (CH): < 0.0005; B (ADS): 0.750; Al (AS): 1.5; V (ADS): 0.1; Cr (ADS): 0.002;

Mn (ADS): 0.1; Ni (ADS): 0.025; Sr (\*\*): 4; Sb (ADS): 0.016; As (ADS): 0.050

(\*) Combinados de: agua consumo humano (CH), protección de vida acuática en aguas salobres (AS) y protección de vida acuática en aguas dulces superficiales (ADS) (Guía de Calidad de Agua, Ley N° 24585, República Argentina, 2004)

(\*\*) Federal Drinking Water Guidelines (EPA).

**Anexo:** parámetros físico-químicos: valores en mg/L excepto CE (mmhos/cm)

<b>Sodio</b>	<b>Magnesio</b>	<b>Calcio</b>	<b>Dureza</b>	<b>pH</b>	<b>Conductividad Eléctrica (CE)</b>	<b>S (de sulfatos)</b>	<b>P (de fosfatos)</b>
356	28.5	95.8	358	7.7	1.98	86.5	0.151



## 7.2 Análisis microbiológico: resultados

- **Recuento heterótrofo en placa:** 10 UFC/mL (sembrado en agar Plate count e incubado 5 días a 25° C).
- ***Escherichia coli*:** Ausencia en 500 mL de agua (sembrado en caldo Mc Conkey por técnica de filtración de membrana e incubado 72 h a 37° C).
- ***Pseudomonas aeruginosa*:** Ausencia en 500 mL de agua (sembrado en caldo citratado de Koser por técnica de filtración de membrana e incubado 5 días a 25° C).
- **Pseudomonas del grupo fluorescente:** Ausencia en 500 mL de agua (sembrado en caldo King B por técnica de filtración de membrana e incubado 5 días a 25° C).

# BIBLIOGRAFÍA

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbass, A.; Sharifuzzaman, S.M.; Austin, B., 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 33: 31-37.
- Abidi, R. 2003. National Bureau of Fish Genetic Resources. Telibagh, Lucknow-226 002, U.P. India. Vol VII, N°2.
- Ai, Q.; Xu, H.; Mai, K.; Xu, W.; Wang, J. y Zhang, W. 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture 317:155-161.
- Ali, A., 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a bacterial mixture. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences. Umea, Sweden.
- Aly, S.M.; Abdel-Galil, A., 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. Aquaculture Research, 39: 647-656.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, M.; Myers, E. y Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215(3): 403-410.
- Alvarado- Riva, C. y Díaz- Rivero, C. 2009. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. Revista Facultad de Farmacia, 51 (1): 8-14. Venezuela.
- Allen, A. 1983. Mucus: a protective secretion of complexity. Trends Biochem Sci 8:169-173.
- Ammor, M.S.; Florez, A.B. y Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology 24-6, 559-570.
- Ammor, S.; Tauveron, G.; Dufour, E. y Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17(6): 454-461.
- Ammor, S.; Rachman, C.; Chaillou, S.; Prévost, S.; Dousset, X.; Zagorec, M.; Dufour, E.; Chevallier, I. 2005. Phenotypic and genotypic identification of

lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*. 22: 373-382.

- Anderson, J.; Parrish, T.; Akhtar, M.; Zurek, M. y Hirt, H. 2008. Antibiotic Resistance of Enterococci in American Bison (*Bison bison*) from a Nature Preserve Compared to That of Enterococci in Pastured Cattle. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 1726-1730.
- Andlid, T.; Vazquez-Juárez, R. y Gustafsson, L. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7: 115-126.
- ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerios de Salud de la Nación. 2007. Probióticos y Prebióticos.
- Arredondo-Figueroa, J.L.; Barriga-Sosalrene, Á.; Nuñez García, L.G. y Ponce-Palafox, J.T. 2006. Cultivo de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) en un sistema cerrado de recirculación de agua. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 1038-1047.
- Austin, B. y Austin, D. 1999. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 3rd edn (revised). Springer-Praxis, Godalming.
- Austin, B. y Austin, D. 1985. Bacterial pathogens of fish. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 483-506.
- Austin, B.; Stuckey, L.; Robertson, P.; Effendi, I. y Griffith, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18, 93-96.
- Bairagi, A.; Sarkar Ghosh, K.; Sen, S.K.; Ray, A.K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10: 109-121.
- Balcázar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Muzquiz, J. y Girones, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
- Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Gironés, O. y Muzquiz, J.L. 2007a. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 185-193.

- 
- Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz Zarzuela, I. y Vendrell, D. 2007b. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*), British Journal of Nutrition, 97: 522-527.
  - Balcázar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. y Múzquiz, J.L. 2007c. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet. Microbiol. 122, 373-380.
  - Balcázar, J.L.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. y Múzquiz, J.L. 2006a. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 29, 335-343.
  - Balcázar, J.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D. y Múzquiz, J. 2006b. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 114, 173-186.
  - Baldini, M. y Selzer, P. 2008. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. Revista Argentina de Microbiología 40:48-51.
  - Balebona, M.; Moriñigo, M. y Borrego, J. 2001. Hydrophobicity and adhesión to fish cell and mucus of *Vibrio* strain isolated from infected fishes. Int. Microbiology, 4: 21-26.
  - Balebona, M.; Moriñigo, M.; Faris, A.; Krovacek, K.; Mhsson, I.; Bordas, M. y Borrego, J. 1995. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. Aquaculture, 132, 113 - 120.
  - Barbosa, M.; Jatobá, A.; Vieira, F.; Corrêa Silva, B.; José Luiz Pedreira Mourino, J.; Andreatta, E.; Quadros, W. y Ronzani Cerqueira, V. 2011. Cultivation of Juvenile Fat Snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) Fed Probiotic in Laboratory Conditions. Brazilian archives of biology and technology, Vol.54, n. 4: pp. 795-801.
  - Barnes, A.; Bowden, T.; Horne, M. y Ellis, A. 1999. Peroxide-inducible catalase in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* protects against exogenous hydrogen peroxide and killing by activated rainbow trout,

*Oncorhynchus mykiss* L, macrophages. Microbial Pathogenesis, Volume 26, Issue 3, Pages 149-158.

