



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Potencial probiótico de levaduras productoras de
poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea
Dicentrarchus labrax y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

Dariel Tovar Ramírez

La Paz, B.C.S., México, 30 de agosto del 2002

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 5 del Mes de julio del 2002, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Presentada por el alumno:

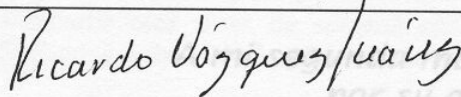
Dariel Tovar Ramírez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

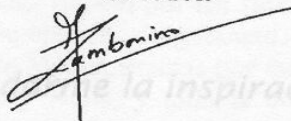
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su APROBACION DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

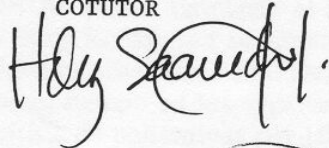
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
DIRECTOR DE TESIS



Dr. José Luis Zambonino Infante
COTUTOR



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra
COTUTOR

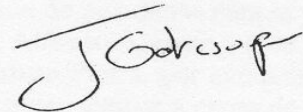


Dr. Hector G. Nolasco Soria
CO-DIRECTOR

Dr. Guy Nonnotte, DIRECTEUR DE THESE
DIRECTOR DE TESIS EXTERNO



Dr. F. Joël Gatesoupe
COTUTOR




DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DEDICATORIA

A tí madre,
por apoyarme en cada escalón de mi vida y de haberme
enseñado a disfrutarla en cada momento, gracias por siempre...

A mi esposa Alma Amalia,
gracias por tu infinito amor, apoyo y paciencia...vamos por lo que
sigue!...

A mis niños: Alexandra y José Dariel,
gracias por comprender mi ausencia en el hogar, este es el
producto y sobretodo, es para ustedes...
al infinito y mas allá!!!...

A mis hermanos Francisco, Héctor, Ernestina y María Oralia,
por su eterno apoyo y cariño que me dan aún estando lejos

A mi segunda madre Sra. Alma Amalia
por su apoyo incondicional

A la Bretagne,
por darme la inspiración de acabar de una vez por todas esta tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., por darme todas las facilidades y prestaciones para el buen desarrollo de este trabajo. El apoyo económico fue otorgado por los proyectos institucionales PAC10, PAC 21, el de posgrado y 25956-D de CONACyT. Gracias al Director General Dr. Mario Martínez, la Directora Académica Sra. Elena Enríquez, al Dr. Sergio Hernández y Dra. Thelma Castellanos de posgrado por todo el apoyo recibido.

Agradezco muy sinceramente a mis directores de tesis Dr. Ricardo Vázquez Juárez, quien de su parte me introdujo en este tema interesante y quien supo llevarlo a buen termino. Al Dr. Hector Nolasco Soria, quien siempre me ha apoyado desinteresadamente en mis decisiones profesionales. A mi tutor de Tesis, Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, gracias por sus atinados comentarios y constante apoyo en mi carrera profesional.

Gran parte de este trabajo fue realizado en la Unité Mixte de Nutrition des Poissons, Brest, Francia. Allí encuentre no solo buenas enseñanzas y apoyo profesional, también buenas amistades: gracias al Dr. Joël Gatesoupe, Dr. José Luis Zambonino y Dra. Chantal Cahu, por su apoyo moral y profesional, por su tiempo, enseñanzas y discusiones dentro y fuera del IFREMER. Gracias por los fines de semana en sus hogares y de compartir buenos momentos con sus familias. Al Dr. Guy Nonnotte, por haber dirigido esta tesis y al Dr. Sadasivan Kaushik por su apoyo y atinados comentarios que enriquecieron este trabajo.

Quiero agradecer también a Patrick Quazuguel, por haber realizado los cultivos larvarios de mis experimentos, y sobretodo por su desinteresada amistad fuera y dentro del lab, su amena compañía y buen humor. A Marie Madeleine Le Gall, por sus enseñanzas dentro del laboratorio de la biología molecular y enzimología, su amistad y gracias también por compartir esos fines de semana con mi familia y paseos por Plougastel. A Hervé Le Delliou, gracias por el apoyo en los análisis de HPLC.

La hora del café y viernes sociales (de buen queso, pan y vinito), fueron amenizados por la buena compañía de Babeth, Christine, Jacques, Marie Françoise, Hervé, Vincent e Iban. Gracias Babeth por los fines de semana de Grillades en tu casa. Especial agradecimiento a mi compañera de gabinete, Virginie, gracias por tus consejos y por tu buena amistad. A Joëlle Méhur, gracias por facilitarme la vida en el lab. A Benoît Vincent, B. Dilhac, Karine, Alex y Nelia, y toda la comunidad latina por hacer mas amena nuestra estancia en la Bretaña.

En el CIBNOR quiero agradecer al Dr. Roberto Civera y al M.C. Ernesto Goytortúa, de la UABCS a Gaby Roldán por su amistad y consejos en la elaboración de mis dietas para la ya famosa y bien estudiada cabrilla. Del CICIMAR a Silvie Dumas, Alfonso Alvarez y todo el equipo, por su tiempo en los experimentos con las cabrilla. A Arturo Sierra, por ayudarme con los análisis de poliaminas por HPLC. A Carmen Rodríguez, quien estuvo a cargo de la asesoría en el manejo del microscopio de fluorescencia y analizador de imagenes. Al Dr. Roberto mendoza, (UANL) y Dra. Lilia Alcaraz (CIBNOR) por sus comentarios y sugerencias en mi exámen predoctoral. A Lety González (posgrado) y Sofy López (caja) por su tiempo en arreglar mis asuntos estudiantiles y monetarios.

A mis cuates Fernando Vega y Olimpia Chong, por su siempre buen humor y gentileza a lo largo de esta trabajo, y también a todos los integrantes de la unidad de Patología Marina por hacer mas amena “la talacha” de la biología molecular.

El apoyo económico en México estuvo a cargo del CONACyT (becario 84016), del programa de posgrado del CIBNOR, y en Francia por parte del Institute National de la Recherche Agronomique (INRA).

No quisiera omitir a nadie, por lo que quisiera agradecer a todo el personal del CIBNOR e IFREMER, Brest, Francia, que participaron en el rastreo de imágenes, diseño de posters, análisis de secuencias, préstamo de material, reactivos, impresión de la tesis, encuadernación de la misma, etc.

A lo largo del doctorado encuentre a una gran amiga...a ti Adrianita, (ama@...) gracias por tenderme tu mano de amistad, por compartir las experiencias de la vida y profesionales, y por tus palabras de aliento...se que siempre contaré contigo...

CONVENIO DE CO-TUTORIA DE TESIS

- De acuerdo a la ley No. 84-52 del 26 de enero de 1984 modificada sobre la enseñanza superior;
- De acuerdo al decreto del 30 de marzo de 1992 relativo a bs estudios de posgrado;
- De acuerdo al decreto del 18 de enero de 1994 relativo a la creación de un procedimiento de cotutoria de tesis,

La Universidad de Bretaña Occidental (UBO)

Con domicilio en:

3, rue des Archives - B.P. 808

29285 BREST Cedex (France)

Representado por su Presidente, Sr. Pierre APPRIOU,

Celebra con el

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Con domicilio en:

Km 0.5 a la Telefónica, Terrenos El Conchalito

La Paz Baja California Sur, México

Representado por su Director, Dr. Mario Martínez García

Por la otra parte

El siguiente acuerdo de Cotutoria de Tesis Doctoral, bajo el siguiente esquema:

Artículo 1

El presente acuerdo reglamenta las relaciones entre UBO y el CIBNOR en lo que concierne a un trabajo de investigación efectuado para la preparación de una tesis de doctorado en Oceanografía Biológica por el Sr Daríel TOVAR RAMIREZ, nacido el 01/04/66 en Guanajuato, México, de nacionalidad Mexicana.

TITULO I. MODALIDAD ADMINISTRATIVA

Artículo 2

El candidato a doctorado se inscribirá en tesis a la UBO y en el CIBNOR al inicio de las actividades universitarias 1998-1999

Artículo 3

La duración provisional de su trabajo de investigación es de tres años. Este periodo podrá ser prolongado después de un acuerdo específico establecido entre las dos partes que firman este acuerdo, respetando las condiciones previstas para la UBO en el artículo 23 del decreto dcl 30 de marzo 1992 antes citado, y lo establecido en el decreto de creación del CIBNOR en lo que se refiere al establecimiento de este tipo de convenios.

Artículo 4

El Sr. Dariel TOVAR RAMIREZ realizará estancias alternas en el CIBNOR y en la UBO durante el tiempo de preparación de su tesis. La duración de los periodos de trabajo en cada establecimiento se fija de la siguiente manera:

- Estancia de un año en Francia, de abril de 1999 a Marzo de 2000.
- Estancia de 6 meses en Francia, en 2000-2001

La periodicidad de las estancias es reconductible todos los años hasta el año universitario 2001-2002. Los últimos 6 meses serán dedicados a la redacción de la tesis en el CIBNOR

Artículo 5

Los derechos anuales de inscripción de tesis serán pagados al CIBNOR. La UBO exonera al candidato del pago de derechos de inscripción.