- 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.
- Betancourth, M.; Botero, J. y Rivera, S. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. Colombia médica, 35, 003, 34-39. Universidad de Cali. Colombia.
- Blanco, M.; Liébana, P.; Gibello, A.; Alcalá, C.; Fernández- Garayzábal, J. F. y Domínguez, L. 2004. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®.
- Bordas, M.A.; Balebona, M.C.; Zorrilla, I.; Borrego, J.J. y Moriñigo, M.A. 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilt-head seabream. Applied and Environmental Microbiology 62, 3650-3654.
- Botes, M.; van Reenen, C. y Dicks, L. 2008. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastro-intestinal model with infant milk formulations as substrate. Int J Food Microbiol. 10; 128 (2):362-70.
- Boutin, Y., Paradis, M., Couture, P. y Lamarche, B. 2012. Immunological effects of fish protein supplementation on healthy adults. Journal of Natural Products, 5:37-44.
- Boyd, C.E. y Tanner, M. 1998. Coliform organisms in waters of channel catfish ponds. J. World Aquacult. Soc., 29, 74-78.
- Bravo, S. y Midtlyng, P. 2007. The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. Aquaculture, 270: 36-42.
- Brugnoli, L. 2008. Dinámica y control de formación de biofilms de levaduras en equipos de procesamiento de jugos de fruta. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur.
- Brugnoli, L.; Lozano J. y Cubitto M. A. 2007. Potential of yeast isolated from apples juices to adhere to stainless steel surfaces in apple juice processing industry. Food Research International 40, 332-340.

- 
- Brunt, J.; Newaj-Fyzul, A. y Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Journal of Fish Diseases, 30: 573-579.
  - Brunt, J. y Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases 28(12): 693-701.
  - Bucio, A.; Harteminka, R.; Schrama, J.; Verreth, J.M. y Rombouts, F. 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiology 23(5): 476-482. 396.
  - Bucio, A.; Hartemink, R.; Schrama, J.W. y Rombouts, F.M. 2004. Screening of lactobacilli from fish intestines to select a probiotic for warm freshwater fish. Bioscience and Microflora 23:1-10.
  - Buttner, J.K.; Soderberg, R.W. y Terlizzi, D.E. 1993. An Introduction to Water Chemistry in Freshwater Aquaculture. NRAC Fact Sheet No. 170. University of Massachusetts, Dartmouth.
  - Byczkowski, J. y Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. International Journal of Biochemistry. 20:569-580.
  - Byun, J.W.; Park, S.C.; Ben, Y. y Oh, T.K. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of General and Applied Microbiology 43: 305-308.
  - CAA, Código Alimentario Argentino. Capítulo 18: Aditivos, artículo 1389.
  - Çağırğan, H. 2009. Main sanitary problems and needs in Turkish fish farming. Options Méditerranéennes, A / no. 86. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture.
  - Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology 19: 21-41.
  - Cain, K. y Swan, C. 2011. Barrier function and immunology. In: Grosell M, Farrell AP, Brauner CJ (eds) Fish Physiology: The multifunctional gut of fish, Vol. 30, Academic Press, New York, pp 111-134.
  - Cassenego, A.P.V.; d'Azevedo, P.A.; Ribeiro, A.M.L.; Frazzon, J.; Van Der Sand, S.T. y Frazzon, A. P. G. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from Broilers infected experimentally

- with *Eimeria* spp and fed with diets containing Different supplements. Brazilian Journal of Microbiology 42: 480-488.
- Cetinkaya, Y.; Falk, P.Y Mayhall, C. 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clinical Microbiology Reviews. Vol 13, No4, p. 686 - 707.
  - Chabrilón, M.; Rico, R.M.; Balebona, M.C. y Moriño, M.A. 2005a. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Journal of Fish Diseases 28, 229-237.
  - Chabrilón, M.; Rico, R.M.; Arijo, S.; Díaz Rosales, P.; Balebona M.C. y Moriño, M.A. 2005b. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases 28, 531-537.
  - Chaiyapechara, S. 2008. Bacteria associated with the gastrointestinal tract of rockfish (*Sebastes* sp.) larvae reared in aquaculture settings. Tesis doctoral, Universidad de Washington.
  - Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K. 2001. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *Journal of Food Protection* 64(12), 2007-2014.
  - Chía Ramos, F. 1997. Efectividad de dos vacunas Nacionales para la prevención de la Yersiniosis causada por la cepa atípica de *Yersinia ruckeri* en *Salmo salar*. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias veterinarias. Instituto de patología animal.
  - Chun, J.; Lee, J.H.; Jung, Y.; Kim, M.; Kim, K.; Kim, B.K. y Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261.
  - Chythanya, R.; Karunasagar, I. y Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208, 1-10.
  - Clements, K.D. 1997, Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. In *Gastrointestinal Microbiology*, New York: Chapman and Hall, 1: 156-198.



- 
- CLSI (2005 y 2009). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15<sup>th</sup> informational supplement. Publication M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
  - Cohen, J. 1992. A power premier. *Psychological Bulletin* 112: 155- 159.
  - Collins, M.D.; Farrow, A.E.; Phillips, B.A.; Ferusu, S. y Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacilus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 310-316.
  - Coquet, L.; Cosette, P.; Junter, G.A.; Beucher, E.; Saiter, J.M. y Jouenne, T. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids Surf, B* 26: 373-378.
  - Córdoba, M.; Chaves, C. y Arias, M. 2009. Identificación, cuantificación y determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de bacterias probióticas adicionadas a productos de consumo frecuente en Costa Rica. *Archivos latinoamericanos de nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* Vol. 59 N° 2.
  - De Long, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 89: 5685-5689.
  - De Man, J.C.; Rogosa, M. y Sharpe, M. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1): 130-135.
  - De Silva, S.S. y Anderson, T. 1995. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman y Hall, London. P. 319.
  - Delissalde, F. y Amabile-Cuevas, C. 2004. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 24(4), 405-408.
  - Denev, S.; Staykov, Y.; Moutafchiev, R. y Beev, G. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *Int Aquat Res* 1: 1-29.

- 
- Díaz-Rosales, P.; Chabrilón, M.; Moriñigo, M. y Balebona, M. 2003. Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases*, 26, 305-308.
  - Duhutrel, P.; Bordat, C.; Wu, T.; Zagorec, M.; Guerquin-Kern, J. y Champomier-Vergeès, M. 2010. Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 560-565.
  - Earnshaw, R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria : Natural food preservation system. In: *The lactic acid bacteria in health and disease*. Ed. Wood, B.J.B. pp. 211-232. Elsevier Applied science, London and New York.
  - Egervärn, M. 2009. Antibiotic Resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. Tesis doctoral.
  - Egervärn, M.; Roos, S. y Lindmark, H. 2009. Identification and characterisation of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. Accepted for publication in *Journal of Applied Microbiology*.
  - Egervärn, M.; Lindmark, H.; Roos, S.; Huys, G. y Lindgren, S. 2007a. Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(1), 394-396.
  - Egervärn, M.; Danielsen, M.; Roos, S.; Lindmark, H. y Lindgren, S. 2007b. Antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Food Protection* 70(2), 412-418.
  - Eklund, T. 1984. The effect of carbondioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*. 1:179-185.
  - Ekmekci, A.; Aslim, B.; Ozturk, S. 2009. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol*, 53: 59-65.