Artículo 6

El candidato es beneficiario de un seguro medico de CONACyT el cual le asegura una cobertura social durante sus estancias en Francia.

TITULO II. MODALIDAD PEDAGOGICA

Artículo 7

El Sr Dariel TOVAR RAMIREZ estará supervisado de manera conjunta por

- Sr. Guy NONNOTTE
- Sr. Ricardo VÁZQUEZ JUÁREZ

Que se comprometen plenamente a ejercer la función de director de tesis del candidato.

Los trabajos, serán efectuados en el Laboratorio de Fisiología Animal de la UBO, de la Unidad Mixta de Nutrición de Peces (INRA/IFREMER) y del Laboratorio de Patología Marina (CIBNOR).

Artículo 8

El tema de la tesis del candidato es: "El efecto de las poliaminas producidas por levaduras en la maduración intestinal de larvas de lubina *Dicentrarchus labrax* y de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*"

Artículo 9

Se hará una sola defensa de la tesis reconocida por las dos partes.

El jurado estará constituido de acuerdo a las condiciones previstas en el artículo 26 del decreto del 30 de marzo de 1992 citado anteriormente y al artículo 8 del decreto de 18 de enero de 1994.

Los directores de tesis formaran parte del jurado en el momento de su defensa que tendrá lugar en el CIBNOR, México.

La tesis será redactada en español complementada con un resumen escrito en francés y será defendida en español y complementada con un resumen oral en francés.

Artículo 10

Después de la defensa y de la admisión del candidato:

La Universidad de Bretaña Occidental otorgará al Sr Dariel TOVAR RAMIREZ el título de Doctor de la Universidad de Bretaña Occidental, en las condiciones previstas en los

artículos 27 y 28 del decreto del 30 de marzo de 1992; el CIBNOR se compromete a otorgar el diploma titulado Doctor en Ciencias en el Uso y Manejo de los Recursos naturales, tal y como se establece en su Reglamento de Estudios de Posgrado.

Artículo 11

El depósito, filiación y la reproducción de la tesis serán efectuados en cada país, según los reglamentos vigentes. Por la parte francesa las modalidades están reglamentadas por el decreto del 25 de septiembre de 1985. Los resultados obtenidos en el curso de la preparación de esta tesis podrán ser publicados, pero quedaran en propiedad conjunta de la UBO y el CIBNOR.

La Paz, BCS, México, Marzo 12, 1999.

Brest

23 MARS 1999



El Director del Centro de Investigaciones
Del CIBNOR
Dr Mario MARTINEZ GARCIA



El Presidente de la Universidad de
Bretaña Occidental
P. APPRIOU



ECOS *-Nord*, Action de coopération scientifique avec le Mexique n° PM98S03 CONVENTION DE

COTUTELLE DE THESE

- Vu la loi n°84-52 du 26 janvier 1984 modifiée sur l'enseignement supérieur;
- Vu l'arrêté du 30 mars 1992 relatif aux études de troisième cycle;
- Vu l'arrêté du 18 janvier 1994 relatif à la création d'une procédure de cotutelle de thèse,

Entre:

l'Université de Bretagne Occidentale (UBO)
dont le siège est 3' rue des Archives - B.P. 808
29285 BREST Cedex France)

représentée par son Président, Monsieur Pierre APPRIOU,

d'une part,

et,

Le Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) dont le siège est Km **0.5** à la telefonica,
El Conchalito
La Paz Baja California Sur, Mexico

représenté par son Directeur, Monsieur Mario MARTINEZ GARCIA, d'autre part,

il est convenu ce qui suit:

Article 1

La présente convention règle les rapports entre l'UBO et le CIBNOR en ce qui concerne un travail de recherche effectué dans le cadre de la préparation d'une thèse de Doctorat en Océanographie Biologique par Monsieur TOVAR RAMIREZ Dariel, né le 01.04.1966 à Guanajuato, Mexique, de nationalité Mexicaine.

ECO~Nord, Action de coopération scientifique avec le Mexique n° **PM98S03**

TITRE I: MODALITES ADMINISTRATIVES

Article 2

Le doctorant s'inscrira en thèse à l'UBO et au CIBNOR à compter de la rentrée universitaire 1998-1999.

Article 3

La durée prévisionnelle des travaux de recherche est de 3 ans. Cette durée pourra être prolongée après accord spécifique établi entre les deux établissements signataires de la convention, dans le respect des conditions prévues à l'article 23 de l'arrêté du 30 mars 1992 précité.

Article 4

M. TOVAR Dariel travaillera successivement au CIBNOR et à l'UBO pendant le temps de préparation de sa thèse. La durée des périodes de travail dans chaque établissement est fixée comme suit:

- séjour de 1 an en France, d'avril 1999 à mars 2000;
- séjour de 6 mois en France, en 2000-2001.

La périodicité des séjours est reconductible tous les ans jusqu'à l'année universitaire 2001-2002. Les six derniers mois seront consacrés à la rédaction de la thèse au CIBNOR.

Article 5

Les droits annuels d'inscription en thèse seront versés au CIBNOR. L'UBO acceptera d'exonérer le doctorant du paiement des droits d'inscription.

Article 6

Le doctorant est bénéficiaire d'une assurance du CONACYT qui lui assure une couverture sociale pendant ses séjours en France. Son hébergement est prévu

TITRE II MODALITES PEDAGOGIQUES

Article 7

M. TOVAR Dariel est Conjointement encadre' par:

- M. le Pr. Guy NONNOTTE

- M. le Dr. Ricardo VAZQUEZ JUAREZ

qui s'engage à exercer pleinement la fonction de directeur de thèse auprès du doctorant.

Les travaux effectués seront menés dans le cadre du laboratoire de Physiologie Animale à l'UBO, de l'Unité Mixte de Nutrition des Poissons (INRA-IFREMER) et du laboratoire Patología Marina (CIBNOR).

Article 8

Le sujet de la thèse déposé par le doctorant est: "L'effet de la production de polyamines par des levures sur la maturation intestinale dans les larves de bar *Dicentrarchus labrax* et de la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*".

Article 9

La thèse donnera lieu à une soutenance unique reconnue par les deux parties.

Le jury sera constitué dans les conditions prévues à l'article 26 de l'arrêté du 30 mars 1992 précité et à l'article 8 de l'arrêté du 18 janvier 1994.

Les directeurs de thèse feront partie du Jury lors de la soutenance qui aura lieu au CIBNOR (Mexique).

La thèse rédigée en espagnol complétée par un résumé écrit en français, sera soutenue en espagnol et complétée par un résumé oral en français.

Article 10

Après soutenance et admission du candidat:

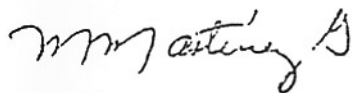
ECOS-Nord, Action de coopération scientifique avec le Mexique n° PM98S03

- l'Université de Bretagne Occidentale délivrera à M. TOVAR Dariel le titre de Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale dans les conditions prévues aux articles 27 et 28 de l'arrêté du 30 mars 1992;
- le CIBNOR s'engage à délivrer le diplôme intitulé : Doctor en Ciencias en el uso manejo y preservación de los recursos naturales.

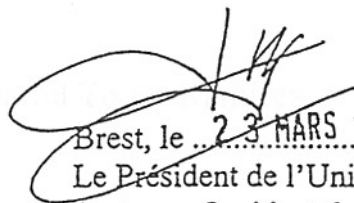
Article 11

Le dépôt, le signalement et la reproduction de la thèse seront effectués dans chaque pays selon la réglementation en vigueur. Pour la partie française, les modalités sont régies par l'arrêté du 25 septembre 1985.

Les résultats obtenus au cours de la préparation de cette thèse pourront être publiés mais resteront la propriété conjointe de l'UBO et du CIBNOR.



La Paz, le ...12 Mars 1999.
Le Président de Centro de
Investigaciones Biologicas del Noroeste
Dr. MARIO MARTINEZ GARCIA



Brest, le ...23 MARS 1999
Le Président de l'Université de
Bretagne Occidentale
P.APPRIOU



Université de Bretagne occidentale

UFR Sciences et Techniques

Résumé de la thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'université

Discipline: Océanographie biologique

Thèse présentée et soutenue publiquement

**En co-tutelle avec le Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste,
S.C. (CIBNOR)**

Par

Dariel Tovar Ramírez

**Le 30 août 2002
A La Paz, B.C.S., Mexique**

Titre: Potentiel probiotique de levures productrices des polyamines dans le développement du système digestif du bar *Dicentrarchus labrax* et de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Co-Directeurs de Thèse:

M. le Pr. Guy NONNOTTE

M. le Dr. Ricardo VÁZQUEZ JUÁREZ

Remerciements

Cette thèse en co-tutelle fait partie du projet PM98S03 financé par le comité franco-mexicain Ecos-Nord et le Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; proyecto 25956B). L'auteur a bénéficié de la bourse 84016 du CONACyT, ainsi que d'un complément de bourse attribué par l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

La grande partie de ce travail a été faite dans l'Unité Mixte de Nutrition des Poissons de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Centre de Brest.

A Brest, trouvé bonnes leçons et appui professionnels, mais aussi, bonnes amitiés: merci à Dr. Joël Gatesoupe, Dr. José Luis Zambonino et Dr. Chantal Cahu par son appui, par son temps, patience, leçons et discussions professionnels à l'intérieur et en dehors de l'IFREMER. Merci pour les week-ends chez vous et de me permettre de partager de bons moments avec vos familles.

Je remercie très sincèrement au Dr. Guy Nonnotte, pour avoir dirigé près cette thèse et au Dr. Sadasivan Kaushik par son appui et commentaires précis qui ont enrichi ce travail.

Je voudrais remercier également à Patrick Quazuguel, pour avoir fait les cultures de larves de bar pour mes expériences, par son amitié, sa compagnie plaisante et la bonne humeur. Merci beaucoup à Marie Madeleine Le Gall, par ses leçons dans le laboratoire de biologie moléculaire et enzymologie, par son amitié et également d'avoir partagé des week-end avec ma famille et les randonnées à Plougastel. À Hervé le Delliou, merci pour l'appui dans les analyses de HPLC.

L'heure sociale du café (10:00 am) et vendredis (de bonnes fromages, de pain et de vin, 12 :00 pm) étaient très agréables grâce à la bonne compagnie de Babeth, Christine, Jacques, Marie Françoise, Hervé, Vincent et Iban. Merci beaucoup à Babeth pour les week-ends de

grillades chez vous. Merci à Virginie, ma compagne de paillasse, par tes conseils et ta bonne amitié. À Joëlle Méhur, grâce de m'avoir facilité la vie dans le laboratoire. À mes amis, Benoît Vincent et Benoît Dilhac, à Karine, Alex et Nelia, et à toute la communauté latine d'avoir fait plus plaisante notre séjour à la Bretagne.

Résumé

Les probiotiques ont été définis comme des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire, et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale. L'application de tels traitements aux productions aquacoles suscite un intérêt qui s'accroît rapidement. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de souches de levures sur la maturation de l'intestin des larves du bar *Dicentrarchus labrax*. Ces souches produisent des polyamines qui sont impliquées dans la réplication et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Dix souches de levures ont été testées pour leur production de polyamines (putrescine, spermidine et spermine), et pour leur adhérence à la paroi intestinale du bar et la cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*). La production des polyamines a été analysée en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les levures sélectionnées ont été marquées avec un composé fluorescent pour tester leur adhérence à l'intestin de larves de bar et de juvéniles de cabrilla. L'adhérence a pu ainsi être évaluée par observation microscopique en épifluorescence. Les souches CBS 8339 (*Debaryomyces hansenii*) et X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été choisies pour leur forte production de spermidine et de spermine, respectivement, et pour leur capacité d'adhérence à l'intestin du bar et de la cabrilla. Les deux souches ont été ajoutées par pulvérisation au régime des larves. Nous avons observé une augmentation de 8.3% du taux de survie avec les larves alimentées avec la souche CBS 8339, mais le poids moyen de ces larves était inférieur à celui obtenu sans ajout de levure. Une augmentation de l'activité de la trypsine et de l'amylase, aussi bien que des activités enzymatiques dans la bordure en brosse, aminopeptidase, phosphatase alcaline et maltase, ont été observées dans les larves âgées de

27 jours alimentées avec la souche CBS 8339. Au jour 42, il n'existait plus de différence d'activité enzymatique entre les larves traitées ou non avec la levure. Ces résultats suggèrent que la maturation du système digestif a été accélérée chez les larves nourries avec la levure, la maturation étant achevée chez les larves de 42 jours, qu'elles aient reçu l'un ou l'autre régime.

Une deuxième expérience a été effectuée pour étudier l'effet de différents niveaux d'incorporation dans le régime contenant 1,1% et 5,7% de levure CBS 8339. L'incorporation de 1,1% a induit une augmentation du poids moyen et du taux de survie des larves, ainsi qu'une réduction du taux de malformation de la colonne vertébrale, par rapport aux résultats obtenus avec 0 ou 5,7% de levure. Les deux niveaux d'incorporation de la levure ont favorisé l'activité de la trypsine et de la lipase au jour 26. Les niveaux d'ARNm codant pour la synthèse de la trypsine et de l'amylase ont été influencés par les deux doses de levure aux jours 26 et 36. Ces résultats suggèrent qu'une faible dose de levure améliore le développement et la capacité digestive des larves, et nous formulons l'hypothèse que cette efficacité est due à la production de polyamines *in situ*. Le rôle des polyamines est particulièrement important pendant les phases de forte croissance comme les stades larvaires, mais elles peuvent être toxiques à dose trop élevée. L'incorporation de levure dans l'aliment destiné aux larves semble donc une excellente méthode pour délivrer les polyamines chez l'animal hôte.

Mots clés: probiotiques; polyamines; larves de poisson, enzymes digestives, ontogénèse

Introduction

L'aquaculture représentait plus de 26% (31 millions de tonnes) de la production mondiale de poissons, crustacés et mollusques en 1998 (117 millions de tonnes issues du produit de la pêche et de l'aquaculture), avec une augmentation annuelle de 10%. Si cette croissance se maintient, le produit de la pisciculture devrait dépasser la contribution de la pêche dans le total des poissons destinés à la consommation humaine vers l'an 2030 (FAO, 2000; Benetti Et al., 2001). La disponibilité en poissons pour la consommation humaine a augmenté de 27,6 millions de tonnes en 1961, à plus de 93 millions de tonnes à la fin du XX^{ème} siècle (FAO, 2000). Les deux tiers de ces poissons provenaient de la pêche tandis qu'un tiers provenait de l'aquaculture. Au Mexique, la culture des poissons de mer est en phase d'expérimentation, en s'appuyant sur les connaissances acquises sur d'autres espèces cultivées dans différents pays.

Cette forte croissance de la production aquacole a entraîné l'émergence de maladies infectieuses. Dans le but d'améliorer le rendement tout en préservant l'environnement, un effort de recherche sur les probiotiques s'est récemment intensifié (Gatesoupe, 1999). Les probiotiques ont été définis comme des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire, et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale. L'application de tels traitements aux productions aquacoles suscite un intérêt qui s'accroît rapidement. Des listes de probiotiques potentiels ont été esquissées en fonction de la capacité d'adhérence et de persistance des germes dans le tube digestif, ainsi que de l'antagonisme qu'ils peuvent exercer à l'encontre d'agents pathogènes pour des larves ou des juvéniles de poissons (Gatesoupe, 1999).

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de souches de levures sur la maturation de l'intestin des larves du bar *Dicentrarchus labrax*. Ces souches produisent des polyamines qui sont impliquées dans la réplication et la différenciation cellulaire, ainsi que dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Dans une étude antérieure, il avait été observé qu'un apport de 0,33% de spermine dans un aliment destiné aux larves de bar produisait une augmentation de l'activité des enzymes dans la bordure en brosse des

entérocytes (leucine-aminopeptidase et phosphatase alcaline) ainsi qu'une diminution de l'activité de la leucine-alanine peptidase (Leu-Ala) dans le cytosol. On observait également des modifications importantes dans l'activité de la trypsine, de la chymotripsine et de l'amylase. Ce traitement avait également augmenté le taux de survie des larves de 33% par rapport au résultat obtenu avec l'aliment non supplémenté en spermine (Péres et al., 1997).

Matériel et méthodes

Production des polyamines.

Dix souches de levures ont été testées pour leur production de polyamines (putrescine, spermidine et spermine). La méthode d'extraction utilisait l'acide perchlorique et la quantification des polyamines a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), selon la technique de Mallé et al. (1996).

Adhérence

Les dix souches des levures ont été testées pour leur adhérence à la paroi intestinale du bar et de la cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*). Les levures ont été marquées avec un composé fluorescent (DTAF) et incubées avec des fragments d'intestin pendant 30 minutes. Un rinçage avec une solution tampon a permis de tester l'adhérence des levures à l'intestin de larves de bar et de juvéniles de cabrilla. L'adhérence a pu ainsi être évaluée par observation microscopique en épifluorescence et en utilisant le logiciel Image Pro Plus pour quantifier les levures par unité de surface intestinale.

Elevage des larves

Des larves du bar provenant de l'écloserie de Gravelines (France) ont été élevées au Centre Ifremer de Brest pendant 42 jours. Les larves ont été distribuées dans 12 bacs cylindriques

en fibre de verre (35 l). Les conditions d'élevage ont été décrites précédemment (Cahu et Zambonino Infante, 1994).

La fabrication des aliments a été réalisée de la manière suivante: les ingrédients de chaque régime ont été mélangés avec de l'eau, compressés, concassés et séchés à 37°C pendant 45 min. Les granulés ont été tamisés afin d'obtenir des particules de différentes tailles (120-200 µm). Les poissons ont été nourris en large excès 18 h par jour grâce à un système de distribution automatique. Les levures ont été pulvérisées sur les granulés au taux de 0,9 ml g⁻¹ (soit environ 7 x10⁵ CFU g⁻¹) pour obtenir les régimes DH (*Debaryomyces hansenii* CBS 8339) et SC (*Saccharomyces cerevisiae* X2180).