- 
- EL-Haroun, E.; Goda, A. y Kabir-Chowdhury, M. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen<sup>®</sup> supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research* Volume 37, Issue 14, pages 1473-1480.
  - EU (European Union). 1998. Conference on The Microbial Threat. The Copenhagen Recommendations. Report from the Invitational EU Conference on The Microbial Threat. Copenhagen, Denmark, 9-10 September 1998.
  - Evans, J.; Klesius, P. y Shoemaker, C. 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix y Agassiz). *Journal of Fish Diseases*, 32, 943-951
  - FAO. 2009. Fishery and Aquaculture Statistics. FAO yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2011.
  - FAO: Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI) 2007. Fishery Statistical Collections. FIGIS Data Collection. FAO- Rome.
  - FAO: State of world aquaculture: 2006. Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
  - FAO: Responsible use of Antibiotics in Aquaculture. 2005. Fisheries technical paper. Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
  - FAO. 1999. FAO Expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. Amherst, MA, USA, 17-20 May 1999. FAO Fisheries Report 604: 1-34.
  - FAO/WHO. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Córdoba, Argentina.
  - Farzanfar, A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. A minireview. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 149-158.
  - Fatholahzadeh, B.; Hashemi, F.; Emaneini, M.; Aligholi, M.; Nakhjavani, F. Y Kazemi, B. 2006. Detection Of Vancomycin Resistant Enterococci (Vre) Isolated From Urinary Tract Infections (Uti) In Tehran, Iran. *DARU* Volume 14, No. 3.
  - Fletcher, M. 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: Fletcher, M. (Ed.), *Bacterial Adhesion*. Wiley-Liss, New York, pp. 1-24.

- 
- Flórez, A.B.; Egervärn, M.; Danielsen, M.; Tosi, L.; Morelli, L.; Lindgren, S. y Mayo, B. 2006. Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* strains to six antibiotics and definition of new susceptibility-resistance cutoff values. *Microbial Drug Resistance* 12(4), 252-256.
  - Fortina, M.G.; Ricci, G. y Borgo, F. 2009. A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. *J Food Prot.*; 72(6):1248-54.
  - Francis-Floyd, R. 2003. Sanitation Practices for Aquaculture Facilities1 Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
  - Frizzo, L.C. 2007. Utilización de microorganismos probióticos, seleccionados a partir de la microbiota indígena de bovinos lecheros, en animales de experimentación. MSc tesis, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
  - Fuller R. 1989. A review: probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
  - Galli Merino, O. y Sal, F. 2007. Sistemas de recirculación y tratamientos de aguas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos CENADAC (Santa Ana- Corrientes).
  - Garrity, G. M. y Holt, J. G. 2001. The road map to the Manual. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 1, pp. 119-166. Edited by D. R. Boone, R. W. Castenholz y G. M. Garrity. New York: Springer.
  - Gatesoupe, F.J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14 (1-3): 107-114.
  - Gatesoupe, F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.
  - Ghidan, A.; Kaszanyitzky, E.J.; Dobay, O.; Nagy, K.; Amyes, S.G. y Rozgonyi, F. 2008. Distribution and genetic relatedness of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from healthy slaughtered chickens in Hungary from 2001 to 2004. *Acta Vet. Hung.* 56, 13-25.
  - Ghosh, S.; Sinha, A. y Sahu, C. 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.

- 
- Gil, N.F.; Martinez, R.C.R.; Gomes, B.C.; Nomizo, A.; Elaine C. P. y De Martinis, E.C.P. 2010. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 6-14.
  - Gilbert, P.; Evans, D.; Evans, E.; Duguid, I. y Brown, M. 1991. Surface characteristics and adhesion of *E. coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol* 71:72-77.
  - Gildberg, A. and 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.
  - 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.
  - Golz, W. 1995. Biological Treatment in Recirculating Aquaculture Systems. In *Recirculating aquaculture in the classroom: a training workshop for agricultural science teachers*, a proceedings of a workshop sponsored by the Louisiana Sea Grant College Program, Louisiana State University, and the Louisiana Department of Education, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana
  - Gómez-Gil, B.; Roque, A. y Turnbull, J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
  - Gómez-Gil, B.; Herrera-Vega, M.; Abreu-Grobois, F. y Roque, A. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2318-2322.
  - Gonçalves, L.M.D.; Ramos, A.; Almeida, J.S.; Xavier, A.M.R.B. y Larrondo, M.J.T. 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 346- 350.
  - González, G.; Encinas, J.; García López, M. y Otero, A. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*. 17: 383-3.

- 
- González Katner, E. 2002. Descripción de la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias veterinarias. Instituto de patología animal.
  - Gram, L.; Løvold, T.; Nielsen, J.; Melchiorson, J. y Spanggaard, B. 2001. *In vitro* antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199, 1-11.
  - Gram, L.; Melchiorson, J.; Spanggaard, B.; Huber, I. y Nielsen, T. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2; a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.65, Nº3, 969-973.
  - Greco, M.; Mazzette, R.; De Santis, E.; Corona, A. y Cosseddu, A. 2005. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*. 69: 733-739.
  - Grosell, M.; O'Donnell, M. J. y Wood, C. M. 2000. Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 278: R1674-R1684.
  - Guardabassi, L. y Dalsgaard, A. 2004. Occurrence, Structure, and Mobility of Tn1546-Like Elements in Environmental Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 984-990 Vol. 70, No. 2
  - Gusils, C.; Bujazha, M. y González, S. 2002 Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia* , vol. 27 Nº 8
  - Hagi, T.; Tanaka, D.; Iwamura, Y. y Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*. 234: 335-346.
  - Hai, N.V.; Fotedar, R. y Buller, N. 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye), *Aquaculture*, 272: 231-239.
  - Handley, P.; Harty, D.; Wyatt, J.; Brown, C.; Doran, J. y Gibbs, A. 1987. A Comparison of the Adhesion, Coaggregation and Cell-surface Hydrophobicity

Properties of Fibrillar and Fimbriate Strains of *Streptococcus salivarius*.  
Journal of General Microbiology, 133, 3207-3217

- Hansen, G. y Olafsen, J. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology. 38: 1-26.
- Hansen, G.H.; Bergh, Ø.; Michaelsen, J. y Knapskog, D. 1992. *Flexibacter oolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 451-458.
- Hermansson, M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 14, 105-119.
- Hernández-Martínez, M.; Castro-Barrera, T.; Garduño-Dionate, M.; Castro-Mejí, G. y José Luis Baltierra-Rodríguez, J. 2009. Efecto del alimento vivo enriquecido con *Lactobacillus casei* en la sobrevivencia y crecimiento de larvas y juveniles de *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinopsidae). Ciencia Pesquera, Vol. 17, núm. 2.
- Hevroy, E.M., M. Espe, R. Waagbo, K. Sandness, M. Rund, and G.I. Hemer. 2005. Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition 11:301-313.
- HHS (U.S. Department of Health and Human Services). 1999. Assistant Secretary for Legislation (ASL). Statement on Antimicrobial Resistance: Solutions to a Growing Public Health Threat. By David Satcher, 25 February 1999. (<http://www.hhs.gov/asl/testify/t990225a.html>).
- Hietala, J.; Valtonen, E. y Valtonen, T. 1995. Experimental infection of brown trout, *Salmo trutta* L., using a Finnish *Yersinia ruckeri* isolate. Aquaculture 136(1-2): 11-20.
- Hill, B. 2005. The need for effective disease control in international aquaculture. In: Midtlyng, P.J. (Ed.). Progress in Fish Vaccinology, Developments in Biologicals, 121: 3-12.
- Hoskins, J. 1934. Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes test by fermentation tube method. Pub. Health Reports, 49:393.
- Hugenholtz, J. 2008. Review: The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. International Dairy Journal, vol 18, p. 466-475.

- 
- Hutari, A.; Jaseem, W.S.; Aidil Abdul Hamid, A.A. y Yusoff, W.M. 2011. Screening of *Lactobacillus* Strains Against *Salmonella* Both Isolated from Malaysian Free-Range Chicken Intestine for Use as Probiotic. *Sains Malaysiana* 40, 1115-1122
  - Ibrahim, F.; Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. 2004. Effect of temperature on *in vitro* adhesion of potential fish probiotics. *Microb Ecol Health Dis* 16: 222-227.
  - Irianto, A. y Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 25(11): 633-642.
  - Ishikawa, M.; Nakajima, K.; Yanagi, M.; Yamamoto, Y. y Yamasato, K. 2003. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov. sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 711-720.
  - Itoi, S.; Abe, T.; Washio, S.; Ikuno, S.; Kanomata, Y. y Sugita, H. 2008. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology* 121(1): 116-121.
  - Iwabuchi, N.; Sunairi, M.; Anzai, H.; Morisaki, N. t Nakajima, M. 2003. Relationships among colony morphotypes, cell surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rodococcus*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 30:51-60.
  - Izvekova, G.I.; Izvekov, E.I. y Plotnikov, A.O. 2007. Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. *The Biological Bulletin*, 34 (6): 610-618.
  - Jack, R.; Tagg, J. y Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. Vol.59, N°2: 171-200.
  - Janda, J. M. y Abbott, S. 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, vol 23, N°1, 35-73.
  - Jensen, A.; Thomsen, L.; Jørgensen, R.; Larsen, M.; Roldgaard, B.; Christensen, B.; Vogel, B.; Gram, L. y Ingmer, H. 2008. Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *International Journal of Food Microbiology* 123(3): 254- 261.



- 
- Juárez Tomás, M.S.; Otero, M.C.; Ocaña, V.; Wiese, B. y Nader-Macías, M.E. 2004. Production of antimicrobial substances in lactic acid bacteria. Determination of hydrogen peroxide. *Methods in Molecular Biology. Public Health Microbiology: Methods and Protocols* (ed. by J.F.T. Spencer y A.L. Ragout de Spencer), Vol. 268, pp. 337-346.
  - Juárez Tomás, M.S.; Ocaña, V.; Wiese, B. y Nader-Macías, M.E. 2003. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259. Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology* 52, 1117-1124.
  - Jude, B.A.; Martinez, R.M.; Skorupski, K. y Taylor R.K. 2009. Levels of the Secreted *Vibrio cholerae* Attachment Factor GbpA Are Modulated by Quorum-Sensing-Induced Proteolysis. *Journal of Bacteriology* 191, 6911-6917.
  - Jung, H.; Jeon, J. y So, J. 2009. Lack of correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and *in vitro* anti-staphylococcal activity of vaginal *Lactobacillus* spp. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (10), pp. 2271-2278.
  - Jutfelt, M.; Olsen, R.; Glette, J.; Ringø, E. y Sundell, K. 2006. Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 29(5): 255-262.
  - Kandler, O. 1995. The lactic Acid bacteria. Vol 2. The Genera of lactic Acid Bacteria. Editors Wood, B; Holzapel, W. Ed. Blackie Academic & Professional.
  - Kandler, O. y Weiss, N. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2.
  - Kastner, S.; Perreten, V.; Bleuler, H.; Hugenschmidt, G.; Lacroix, C. y Meile, L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 145-155.
  - Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J. y Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.
  - Kim, D.H.; Brunt, J. y Austin, B. 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1654-1664.

- 
- Kim, D.H. y Austin, B. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunology*, 21: 513-524.
  - King, R.; Flick, G.; Smith, S.; Pierson, M.; Boardman, G. Coale, C. 2008. Response of Bacterial Biofilms in Recirculating Aquaculture Systems to Various Sanitizers. *Journal of Applied Aquaculture*, Vol. 20(2).
  - Kitahara, K. y Suzuki, J. 1963. *Sporolactobacillus nov. subgen.* *J Gen Appl Microbiol* 9, 59-71.
  - Kitahara, K. y Toyota, T. 1972. Auto-spheroplastization and cell permeation in *Sporolactobacillus inulinus*. *J Gen Appl Microbiol* 18, 99-107.
  - Klare, I.; Konstabel, C.; Werner, G.; Huys, G.; Vankerckhoven, V.; Kahlmeter, G.; Hildebrandt, B.; Müller, S.; Witte, W. y Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 900-912.
  - Klontz, G. W. 1991. Manual for rainbow trout production on the family-owned farm. Nelson y Sons, Inc. South. Murray, Utah 84107.
  - Kos, B.; Šušković, J.; Vuković, S.; Šimpraga, M.; Frece, J. y Matošić, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94, 981-987.
  - Kotikalapudi, B.L. 2009. Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. PhD thesis, Department of Food and Bioproduct Sciences University of Saskatchewan, Canadá.
  - Kotsanis, N.; Iliopoulou-Georgudaki, J. y Kapata-Zoumbos, K. 2008. Changes in selected haematological parameters at early stages of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, subjected to metal toxicants: arsenic, cadmium and mercury. *Journal of Applied Ichthyology*; 16(6):276 - 278.
  - Krovacek, K.; Faris, A.; Ahne, W. y Mansson, I. 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus coated glass slides. *FEMS Microbiology Letters* 42, 85-89.
  - Kuipers, O.; Pascalle, G.G.A.; de Ruyter, M.K. y de Vos, W.M. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 64, 15-21.