Echantillonnage et dissection

Nous avons évalué le poids moyen aux jours 16, 22, 29, 36 et 42. Les taux de survie et de malformation des larves ont été mesurés à la fin de l'expérience. Les dosages enzymatiques et d'ARNm ont été réalisés aux jours 27 et 42. Des segments pancréatiques et intestinaux ont été récupérés pour les dosages enzymatiques. Les segments pancréatiques destinés à l'extraction des ARNm ont immédiatement été traités au TRIzol.

Dosages enzymatiques

Les enzymes pancréatiques trypsine, amylase et lipase ont été dosées dans le segment pancréatique (mesure de la synthèse) et dans le segment intestinal (mesure de la sécrétion). Les membranes de la bordure en brosse (BBM) ont été purifiées à partir d'un broyat de segment intestinal selon une méthode dérivée de celle de Crane et al. (1979; Cahu et Zambonino Infante, 1994). On a analysé des enzymes de BBM : l'aminopeptidase N, la maltase et la phosphatase alcaline (AP) selon Maroux et al., (1973), Dahlqvist (1970) et Bessey et al., (1946), respectivement. L'analyse d'une enzyme cytosolique, la leucine-alanine peptidase (leu-ala), a été exécutée en utilisant la méthode Nicholson et Kim (1975). La quantité de protéine a été déterminée selon Bradford (1976).

Une deuxième expérience a été effectuée pour étudier l'effet de différents niveaux d'incorporation dans le régime contenant 1,1% et 5,7% de levure CBS 8339.

Les ingrédients, y compris la levure, ont été mélangés avec de l'eau, granulés, et séchés à 45°C pendant 20 minutes. Des larves de bar ont été alimentées depuis l'ouverture de la bouche jusqu'au 38 jour après éclosion.

L'échantillonnage, la dissection et les dosages enzymatiques, ont été pratiqués de la même façon que lors de l'expérience précédente, mais les jours de prélèvement étaient différents (jours 13, 20, 27, 34 et 37). Dans cette deuxième expérience, nous avons mesuré la quantité d'ARNm codant pour des enzymes digestives en utilisant des techniques de biologie moléculaire.

Obtention d'une sonde d'ADNc pour mesurer l'ARN de la lipase

Les ARN totaux ont été extraits du segment pancréatique des larves pour subir une transcription inverse afin d'être amplifiés avec les amorces obtenues à partir de l'alignement de la plupart des régions conservées de ces séquences codant pour la triglycéride lipase du poisson zèbre (*Danio rerio*) (EMBL AW018709) et de la souris (*Mus musculus*) (EMBL X58426). Après PCR, l'ADN codant la lipase (288 pb) est alors récupéré avec le kit GeneClean (BIO 101 inc., Etats-Unis). L'ADN a été quantifié puis cloné dans un plasmide selon le protocole de clonage de Topo Ta (Invitrogene, Hollande) dans des cellules compétentes TOP10F', en utilisant le pCR® 2.1-topo® comme vecteur. Des plasmides ont été obtenus par mini-préparation avec le kit RPM (BIO 101 inc., Etats-Unis). La séquence résultante a été déposée à l'Institut européen de Bioinformatique (EMBL) sous le numéro d'accès AJ275976.

La quantification de l'ARNm codant pour chaque enzyme a été normalisée par rapport au taux obtenu avec la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les valeurs obtenues pour l'amylase, la lipase, et la trypsine ont ainsi été normalisées par calcul par rapport à la GAPDH.

Résultats et discussion

Les souches CBS 8339 (*Debaryomyces hansenii*) et X2180 (*S. cerevisiae*) ont été choisies pour leur forte production de spermidine et de spermine, respectivement, et pour leur capacité d'adhérence à l'intestin du bar et de la cabrilla. Les cellules de la souche CBS 8339 adhérant à l'intestin de la cabrilla étaient 2 fois plus nombreuses que celles de la souche de *S. cerevisiae*, et la surface occupée par la souche CBS 8339 était 2 fois plus grande que celle occupée par *S. cerevisiae* X2180 (Table VIII et Fig. 8, pp. 45-46). La souche CBS 8339 a été isolée dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel et montre une capacité élevée de coloniser l'intestin de ce poisson (Andlid et al., 1995). Le processus de colonisation a été en partie expliqué en termes de capacité des cellules de levure d'adhérer au mucus de poissons qui peut être due à un mécanisme d'adhérence spécifique, ou bien à l'hydrophobicité extérieure des cellules (Vazquez-Juarez et al., 1997). Andlid et al., (1995) ont suggéré que les levures pouvaient se multiplier dans l'intestin, et qu'elles pouvaient employer le mucus comme source unique de nutriments.

Nous avons observé une augmentation de 8.3% du taux de survie avec les larves alimentées avec la souche CBS 8339, mais le poids moyen de ces larves était inférieur à celui obtenu sans ajout de levure (Fig. 12, p. 52). On peut supposer que le processus de pulvérisation des levures a changé des propriétés physiques des microparticules. En particulier, une diminution de la flottabilité a été observée, et les particules supplémentées en levure sont descendues plus rapidement au fond. Dans ce cas-ci, les particules restaient moins longtemps en suspension, réduisant ainsi la possibilité d'ingestion d'aliment par les larves.

Une augmentation de l'activité de la trypsine et de l'amylase, aussi bien que des activités enzymatiques dans la bordure en brosse, aminopeptidase, phosphatase alcaline et maltase, ont été observées dans les larves âgées de 27 jours alimentées avec la souche CBS 8339 (Fig. 13-15, pp. 53-54). Au jour 42, il n'existait plus de différence d'activité enzymatique entre les larves traitées ou non avec la levure (ibidem). Ces résultats suggèrent que la maturation du système digestif a été accélérée chez les larves nourries avec la levure, la

maturation étant achevée chez les larves de 42 jours, qu'elles aient reçu l'un ou l'autre régime. La migration de l'activité enzymatique du cytosol vers la bordure en brosse de l'entérocyte reflète le changement d'une digestion de type larvaire pour un mode de digestion de type adulte. Ce phénomène, commun à tous les vertébrés étudiés, constitue la maturation de l'intestin (Henning, 1987). Le niveau de maturation de la digestion intestinale peut être évalué en considérant le taux d'activité segmentale des enzymes de la bordure en brosse par rapport à l'activité de la peptidase leu-ala du cytosol, qui reflète l'importance relative de la digestion membranaire comparée à la digestion intracellulaire.

Une deuxième expérience a été effectuée pour étudier l'effet de différents niveaux d'incorporation dans le régime contenant 1,1% et 5,7% de levure CBS 8339. La levure était incorporée dans l'aliment avant granulation, et non plus pulvérisée ultérieurement comme lors de l'expérience précédente. L'incorporation de 1,1% de levure a induit une augmentation du poids moyen et du taux de survie des larves, ainsi qu'une réduction du taux de malformation de la colonne vertébrale, par rapport aux résultats obtenus avec 0 ou 5,7% de levure (Fig. 15, Table X, p. 55). Ceci suggère que la levure agirait en produisant des facteurs de croissance, plutôt qu'en tant qu'apport nutritionnel direct. L'incorporation de grandes quantités de levure inactive (jusqu'à 50% de la matière sèche totale de l'aliment) a été essayée dans le régime de poissons afin de proposer une source de protéine alternative à la farine de poisson, mais aucun gain de croissance significatif n'a pas été rapporté (Métailler et Huelvan, 1993; Oliva-Teles et Gonçalves, 2001). Quoiqu'il en soit, cette expérience met clairement en évidence pour la première fois l'effet bénéfique de l'addition de levure vivante dans l'aliment destiné aux larves des poissons.

Les deux niveaux d'incorporation de la levure ont favorisé l'activité de la trypsine et de la lipase au jour 26 (Fig. 17 et 19, pp. 56-57). Les niveaux d'ARNm codant pour la synthèse de la trypsine et de l'amylase ont été influencés par les deux doses de levure aux jours 26 et 36 (Fig. 24 et 26, pp. 61-62).

Ces résultats suggèrent qu'une faible dose de levure améliore le développement et la capacité digestive des larves, et nous formulons l'hypothèse que cette efficacité est due à la

production de polyamines *in situ*. Le rôle des polyamines est particulièrement important pendant les phases de forte croissance comme les stades larvaires, mais elles peuvent être toxiques à dose trop élevée. L'incorporation de levure dans l'aliment destiné aux larves semble donc une excellente méthode pour délivrer les polyamines chez l'animal hôte.

	página
CONTENIDO	
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS	
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONVENIO CIBNOR-UBO/CONVENTION DE COTUTELLE DE THÈSE	iii
RÉSUMÉ DE LA THÈSE	iv
CONTENIDO	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
I. RESUMEN	8
I. ABSTRACT	10
II. INTRODUCCIÓN	11
III. ANTECEDENTES	13
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
VI. RESULTADOS	40
VII. DISCUSIÓN	61
VIII. CONCLUSIONES	71
IX. LITERATURA CITADA	73
ANEXO I. Productos del trabajo de tesis	83