- 
- Kuz'mina, V.V. y Skvortsova, E.G. 2002. Intestinal bacteria of fish and their role in digestion, *Uspekhi Sovremennoi Biologii*, 122 (6): 569-579.
  - Kvasnikov, E.I.; Kovalenko, N.K. y Materinskaya, L.G. 1977. Lactic acid bacteria of freshwater fish. *Microbiology* 46, 619-624.
  - Lara Flores, M. 2011. The use of probiotics in aquaculture. An overview. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)* (ISSN: 2141-5463) Vol. 2(12) pp. 471-478.
  - Lara Flores, M.; Olvera Novoa, M.; Guzmán Méndez, B. y López Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 216: 193-201.
  - Lauzon, H. y Ringo, E. 2011. Prevalence and application of lactic acid bacteria in aquatic environments. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, editado por Sampo Lahtinen, Seppo Salminen, Atte Von Wright, Arthur C. Ouwehand.
  - Lavelle, E.C. y Harris, J.E. 1997. The Processing of an Orally Administered Protein Antigen in the Digestive Tract of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117A, 263-275.
  - Lee, Y.K.; Puong, K.I.; Ouwehand, A.C. y Salminen, S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology* 52, 925-930.
  - Lee, Y. y Salminen, S. 2009. *Handbook of probiotics and prebiotics*. 2da. Edición. Wiley.
  - Leisner, J.J.; Millan, J.; Huss, H. y Larsen, C. 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugar-salted fish. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 417-423.
  - Leitritz, E. 1969. Trout and salmon culture (Hatchery Methods). Department of Fish and Game, State of California. Fish Bulletin N° 107. California.
  - Lepargneur, J. y Rousseau, V. 2002. Role protecteur de la flore de Döderlein. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 31, 485-494.

- 
- Li, P. y Gatlin III, D. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture* 231:445-456.
  - Liu, Y.; Yang, S.; Li, Y.; Xu, H.; Qin, L. y Tay, J. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Bacteriol.* 110:251-256.
  - Lonkar, P.; Harne, S.; Kalorey, D. y Kurkure, N. 2005. Isolation, *In vitro* Antibacterial Activity, Bacterial Sensitivity and Plasmid Profile of Lactobacilli. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 18, No. 9: 1336-1342.
  - Lopardo, H. 2011. Los enterococos resistentes a los antibióticos persisten a pesar de la ausencia de presión selectiva. *Asociación Argentina de Microbiología, boletín* 192.
  - Lopez Cazorla, A. 2004. Peces. En: C. M. Piccolo y M. S. Hoffmeyer (eds.). *Ecosistema del estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), Bahía Blanca, Argentina. pp. 191-201.
  - Lopez Cazorla, A. 1987. Contribución al conocimiento de la ictiofauna marina del área de Bahía Blanca. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
  - Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
  - Lückstädt, C. 2005. World aquaculture without frontiers - development of feeding and nutrition in fish and shrimp production, *Feed Mix*, 13 (3): 16-17.
  - Lyndom, A. 1999. Fish growth in marine culture systems: a challenge of biotechnology. *Marine Biotechnology*. 1: 376-379.
  - Madigan, M. T.; Martinko, J. M. y Parker, J. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A., Madrid.
  - Marcovecchio, J. y Ferrer, L. 2005. Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Journal of Coastal Research* 21(4): 826-834.

- 
- Martin, B.; Garriga, M.; Hugas, M. y Aymerich, T. 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1177-1190.
  - 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.
  - Mayrhofer, S.; van Hoek, A.; Mair, C.; Huys, G.; Aarts, H.; Kneifel, W. y Domig, K. 2010. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. *International Journal of Food Microbiology* 144, 81-87.
  - Mazzoni, R. 2001. Proyecto ranicultura DINARA/IIP. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Uruguay.
  - Merrifield, D.L.; Dimitroglou, G.; Bradley, G.; Foey, A.; Davies, S.J.; Barker, R.T.M.; Bogwald, J.; Castex, M. y Ringo, E. 2010a. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302, 1-18.
  - Merrifield, D.L.; Dimitroglou, G.; Bradley, G.; Barker, R.T.M. y Davies, S.J., 2010b. Probiotics applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.* 16, 496-503. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00688.
  - Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Harper, G.; Barker, R.T.M.; munn, C. y Davies, S.J., 2009. Assessments of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Nutr.* doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00712.
  - Miller, R.S. y Hoskins, L.C. 1981. Mucus degradation in human colon ecosystems. Faecal population densities of mucus-degrading bacteria estimated by a "most probable number" method. *Gastroenterology* 81, 759-765.

- 
- Mishra, V. y Prasad, D. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 103(1): 109-115.
  - Morales, G. 2004. Crecimiento y eficiencia alimentaria de trucha arcoíris en jaulas bajo diferentes tipos de alimentación. Tesis de grado. Facultad de agronomía. UBA.
  - Morandi, S.; Silveti, T. y Brasca, M. 2012. Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. *Antonie van Leeuwenhoek*. DOI 10.1007/s10482-012-9806-z.
  - Morelli, L. y Callegari, M. 2006. Taxonomy and biology of probiotics. In Goktepe I, Juneja VK, Ahmedna M, editors. *Probiotics in Food Safety and Human Health*. Boca Raton: Taylor and Francis
  - Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351-358.
  - Mozzi, F.; Rayá, R.; Vignolo, G. 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*. Primera edición. Blackwell Publishing.
  - Nader Macias, M.; Álvarez, G.; Silva, C.; Medina M. y Juárez Tomás, M. 2008. Lactic acid bacteria in the prevention of urogenital and respiratory infections. En: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Editado por Fernanda Mozzi, Raúl R. Raya y Graciela M. Vignolo.
  - Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 2-14.
  - Nepal Pushp R.; Myung-Kwan Chun y Hoo-Kyun Choi. 2007. Preparation of floating microspheres for fish farming. *International Journal of Pharmaceutics* 341, 85- 92.
  - Nes, I. y Eijsink, V. 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. *Cell-cell signaling in Bacteria*. Editors: Dunny, G. and Winans, S. (ASM).
  - Nes, I.; Diep, D.; Havarstein, L. y Brurberg, M. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 113-128.
  - Newaj-Fyzul, A.; Adesiyunz, A.A.; Mutani, A.; Ramsuhag, A.; Brunt, J. y Austin, B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J. Appl. Microbiol.*, 103, 1699-1706.