ÍNDICE DE FIGURAS	página
Figura 1. Producción mundial por acuicultura y por categorías (FAO, 2000; estadísticas de acuicultura 1998)	11
Figura 2. Rutas de bio y resíntesis de algunas poliaminas en eucariotas	18
Figura 3. La lubina Europea <i>Dicentrarchus labrax</i>	22
Figura 4. La cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	22
Figura 5. Diagrama que muestra los segmentos en los que fueron seccionadas las Larvas para los análisis enzimáticos y obtención del RNAtotal	33
Figura 6. Cinéticas de crecimiento de las levaduras	40
Figura 7. Micrografía de fluorescencia de las cepas A) <i>D. hansenii</i> (CBS 8339), B) <i>S. cerevisiae</i> (YL12) y 3) <i>S. cerevisiae</i> (X2180) adheridas al intestino de larvas de <i>D. labrax</i> (40 X)	43
Figura 8. Micrografía de fluorescencia de las levaduras marcadas con DTAF y que están adheridas al intestino de juveniles de la cabrilla arenera (40 X)	44
Figura 9. Micrografía de fluorescencia de las levaduras marcadas con DTAF y que están adheridas al intestino de larvas de la cabrilla arenera (40 X)	45
Figura 10 . Electroforesis de agarosa con los productos de amplificación de los CDNA puros (miniprep) usando los primers del plásmido M13	46
Figura 11. Gel de agarosa con los fragmentos amplificados correspondientes a las enzimas amilasa (564 pb), lipasa (288 pb), GAPDH (366 pb) y tripsina (535 pb) de <i>P. maculatofasciatus</i>	48
Figura 12. Curva de crecimiento de larvas de la lubina Europea alimentadas con las dietas DH, SC y dieta control, libre de levaduras	50
Figura 13. Actividad tripsina secretada en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control PL17	51
Figura 14. Actividad amilasa secretada por larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control	51
Figura 15. Cocientes de la actividad de las enzimas de las células con borde de cepillo y la enzima citoplásmica leu-ala de larvas alimentadas con las dietas DH, SC	

	página
y la dieta control	52
Figura 16. Crecimiento de larvas de la lubina Europea alimentada con dos Niveles de la cepa CBS 8339	53
Figura 17. Actividad tripsina secretada de las larvas alimentadas con dos Niveles de levadura y dieta control	54
Figura 18. Actividad amilasa secretada de las larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control	55
Figura 19. Actividad específica de la lipasa en larvas alimentadas con levadura y dieta control	55
Figura 20. Actividad de las enzimas de las células con borde de cepillo de larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control	56
Figura 21. Curva de calibración para la lipasa	57
Figura 22. Curva de calibración para la tripsina	57
Figura 23. Curva de calibración para la GAPDH	58
Figura 24. Curva de calibración para la amilasa	58
Figura 25. Niveles de mRNA de amilasa en larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control	59
Figura 26. Niveles de mRNA de lipasa en larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control	60
Figura 27. Niveles de mRNA de tripsina para larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control	60

ÍNDICE DE TABLAS	página
Tabla I. Poliaminas mas comunes	17
Tabla II. Levaduras utilizadas para los ensayos de producción de poliaminas y adhesión	24
Tabla III. Resumen de las técnicas para el ensayo de actividad enzimática	34
Tabla IV. Amplificación de los fragmentos seleccionados	37
Tabla V. Poliaminas detectadas en el medio de cultivo libre de células	41
Tabla VI. Poliaminas detectadas en el homogenado celular	41
Tabla VII. Concentración de poliaminas (nM mL^{-1}) en el homogenado celular (H) y en el medio de cultivo libre de células (FC)	42
Tabla VIII. Primers diseñados para la lipasa	43
Tabla IX. Primers diseñados para la lipasa	47
Tabla X. Supervivencia final del las larvas alimentadas con 1.1 y 5.7% de levaduras	53
Tabla XI. Producción de poliaminas por tres diferentes species	62

ABREVIATURAS

Abs	absorbancia
AP	fosfatasa alcalina
bp	par de bases nitrogenadas
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
°C	grados Celcius o centígrados
cm	centímetro
dir	oligonucleótido (primer) 5'
DO	densidad óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP's	desoxirribonucleósidos 5' trifosfato
DTAF	(5-([4,6-diclorotriazina-2-YL]amino)-fluoresceina
g	gramo
g	unidades gravitacionales (1.1×10^{-5} x radio del rotor (cm) (rpm ²)
h	hora
HPLC	Hight Performance Liquid Chromatography
L	litro
LAP	leucino amino peptidasa
lb	libra de presión
leu-ala	leucino-alanin peptidasa
M	molar
m ²	metro cuadrado
min	minuto

mg	miligramos
mm	milímetros
mod	modelo
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
mM	milimolar
mU	miliunidades
nm	nanometros
nM	nanomoles
mL	mililitro
µg	microgramo
µm	micrómetro
µM	micromolar
Pat	patente
pH	potencial de hidrógeno (-log H ⁺)
pmoles	picomoles
put	putrescina
rev	oligonucleótido (primer) 3´
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
sol	solución
spd	espermidina
sp	espermina

Tris	tris-hidroximetil aminometano
Vol	volúmen
UV	ultravioleta
W	watts
UFC	unidades formadoras de colonias
U	unidades
%	porciento

I. RESUMEN

El interés por el uso de los probióticos en acuicultura se ha incrementado rápidamente. En el presente trabajo, evaluamos el potencial de algunas levaduras en el desarrollo del sistema digestivo larvario de una especie importante para la acuicultura: la lubina Europea, *Dicentrarchus labrax*. En primer lugar, se cuantificó la producción de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en 10 cepas de levadura mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). También se evaluó la adhesión de levaduras marcadas con fluoresceína al intestino de larvas de la lubina Europea y de juveniles de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) mediante microscopía de fluorescencia. Se observó que dos de ellas, la cepa CBS 8339 (*Debaryomyces hansenii*) y la X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) producen las tres poliaminas buscadas y mostraron la mejor capacidad de adhesión al intestino de la lubina y de la cabrilla arenera. Cuando fueron alimentadas las larvas de la lubina durante 42 días con la cepa CBS 8339, experimentaron un aumento del 8.3% en la sobrevivencia, pero no así para el peso. Se observó que la secreción de tripsina y amilasa, así como las enzimas del borde de cepillo: fosfatasa alcalina, maltasa y aminopeptidasa se incrementan en el día 27 de crecimiento en aquellas larvas alimentadas con la cepa CBS 8339. Para el día 42, no existe diferencia en la actividad de los diferentes grupos, lo que sugiere este patrón una maduración del sistema digestivo en las etapas tempranas del desarrollo larvario. En un segundo experimento se incluyó la cepa CBS 8339 a 1.1% y 5.7% en el alimento para larvas de la lubina Europea con la finalidad de conocer el nivel óptimo de inclusión y su efecto en el desarrollo de su sistema digestivo. Con 1.1% se logró obtener un mejor crecimiento, sobrevivencia y el menor número de larvas deformes. La inclusión de levadura favoreció la secreción de las enzimas tripsina y lipasa a

los 26 días; mientras que los niveles de los mRNA's codificantes para tripsina y amilasa, fueron influenciados en aquellas larvas alimentadas con levaduras los días 26 y 36 después de la eclosión, lo que sugiere un mayor desarrollo en la actividad digestiva de las larvas. Sugerimos que el desarrollo del sistema digestivo es inducido por el aporte de poliaminas secretadas por esta levadura.

Palabras clave: poliaminas; probióticos; larvas de pez

I. ABSTRACT

The interest in probiotics for aquaculture is increasing rapidly. In the present work we evaluated the potential of some yeast to induce the larvae gut maturation in sea bass larvae *Dicentrarchus labrax*. The production of polyamines putrescine, spermidine and spermine was quantified in ten yeast strains using high performance liquid chromatography (HPLC). Afterwards, fluorescently labelled yeast adhesion to the intestine of sea bass larvae and the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) was evaluated by fluorescent microscopy. Two of them, CBS 8339 strain (*Debaryomyces hansenii*) and X2180 strain (*Saccharomyces cerevisiae*) produce the polyamines of our interest. The same strains showed the best adhering capabilities to the sea bass and spotted sand bass intestine. Both strains were selected and introduced by pulverization into the diet of larvae. The larvae fed with CBS 8339 strain, increase survival in 8.3% but not in their weight. The secretion of trypsin and amylase as well as those from the brush border membrane: alkaline phosphatase, maltase and leucine aminopeptidase, are increased at 27 days after hatching (dah). At 42 dah difference in the enzyme activity of the different groups does not exist, suggesting a maturation of the digestive system in early stages of larval development. A second experiment was carried out to know the effect of different levels of incorporation into the diet of CBS 8339 strain: 1.1% and 5.7%. The minimum level, 1.1% of yeast produce best growth and survival rates, as well as lower deformed larvae than those obtained by 5.7% and the control one. Both level of yeast inclusion favored the trypsin secretion and lipase activity at 26 dah. Whereas mRNA levels for trypsin and amylase were influenced by both yeast concentrations at 26 and 36 dah, which suggest a development of digestive capacity of larvae as a result of the presence of polyamines secreted by the yeast.

II. INTRODUCCIÓN

La acuicultura representó más del 26% (31 millones de ton) de la producción total mundial en 1998 (117 millones de ton), con un incremento del 10% anual. Con esta velocidad se espera que para el año 2030, esta práctica domine el aporte de peces para consumo humano muy por arriba de la producción por captura (FAO, 2000; Benetti et al., 2001). Aunado a estas cifras, la disponibilidad de peces para el consumo humano ha aumentado de 27.6 millones de tons (1961), a más de 93 millones de ton para el fin del siglo XX (FAO, 2000), de los cuales un tercio proviene de la acuicultura.