- 
- Nicolás, P.; Mondot, S.; Achaz, G.; Bouchenot, C.; Bernardet, J.F. y Duchaud, E. 2008. Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12): 3702-3709.
  - Nikoskelainen, S.; Salminen, S.; Bylund, G. y Ouwehand, A. 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infection diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.67, N°6, 2430-2435.
  - Noel, O. y Le Bail, P.Y. 1997. Does cyclicity of growth rate in rainbow trout exist? *J. Fish Biol.* 51, 634-642.
  - Nuraida, L.; Anggraeni, D. y Dewanti-Hariyadi, R. 2011. Adherence Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Breast Milk The 12th Asian Food Conference 2011 16 -18 June, 2011. BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.
  - Ocaña, V. y Nader Macías, M.E. 2002. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. *British Journal of Biomedical Science*, 50, 183-190.
  - Ocaña, V.; Silva, C. y Nader-Macías, E. 2006. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. Article ID 18182, Pages 1-6 DOI 10.1155/IDOG/2006/18182.
  - Osset, J.; Bartolomé, R.M.; García E. Y Andreu A. 2001. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cell. *Journal of Infectious Diseases* 183, 485-491.
  - Otero, M.C.; Silva de Ruiz, C. y Nader Macías, M.E. 2007. Susceptibility of probiotic bovine vaginal *Lactobacillus* to antimicrobial agents. *Journal of animals and veterinary advances*, 6(1) 132-138.
  - Otero, C. y Nader Macías, F. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science* 96, 35-46.
  - Ouwehand, A.C. y Salminen, S. 2003. In vitro Adhesion Assays for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15: 175-184.

- 
- Panigrahi, A.; Kiron, V.; Satoh, S. y Watanabe, T. 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiol Biochem*, 36:969-977
  - Panigrani, A.; Kiron, V.; Satoh, S.; Hirono, I.; Kobayashi, T.; Sugita, H. y Aoki, T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding, *Development and Comparative Immunology*, 31: 372-382.
  - Panigrahi, A.; Kiron, V.; Kobayashi, T.; Puangkaew, J.; Satoh, S. y Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 102:379-388.
  - Parihar, V.; Barbuddhe, S.; Danielsson-Tham, M. y Tham, W. 2008. Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control* 19(6): 566- 569.
  - Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
  - Parra Huertas R.A. 2010. Review Lactic Acid Bacteria: Functional role in the foods. Vol 8. No 1.
  - Pasteris, S.E.; Buhler, M.I. y Nader-Macías, M. E. 2012. En: *Probióticos y Salud*. Editorial Díaz-Santos, p. 479 - 513.
  - Pasteris, S.E.; Guidoli, M.; Otero, M.; Bühler, M. y 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. *Vet Microbiol* 151:336-344.
  - Pasteris, S.; Vera-Pingitore, E.; Roig-Babot, G.; Otero, M.; Bühler, M. y Nader-Macías, M.E. 2009. Characterization of the beneficial properties of lactobacilli isolated from bullfrog (*Rana catesbeiana*) hatchery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95(4): 373-385.
  - Peng, J.; Tsai, W. y Chou, C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *Int J Food Microbiol*. 65:105-111.
  - Pérez-Sánchez, T.; Balcázar, J.; García, Y.; Halaihel, N.; Vendrell, D.; de Blas, I.; Merrifield, D. 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.

- Piccolo, M.C. y Perillo, P. 1990. Physical characteristics of the Bahía Blanca estuary (Argentina). Estuarine, Coastal and Shelf Science 31(3): 303-317.
- Piccolo, M.; Perillo, G. y Arango, J. 1987. Hidrogeografía del estuario de Bahía Blanca, Argentina. Reviste geofísica, 26: 75 - 89.
- Pickering, A. D. 1974. The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). Journal of Fish Biology 6, 111-118.
- Plan Provincial de Acuicultura. La acuicultura en Neuquén, 2008. Ministerio de producción de la provincia de Neuquén.
- Pond, M.J.; Stone, D.M. y Alderman, D.J. 2006. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture, 261: 194-203.
- Prakash, V.; Rao, S. y C Parija, S. 2005. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. BMC Infectious Diseases, 5:14.
- Raida, M.K.; Larsen, J.L.; Nielsen, M.E. y Buchmann, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus 2B). J. Fish Dis., 26, 495-498.
- Rahimi F.; Talebi M.; Saifi M. y Pourshafie M. 2007. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. Iran Biomed J.; 11(3):161-7.
- Raj, V.S.; Fournier, G.; Rakus, K.; Ronsmans, M.; Ouyang, P.; Michel, B.; Delforges, C.; Costes, B.; Farnir, F.; Leroy, B.; Wattiez, R.; Melard, C.; Mast, J.; Lieffrig, F. y Vanderplasschen, A. 2011. Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. Vet Res 42: 92-100.
- Reddy, K.; Raghavendra, P.; Kumar, B.; Misra, M. Prapulla, S. 2007. Screening of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from *Kanjika*, an ayurvedic lactic acid fermented product: An in-vitro evaluation. J. Gen. Appl. Microbiol., 53, 207-213.

- 
- Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S. y Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture* 191, 271-288.
  - Ricci, G.; Ferrario, C.; Borgo, F.; Rollando, A. y Fortina, M.G. 2012. Genome Sequences of *Lactococcus garvieae* TB25, Isolated from Italian Cheese, and *Lactococcus garvieae* LG9, Isolated from Italian Rainbow Trout. *J Bacteriol.*; 194(5): 1249-1250.
  - Rico-Mora, R.; Voltolina, D. y Villaescusa-Celaya, J.A. 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures, *Aquaculture*, 19: 1-6.
  - Ringø, E.; Løvmo, L.; Kristiansen, M.; Bakken, Y.; Salinas, I.; Myklebust, R.; Olsen, R.E. y Mayhew, T.M. 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish. *Aquac. Res.* 41 (4), 451-467.
  - Ringø, E.; Schillinger, U. y Holzapfel, W. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: Hotzapfel, W.H., Naughton, P.J., (Eds). *Microbial ecology of the growing animal. Biology in growing animal series*, Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. (Eds). Elsevier, Oxford, 408-443.
  - Ringø, E.; Lødemel, J.B.; Myklebust, R.; Jensen, L.; Lund, V.; Mayhew, T.M. y Olsen, R.E. 2002. The effects of soybean, linseed and marine oils on aerobic gut microbiota of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L before and after challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*, *Aquaculture Research*, 33: 591-606.
  - Ringø, E. 2001. Probiotics in aquaculture. *Disease control in fish and shrimp aquaculture*. Inui, Y., Cruz-Lacierda, E. R. (Eds.). 107-135.
  - Ringø, E.; Bendiksen, H.; Wesmajervi, M.; Olsen, R.; Jansen, P. y Mikkelsen, H. 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology* 89(2): 317-322.
  - Ringø, E. y Birkbeck, T.H. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research* 30: 73-93.
  - Ringø, E. y Gatesoupe, F. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160: 177-203.