Hasta nuestros días, los países Asiáticos continúan con el dominio en la producción mundial de organismos por acuicultura con el 83% (FAO, 2000); de esto, se sabe que la producción de peces marinos representa solamente el 2% del total de especies obtenidas por acuicultura (FAO, 2000) lo que nos hace reflexionar del estado que guarda el cultivo de peces marinos en el contexto mundial (Fig. 1).

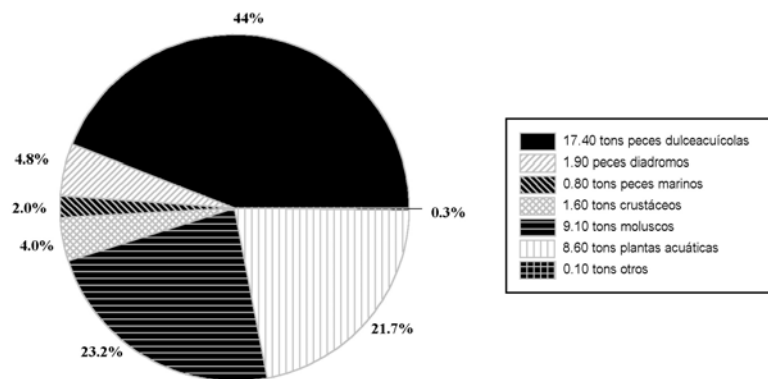


Figura. 1. Producción mundial por acuicultura y por categorías (FAO, 2000; estadísticas de acuicultura 1998).

El cultivo de peces marinos con alto valor económico, esta siendo llevado a cabo en regiones importantes de América (sur de los Estados Unidos, Golfo de México, países del Caribe y Latinoamérica) (Benetti et al., 2001), lo cual repercutirá positivamente en la producción mundial.

Entre las especies de peces marinos con prospección comercial importante para América Latina, se encuentran aquellas que están siendo estudiadas en regiones particulares, tales como los huachinangos (*Lutjanus* sp.), el dorado (*Coryphaena hippurus*), los jureles (*Seriola* spp., *Caranx* spp), la Cobia (*Tachycentrum canadum*), los meros (serranidae, *Epinephelus* spp., mullets (*mugil* spp.); lubinas, cabrillas, corvinas (*Menticirrhus* spp. Tambor: *Sciaenops* spp.) y lenguados (*Paralichthys* spp.) (Benetti et al., 2001).

Los peces cultivados con mayor éxito en México son las tilapias (más del 60% de especies cultivadas), sin embargo, el cultivo de peces marinos es aún incipiente a pesar de que en la región del golfo de California se localizan 866 especies de peces, que corresponden a más del 55% de todas las familias de especies conocidas (Acuña, 1998). Lo anterior hace atractivas las prospecciones para el cultivo de peces marinos con alto valor económico para la región y el país.

Existen muchas líneas de investigación que podrían ser citadas para coadyuvar el desarrollo de la tecnología para el cultivo de larvas de peces marinos (sanidad, genética, reproducción, desarrollo de la zootecnia, etc.). Sin embargo, con este trabajo se pretenden abarcar aspectos importantes relacionados con la nutrición y los procesos enzimáticos digestivos que se llevan a cabo en larvas de peces marinos, que pueden ser regulados para la obtención de un mayor crecimiento y sobrevivencia, derivados de una maduración precoz de éstas.

III. ANTECEDENTES

3.1. *El cultivo de peces marinos*

En México, el cultivo de peces marinos se encuentra en plena fase de experimentación que va de acuerdo a los conocimientos adquiridos por las experiencias con diversas especies cultivadas exitosamente en diferentes países líderes en esta área.

Una de las condiciones mas importantes para la producción de peces marinos, es la obtención de huevos fertilizados de alta calidad; esto se logra manteniendo los reproductores libres del estrés por su captura, y sanos hasta su maduración final (Benetti et al., 2001), además del aporte de nutrimentos de alta calidad para la obtención de larvas bien nutridas con buena tasa de sobrevivencia.

El cultivo de peces marinos se ha convertido en una actividad creciente y se apoya principalmente de los criaderos para el suministro de larvas alimentadas, generalmente, con alimento vivo durante su primer mes de vida (Zambonino-Infante y Cahu, 1999). La secuencia de alimentación se basa primariamente de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp. y otras); rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia salina*, durante los primeros 20-25 días de cultivo, continuando con una combinación del alimento vivo con alimento seco hasta completar el “destete” (Kolkovski et al., 1997). Dependiendo de la especie, los tiempos de “destete” podrán verse modificados de acuerdo a su morfofisiología. Asi por ejemplo, con la lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*) se han obtenido buenas tasas de crecimiento y sobrevivencia con una alimentación artificial desde la abertura de la boca (Cahu et al., 1998) mientras que con la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) se han intentado varias fechas de “destete”, observando que las mayores tasas de sobrevivencia logradas se obtienen hasta los

30 y 34 días de haber eclosionado (Anguas et al., 2000; Contreras-Olguín et al., 1997). Con los peces pelágicos el “destete” se realiza a las dos semanas, y con el huachinango hasta los 40 días después de su eclosión (Benetti et al., 2001).

3.2. La digestión en larvas de pez.

La alimentación exógena principia pocos días antes de la absorción completa del vitelo, mientras que el alimento comienza a ser digerido en un sistema poco desarrollado (Gatesoupe, 1993) que tomará algunas semanas para encontrarse completamente funcional. La maduración del estómago e intestino toma diferentes tiempos dependiendo de la especie; por ejemplo, en la lubina Europea, el estómago se desarrolla a partir de los 25 a 30 días (Vu, 1983).

Desde hace algunos años, se ha creído que las larvas de peces no poseen las enzimas necesarias para digerir dietas compuestas, y que la digestión del alimento vivo se realiza por autólisis en el tracto digestivo (Zambonino-Infante and Cahu, 1999). Por otro lado, algunos autores han sugerido que las larvas de peces no pueden asimilar las dietas compuestas debido a la insuficiente actividad enzimática que puede ser compensada por las enzimas del alimento vivo (Kolkovsky et al., 1993). Sin embargo, Zambonino-Infante and Cahu, (1994a) demostraron que entre los 4 y 6 días de haber eclosionado las larvas de la lubina Europea, se incrementa la actividad enzimática digestiva sin estímulo alimenticio. Estos mismos autores también demuestran que la contribución de la actividad tripsina por *Artemia* es del orden del 5% del total obtenido en larvas de 20 días de haber eclosionado (Cahu y Zambonino-Infante, 1995). Por otro lado, la actividad proteasa de los rotíferos se ha estimado en 0.6% del total de esta actividad en intestino de la sardina Japonesa de 2 días de haber eclosionado (Kurokawa et al., 1998). También se ha comprobado que la actividad

enzimática en larvas alimentadas con dietas compuestas y con alimento vivo es similar (Zambonino-Infante y Cahu, 1994b), además de haberse demostrado que al sustituir completamente el alimento vivo por dietas compuestas, se pueden obtener la misma sobrevivencia y crecimiento (Péres et al., 1998).

Actualmente, la industria del cultivo de larvas de peces tiene como principal objetivo el sustituir el alimento vivo por dietas compuestas, en las primeras etapas de su desarrollo (Zambonino-Infante and Cahu, 1999), para bajar los altos costos de producción larvaria y mantener una constante calidad de juveniles (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Dentro del cultivo de peces marinos, esta etapa es generalmente la fase mas difícil, por lo que la mayoría de los esfuerzos en esta área es la de mejorar técnicas con la finalidad de aumentar el crecimiento y las tasas de supervivencia (Gatesoupe, 1993).

3.3. Los probióticos en la acuicultura.

El concepto moderno de probiótico fue introducido desde hace 25 años por Parker (1974), y desde entonces la comunidad científica lo ha modificado en diversas ocasiones, adecuandolo incluso a la acuicultura (Gatesoupe, 1999). Es un hecho de que los probióticos se han utilizado partiendo de conocimientos empíricos hasta su aplicación, apoyados con fuertes argumentos científico y tecnológicos.

En un amplio sentido, el término de probiótico se aplica a aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud (Gatesoupe, 1999).

Recientemente, se ha incrementado la búsqueda de probióticos con fines de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas bajo un esquema de cultivo amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Existe una lista de probióticos potenciales que han sido estudiados por

su capacidad de adherencia y persistencia en el tracto digestivo, así como su capacidad antagónica hacia patógenos potenciales de larvas y juveniles de peces (Gatesoupe, 1999). Estas tres características son esenciales para considerar a un microorganismo como candidato a ser usado en la larvicultura como suplemento en alimentos vivos o preparados. Se ha propuesto que los probióticos juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune de los organismos acuáticos (Gatesoupe, 1999) al igual que los efectos ya observados en animales domésticos. Las larvas de los peces muestran un sistema inmune poco desarrollado, que lo hace diferente al de los adultos de su especie, ya que éste está basado principalmente en respuestas inespecíficas. Estudios recientes muestran efectos positivos en la estimulación de su sistema inmune cuando son utilizados compuestos originados de la pared celular de microbios, tales como los glucanos, lipopolisacáridos y muramil dipéptidos (Anderson, 1992; Vázquez-Juárez, 1996).

En relación a los mecanismos de adherencia y consecuente colonización del tracto digestivo, existen numerosos reportes que describen potenciales probióticos, especialmente bacterias (por su persistencia en hospederos como crustáceos, peces y moluscos (Gatesoupe, 1999).

Existen pocos reportes del uso de levaduras como probióticos para larvas de peces; sin embargo, se han utilizado como sustituto parcial de la harina de pescado en la alimentación de juveniles de la lubina Europea (Metailler y Huelvan, 1991; Oliva-Teles y Gonçalves, 2001). Existen también reportes que describen los mecanismos de adhesión y persistencia de estos microbios en hospederos; se han descrito desde el aislamiento, capacidad de adhesión, persistencia y colonización de levaduras en algunos peces de importancia comercial como la trucha y el rodaballo o pez sol (Andlid et al., 1995; Vázquez-Juárez,

1997). Otra característica importante que cumplen los probióticos, es el aporte de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero.

3.3. Las poliaminas.

Las poliaminas son pequeñas moléculas policatiónicas, alifáticas, aromáticas, estables bajo condiciones ácidas o alcalinas que están presentes en todos los materiales biológicos (Tabor y Tabor, 1985). Son producidas en todas las células, especialmente en aquellos tejidos con alto recambio celular y crecimiento (Bardócz, 1993). Se conocen de acuerdo a las condiciones en las que son generadas: se dice que son poliaminas verdaderas cuando son sintetizadas *de novo*, y aminas biogénicas cuando son generadas por reacciones no específicas por descarboxilación de aminoácidos.

Se creía que las poliaminas eran sintetizadas solamente *in situ* (Fig. 2) y de acuerdo a las demandas del organismo. Sin embargo, ahora también se reconoce la importancia del aporte por fuentes externas como los alimentos de la dieta del consumo diario (Bardócz et al., 1995) y por la flora microbiana (Osborne y Seidel, 1989).

Ejemplos de las poliaminas más comunes son la putrescina, espermidina y espermina (Tabla I), quienes poseen en sus moléculas 2, 3 y 4 cargas positivas, respectivamente, bajo condiciones fisiológicas (Bardócz, 1993).

Tabla I. Poliaminas más comunes.

	Estructura	Abreviatura
Putrescina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$	Put
Espermidina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}_2$	Spd
Espermina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}(\text{CH}_2)_4 \text{NH}(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$	Sp

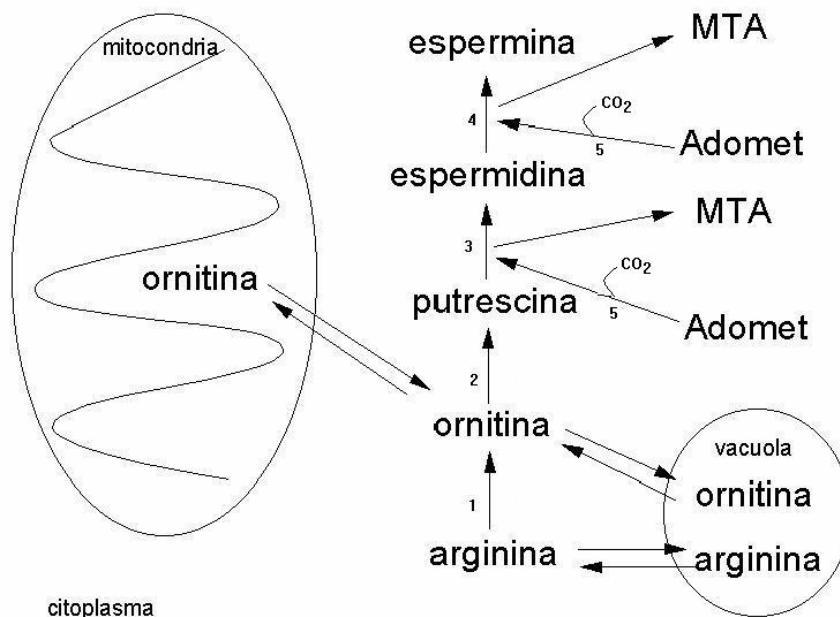


Figura. 2. Rutas de bio- y re-síntesis de algunas poliaminas en eucariotas. Enzimas participantes: 1, arginasa (E.C. 3.5.3.1); 2, ornitín descarboxilasa (E.C. 4.1.1.17); 3, espermidín sintetasa (E.C. 2.5.1.16); 4, espermin sintetasa (E.C. 2.5.1.22); 5, adenosil metionín descarboxilasa (E.C. 4.1.1.50). Adomet: S-adenosil metionina; MTA: 5' metil tio adenosina (Pegg, 1986; Davis, 1986).

A la fecha, se han descrito con exactitud algunas de las funciones tanto específicas como inespecíficas de las poliaminas en la replicación celular; sin embargo, aun falta por elucidar los mecanismos moleculares de muchos de los procesos en donde se ven involucradas. Se sabe que participan en diversas etapas de la síntesis de proteínas, de RNA y DNA: control e inicio de la traducción (Konecki et al., 1975) y la regulación de la fidelidad de ésta (Abraham et al., 1979), estimulación de la asociación ribosomal (Kyner et al., 1979), mejoramiento de la síntesis de RNA (Barbiroli et al., 1971) y DNA (Filligame et al., 1975), estabilización de la estructura del RNA (Cohen, 1978), reducción de la velocidad de degradación del RNA (Fausto, 1972) y participación en la condensación del DNA (Anderson y Norris, 1960). Se sabe que son esenciales para el crecimiento y proliferación celular y como mediadores de la acción de hormonas y factores de crecimiento (Bardócz et

al., 1995). Otra función sugerida es que las poliaminas son moléculas importantes que ayudan a mantener una correcta estructura y organización de la pared celular de levaduras (Miret et al., 1992).

Algunas aminas biogénicas, como la histamina, la tiramina y β -feniletilamina, representan riesgos para la salud por ser tóxicas cuando los niveles en la dieta son altos, pues la primera es vaso- y psico-activa, mientras que la segunda sólo vasoactiva (Bardócz, 1995). Por otro lado, la cadaverina y putrescina son precursores de las nitrosaminas (Vallé et al., 1997) que son compuestos con actividad cancerígena y mutágena para los animales, potencializando los efectos de la histamina, tiramina y β -feniletilamina cuando están presentes (Bardócz, 1995). En este trabajo solo nos enfocaremos a los efectos de la putrescina, espermidina y espermina.

Los estudios relacionados con poliaminas se han incrementado en las dos últimas décadas dado la importancia que representan en los sistemas biológicos. Se ha observado que la administración de 10 μ mol diarios de espermidina y espermina, en ratas neonatas producen incrementos de actividad enzimática lactasa, sacarasa y maltasa, así como modificaciones en la morfología del epitelio intestinal (Dufour et al., 1988). Por otro lado, la liberación de espermina y espermidina por *Saccharomyces boulardii* ejerce importantes efectos en la maduración celular, la expresión de enzimas digestivas (sacarasa y maltasa), en los mecanismos de transporte a nivel de membrana y en la renovación del epitelio celular en ratas y humanos (Buts et al., 1994).

En peces se ha observado que el suministro de 0.33% de espermina en las etapas larvarias de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax*, produce un incremento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo (leucino-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina) y una baja de

actividad citosólica (leucino-alanina peptidasa). Se observan también modificaciones importantes en la actividad de las enzimas pancreáticas tripsina, quimiotripsina y amilasa, además de incrementarse la supervivencia en un 33% con respecto a la dieta control libre de poliaminas (Péres et al., 1997).

Se ha demostrado también que la poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo del tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardócz, 1995; Buts et al., 1993). Sin embargo, son escasos los reportes de la composición y abundancia de éstas en los alimentos tanto de especies de cultivo como para consumo humano (Bardócz, 1993). Sabiendo que participan en el crecimiento y proliferación celular, se estudia la posibilidad de regular su actividad en las células cancerígenas (Bardócz, 1993). Por sus características físico-químicas, las poliaminas también influyen positivamente en el rendimiento de la amplificación del DNA por PCR (Fiedrow y Szweykowska-Kulinska, 1997).

Justificación.

En los últimos años, numerosas especies de peces marinos han sido investigadas con la finalidad de implementar su cultivo a nivel comercial. De estos estudios ha surgido la necesidad de conocer la fisiología y bioquímica de la digestión, así como la formulación de dietas apropiadas para las etapas larvarias, ya que se ha encontrado que la composición de éstas pueden regular la expresión de los genes que codifican para enzimas digestivas (Corring et al., 1989; Le Huërou-Luron et al., 1993).

Se sabe que durante las primeras cinco semanas de vida de los peces marinos, se llevan a cabo numerosos cambios funcionales y morfológicos en su sistema digestivo (Péres et al., 1997), por lo que es de suma importancia conocerlos y comprender que factores son los

determinantes para el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de las larvas en este período crítico.