- 
- Ringø, E.; Strøm, E. y Tabachek, J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquaculture Research* 26(10): 773-789.
  - Rodríguez González, M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral.
  - Rosander, A.; Connolly, E. y Roos, S. 2008. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol.* 74(19):6032-40.
  - Rosenberg, M. (1984). Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 22, 289-295.
  - Romalde, J.L.; Ravelo, C.; López-Romalde, S.; Avendaño-Herrera, R.; Magariños, B. y Toranzo, A.E. 2005. Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture, *Developmental Biology (Basel)*, 121: 85-95.
  - Ruiz Pérez, P. 2010. Biodiversidad De La Microbiota Láctica Presente En La Fermentación Maloláctica De Vinos Tintos De La Variedad Cencibel: Caracterización Molecular Y Tecnológica Para La Selección De Cepas. Tesis doctoral. Universidad de Castilla - La Mancha. Cuenca.
  - Saarela, M.; Mogensen, G.; Fonden, R.; Matto, J. y Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. En: *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, Holanda, vol. 84, pp. 197-215.
  - SAGPyA. Secretaría de Agricultura, ganadería, Pesca y Alimentación. 2001. Acuicultura. [www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar).
  - Salinas, I.; Abelli, L.; Bertoni, F.; Pichiatti, S. y Roque, A. 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.; Bouley, C.; Boutron-Ruault, M.; Cumming, J.; Franck, A.; Gibson, G.; Isolauri, E.; Moreau, M.; Roberfroid, M. y Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80, S147-S171.

- 
- Sánchez Ruiz, J.; Basanta, A.; Gómez Sala, B.; Herranz, C.; Cintias, L.; Hernández, P. 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potentials of bacteriocinogenic enterococi isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *International journal of food microbiology*, 117:295-305.
  - Sardiña, P. 2004. Ecología trófica de estadios juveniles de los esciéndidos dominantes en el estuario de Bahía Blanca. Pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) y corvina rubia (*Micropogonias furnieri*). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur.
  - Schillenger, U.S. y Holzapfel, W. 1995. The genus *Carnobacterium*. In: Woods BJB y WH Holzapfel (eds). *The genera of lactic acid bacteria*, pp. 7-17. Chapman y Hall, Glasgow.
  - Semedo, T.; Almeida Santos, M.; Martins, P.; Silva Lopes, M.; Figueiredo Marques, J.; Tenreiro, R. y Barreto Crespo, M. 2003. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2569-2576.
  - Sernapesca. 2011. Servicio nacional de pesca y acuicultura. [www.sernapesca.cl](http://www.sernapesca.cl).
  - Shelby, R.A.; Lim, C.; Yildirim, M. and Klesius, P. H. 2006. Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young channel catfish. *Intalurus punctatus* (Rafinesque). *J. of Applied Aquaculture* Vol. 18(2): 49-60.
  - Sica, M.G.; Olivera, N.; Brugnoli, L.; Marucci, P.; López Cazorla, A. 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*, Vol. 45, N°3: 389-397.
  - Sornplang, P.; Leelavatcharamas, P.; Sukon, P. y Yowarach, S. 2011. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from fermented fish product, *Pla-chom*. *Research journal o microbiology*, 6 (12) 898 - 903.
  - Sorongon, M.I.; Bloodgood, R.A. y Burchardl, R.P. 1991. Hydrophobicity, adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl Environ Microbiol* 57: 3193-3199.

- 
- Spanggaard, B.; Huber, I.; Nielsen, J.; Sick, E.; Pippet, C.; Martinussen, T.; Slierendrecht, W. y Gram, L. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* 3, 755-765.
  - Sugita, K.; Ohta, A.; Kuruma, T. y Sagesaka, T. 2007. An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquaculture Research* 38(9): 1002-1004.
  - Sugita, H.; Okano, R.; Suzuki, Y.; Iwai, D.; Mizukami, M.; Akiyama, N. y Matsuura, S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish. Sci.* 68, 1004-1011.
  - Suzer, C.; Coban, D.; Okan Kamaci, H.; Saka, S.; Firat, K.; Otgucuoğlu, O. y Küçükşar, H. 2008 *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140-145.
  - Tadese, G.; Ephraim, E.; y Ashenafi; M. 2005. Assesment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shameta, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food-born pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Internet Journal of food Safety*.5:13-20.
  - Taheri, H.; Moravej,H.; Tabandeh,F.; Zaghari, M. y Shivazad, M. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Science* 88 :1586-1593.
  - Tannock, G. W. 1995. Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 5: 1059-1070.
  - ten Brink, B.; Minekus, M.; van der Vossen, J.; Leer, R. y Huis in't Veld, J.1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Bacteriology*.77: 140-148.
  - Teuber, M.; Meile, L. y Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1-4), 115-137.
  - Tharmaraj, N. y Shah, N. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*

---

*acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and propionibacteria. J. Dairy Sci. 86: 2288-2296.

- Thirabunyanon, M. 2011. Biotherapy for and protection against gastrointestinal pathogenic infections via action of probiotic bacteria. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 5(01), 108-128
- Tobback, E. 2009. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). PhD thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium.
- Toffin, L.; Zink, K.; Kato, C.; Pignet, P.; Bidault, A.; Bienvenu, N.; Birrien, J. y Prieur, D. 2005. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 345-351.
- Tokarsky, O. y Marshall, D. 2008. Mechanism of Synergistic Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth by Lactic Acid, Monolaurin, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7126-7129.
- Trivedi, K.; Cupakova, S. y Karpiskov, R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56, (7): 352-357.
- Tuomola, E.M.; Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. 1999. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Letters in Applied Microbiology* 28, 159-163.
- van den Bogaard, A.E. y Stobberingh, E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 4: 327-335.
- van Hai, N.; Fotedar, R. y Buller, N. 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture* 272(1-4): 231-23
- van Loosdrecht, M.C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa G. y Zehnder, A.J. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1893-1897.

- 
- Van Houdt, R. y Michielis, C. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.
  - Van Tassell, M. Y Miller, M. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 3, 613 - 636.
  - Vandevoorde, L.; Christiaens, H. y Verstraete, W. 1992. Prevalence of coaggregation among chicken lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 72, 214-219.
  - Vaughan, E. E.; Heilig, H. G. H. J.; Ben-Amor, K. y de Vos, W. M. 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 477-490.
  - Vázquez, J.; González, M. y Murado, A. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 245: 149-161.
  - Vázquez, J.; Cabo, M.; González, M. y Murado, A. 2003. Survival of lactic acid bacteria in seawater: a factorial study. *Current Microbiology*. Vol 47, 508-513.
  - Velraeds, M.M.; van de Belt-Gritter, B.; van der Mei, H.C.; Reid, G. y Busscher, H.J. 1998. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeast to silicone rubber by *Lactobacillus acidophilus* biosurfactants. *Journal of Medical Microbiology* 42, 1081-1085.
  - Vendrell, D.; Balcázar, J.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. y Múzquiz, J. 2007. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 31(4): 337-345.
  - Vendrell, D.; Balcázar, J.L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Gironés, O. y Múzquiz, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 177-198.
  - Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 64, N°4, 655-671.
  - Verschuere, L.; Rombaut, G.; Huys, G.; Dhont, J.; Zorruelos, 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.

- Vesterlund, S.; Palttab, J.; Karpb, M. y Ouwehand, A. 2005. Measurement of bacterial adhesion—in vitro evaluation of different methods. *J Microbiol Methods*; 60(2):225-33.

- Vine, N.G.; Leukes, W.D. y Kaiser, H. 2006. Probiotics in marine larviculture, *FEMS MicrobiolOgy Reviews*, 30: 404-427.

- Vine, N.; Leukes, W. y Kaiser, H. 2004a. 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.; Kaiser, H.; Daya, S.; Baxter, J. y Hecht, T. 2004b. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27, 319-326.

- Werner, G. 2012. Current Trends of Emergence and Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci.

[http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011\\_SUR\\_Annual\\_Epidemiological\\_Report\\_on\\_Communicable\\_Diseases\\_in\\_Europe.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf)

- WHO, 1989. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report Series, No. 778, World Health Organization, Geneva.

- WHONET. 2010. Protocolo de trabajo acordado. XIII Taller WHONET Argentina.

- Yan, Q.; Zhao, M.; Wang, X.; Zou, W. y Chen, C. 2010. Adhesion mechanisms of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28, 260-266.

- Zárate, G. y Nader-Macías, M.E. 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in Vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology* 43, 174-180.

- Zewge, E. 2006. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria Isolated from 'ergo', ethiopian traditional Fermented milk, on some foodborne pathogens. Tesis doctoral. Addis Ababa University.



- Zhou, J.; Pillidge, C.; Gopal, P. y Gill, H. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 98, 211 - 217.
- Zirakzadeh, A. y Patel, R. 2006. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.*;81(4):529-36.

**PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADOS  
DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS**

**Publicaciones**

- 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*. Vol. 45, N°3: 389-397.
- Sica, M. G.; Brugnoli, L.I.; Marucci, P.L. y 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.
- Lopez Cazorla, A. C.; Sica, M. G.; Galvez, M.; Brugnoli, L.I.; Marucci, P.L. y Cubitto, M.A. 2013. 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*. En prensa.

**Actas de Congresos**

- Sica, M G; Sequeiros, C; Brugnoli, L I; Marucci, L P; Olivera, N; López Cazorla A. y Cubitto M A. 2009. Estudio de una cepa bacteriana ácido-láctica aislada del estuario de bahía blanca para su aplicación como probiótico en acuicultura. En: Tomo: Ambientes y recursos naturales del Sudoeste Bonaerense: producción, contaminación y conservación (Actas de las V Jornadas Interdisciplinarias del Sudoeste Bonaerense). Editores: Cazzaniga N., Arelovich H. Págs.: 235-243. ISBN 978-987-655-021-5. EDIUNS, Bahía Blanca.

**Presentaciones a congresos**

**Internacionales**

- Sica, M. G.; Brugnoli, L.I.; Marucci, P.L.; Lopez Cazorla, A. y Cubitto, M.A. 2009. Characterization of some probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from fish and estuarine sediments. III International Symposium on Lactic Bacteria. II Argentinean LAB Net Meeting. San Miguel de Tucumán, 15 al 17 de Septiembre.
- Sica, M. G.; Brugnoli, L.I.; Marucci, P.L. y Cubitto, M.A. 2010. Estudio del efecto probiótico de una cepa de *Lactobacillus paracasei* en el cultivo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). XX Congreso Latinoamericano de Microbiología y IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, Uruguay, 27 al 30 de septiembre.

- Sica, M. G.; Brugnoni, L.I.; Marucci, P.L.; Lopez Cazorla, A. y Cubitto, M.A. 2010. Estudio de la adhesión in vitro de cepas de bacterias del ácido láctico a mucus de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). XX Congreso Latinoamericano de Microbiología y IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, Uruguay, 27 al 30 de septiembre.

- Sica, M. G.; Brugnoni, L.I.; Marucci, P.L. y Cubitto, M.A. 2012. Sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico aisladas del estuario de Bahía Blanca. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, Buenos Aires, 26 al 29 de Noviembre.

### **Nacionales**

- Sica, M.G.; Sequeiros, C.; Brugnoni, L.I.; Marucci, L.P.; Olivera, N.; López Cazorla, A. y Cubitto, M.A. 2008. Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas de peces y sedimentos del estuario de Bahía Blanca. Presentado en XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario, 9 al 11 de Octubre.

- Sica, M.G.; Sequeiros, C.; Brugnoni, L.I.; Marucci, L.P.; Olivera, N.; López Cazorla, A. y Cubitto, M.A. 2008. Estudio de las propiedades probióticas de bacterias lácticas aisladas del estuario de Bahía Blanca para su potencial uso en el cultivo de salmónidos. Presentado en XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Ciudad de Rosario, 9 al 11.

- Marucci, P.L.; Brugnoni, L.I.; Sica, M.G.; López Cazorla, A.C. y Cubitto, M.A. 2010. Calidad microbiológica del agua en un sistema cerrado de recirculación para cultivo intensivo de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires, Argentina, 17 al 20 de octubre.

- Sica, M. G.; Brugnoni, L.I.; Marucci, P.L.; Lopez Cazorla, A. y Cubitto, M.A. 2011. *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from intestinal microbiota of fish of Bahía Blanca estuary for use as biological control agent in aquaculture. VII Congreso Argentino de Microbiología General "SAMIGE del Bicentenario", Tucumán 18 al 20 de mayo. Presentación oral.