Al igual que en mamíferos, los peces sufren cambios morfológicos y fisiológicos relacionados con la digestión a nivel ontogénico, que al parecer también están programados genéticamente (Dabrowsky y Culver, 1991). Se sabe que los procesos de ingestión, digestión y asimilación de los nutrientes están bien adaptados para maximizar el crecimiento de las larvas de pez, pero estas adaptaciones varían de especie a especie (Houde y Schekete, 1980, 1983) por lo que resulta interesante utilizar estos conocimientos de base en el cultivo de larvas de especies nativas de peces con potencial económico para México.

Por otro lado, los estudios relacionados con el uso de levaduras como probióticos potenciales para el cultivo de larvas de pez, son nulos hasta la publicación de la presente, por lo que resulta atractiva y original esta línea de investigación dados los antecedentes sobre la capacidad de adhesión y producción de poliaminas (Andlid et al., 1995; Vázquez-Juárez et al., 1997; Buts et al., 1994).

La primera parte de este trabajo radica en evaluar la capacidad de producción de las poliaminas espermina y espermidina, en levaduras aisladas de diferentes fuentes. En segundo término, conocer su capacidad de adhesión al intestino de peces, y finalmente, conocer el efecto de las cepas seleccionadas en el crecimiento, sobrevivencia y maduración del sistema digestivo de las larvas de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax*, pez de alto potencial económico en Europa (FAO Fisheries Circular, 1986-1995; Josupeit, 1995) y la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*, pez de alto potencial para la región noroeste de México (Figs. 3 y 4).

Hipótesis

Las poliaminas son importantes moduladores de diversas funciones celulares que son demandadas de manera particular por células de rápido crecimiento. Dado que las fuentes endógenas podrían verse limitadas, las poliaminas producidas y secretadas por las levaduras incluídas en el alimento preparado para larvas de peces marinos, incrementarán el desarrollo de las funciones digestivas de éstas, por lo que la maduración digestiva estará dada en función de la expresión y actividad de los genes codificantes para enzimas digestivas.



Figura 3. La lubina Europea *Dicentrarchus labrax*.



Figura 4. La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

IV. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Conocer el potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *D. labrax* y la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

5.2. Objetivos específicos

1. Conocer la producción de poliaminas en 10 levaduras aisladas de diferentes fuentes durante el inicio de la fase estacionaria de crecimiento.
2. Estudiar el potencial de adhesión de levaduras productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de *D. labrax*.
3. Estudiar el efecto de la incorporación y cantidad de levaduras productoras de poliaminas en el alimento de larvas de *D. labrax* para conocer sus niveles óptimos de inclusión.
4. Obtención de sondas de cDNA para la detección y cuantificación de la lipasa hepática de *D. labrax*.
5. Obtención de sondas de cDNA para la detección y cuantificación de la lipasa, tripsina, GAPDH y amilasa de *P. maculatofasciatus*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Para conocer el potencial de producción de poliaminas y capacidad de adhesión al intestino del pez, se seleccionaron algunas levaduras aisladas de diversas fuentes (Tabla II).

Tabla II. Levaduras utilizadas para los ensayos de producción de poliaminas y adhesión.

1. <i>Rhodotorula glutinis</i>	
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7764	CBS collection , aislada de pez*
3. 7835	
4. <i>Debaryomyces hansenii</i> J26	NRRL collection*
5. <i>S. cerevisiae</i> CBS 7765	CBS collection, aislada de pez*
6. <i>D. hansenii</i> CBS 8339	CBS collection , aislada de pez*
7. <i>S. cerevisiae</i>	cepa de laboratorio *
8. <i>S. cerevisiae</i> X2180	cepa de laboratorio *
9. AY1 (no identificada)	aislada de abulón*
10. <i>Candida albicans</i>	(aislada de paciente, SSA La Paz, B.C.S.)

* cepas utilizadas en los ensayos de adhesión con la cabrilla arenera.

5.2. Medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras

La reactivación de las levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose broth, Sherman, 1991) cuya composición fué la siguiente:

Glucosa	2%
Peptona	1%
Extracto de levadura	0.5%

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 120°C, 15 lb de presión durante 20 min. Las levaduras se inocularon por estría cruzada en medio YPD (Agar 2%) y fueron incubadas a 30°C hasta observar crecimiento (24-48 horas). La cinética de crecimiento se evaluó en medio de cultivo líquido YNB (DIFCO), que se elaboró de la siguiente manera: se agregaron 6.7 g de medio YNB en 100 mL de agua destilada, 5 g de glucosa (u otro azúcar), se agitó para disolver y se esterilizó por filtración (0.2 μm); el pH final fué de 5.4 ± 0.2 a 25°C y se almacenó a 2-8°C hasta su uso.

5.3 Cinética de crecimiento de las levaduras.

Se usaron matraces de 120 mL de capacidad con 40 mL de medio YNB. Cada matríz fué inoculado con 2 mL de suspensión celular preparada de la siguiente forma: se tomó una asada de una colonia del medio sólido y se resuspendió en 5 mL de YNB, se agitó y de ahí fueron tomados 2 mL como inóculo (Abs 550 nm = 1.0). Como parámetro de crecimiento se consideró el aumento en densidad óptica medido a 550 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU640, cada 4 horas a partir del tiempo cero (t_0). Los matraces se incubaron a 200 rpm y 25°C en una incubadora orbital (NEW BRUNSWICK).

La excepción fué *Candida albicans* cuyo crecimiento se llevó a cabo en tubos cónicos FALCON de 20 mL de capacidad con 4 mL de medio YNB. Se hizo esta excepción porque durante su crecimiento forma agregados y requiere de mayor velocidad de agitación. La reactivación se llevó a cabo en medio YNB sólido hasta observar crecimiento. Una vez crecida, se transfirieron un par de asadas a 10 mL de medio YNB líquido, se agitó por VORTEX y de ahí fueron tomados 0.2 mL para cada tubo FALCON con 4 mL de medio YNB (30 réplicas) y se incubaron en una incubadora orbital NEW BRUNSWICK a 200 rpm y 30°C. Se retiraron 3 tubos cada 4 h y el crecimiento se midió por peso seco.

5.4. Método de extracción de poliaminas biogénicas.

El método de extracción y detección de poliaminas se llevó a cabo de acuerdo a Mallé et al., (1996) con el siguiente procedimiento: se eliminó el medio de cultivo por centrifugación a 10,000 x g, a 4°C, durante 10 min; el sedimento fué lavado con agua destilada, se centrifugó nuevamente y después se resuspendió en ácido perclórico 0.2 M (10 vol/peso). Las células se rompieron por ultrasonido a 40 W de potencia en un aparato COLE PARMER 4710, con 3 intervalos de 30 seg en baño de hielo. El homogenado resultante se centrifugó a 3000 x g durante 10 min y 4°C en una centrifuga de gabinete (BECKMAN GPR); del sobrenadante resultante se tomaron 100 µL para la detección por cromatografía de alta resolución (HPLC).

En una segunda ocasión, para la homogenización celular se utilizaron perlas de vidrio de 0.3-0.5 mm y ácido perclórico (1:1). La suspensión celular en ácido perclórico y las perlas de vidrio se agitaron en vortex a la máxima intensidad por 10 veces durante 1 min e intervalos de 1 min en baño de hielo. Posteriormente se centrifugó a 5000 x g durante 10 min. y 4°C para desechar los restos celulares, verificándose la eficiencia de rompimiento celular por microscopía y conteo de células viables incubadas.

5.5. Método de marcaje de las poliaminas biogénicas (dansilación) (Mallé et al., 1996).

Los 100 µL tomados del extracto libre de células, se diluyeron en 10 mL de ácido perclórico 0.2 M y se volvieron a tomar otros 100 µL, a los que se les añadió 200 µL de solución saturada de carbonato de sodio y 400 µL de cloruro de dansilo (75 mg/10 mL de acetona). La mezcla se incubó 20 min en baño de agua a 60°C. Una vez transcurrido el tiempo, se le añadió 100 µL de L-prolina fría (100 mg/mL en agua) y se incubó nuevamente en la oscuridad y en el refrigerador durante 30 min. Después de este tiempo se

agregó 500 μL de tolueno, se agitó en vortex y se dejó a que se formaran dos fases, de las cuales se recuperó la fase superior (orgánica) y se secó en flujo de gas nitrógeno. Finalmente, se resuspendió el producto en 300 μL de acetonitrilo y se filtró en membranas (ACRODISC) de 0.2 μm .

5.6. Detección de poliaminas por HPLC.

La detección de poliaminas biogénicas se llevó a cabo inyectando 20 μL del homogenado filtrado a una columna de HPLC acoplado a un aparato LKB-LCC 2552 (PHARMACIA) unicord SII, con dos bombas 2248 y los detectores (GILSON) mod 121 de fluorescencia (con filtros 310-410 y 420-650 nm) y un LKB Unicord SII de UV (con filtro de 254 nm).

Se usó una columna SUPELCOSIL (SIGMA-ALDRICH) LC-18-DB, de 25 cm de largo, 5 μm de diámetro y los cromatogramas se registraron en un aparato KIPP and ZONEN de dos plumas. La elución de las poliaminas se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/min con una concentración de agua/acetonitrilo de acuerdo a los tiempos, porcentajes siguientes y temperatura de 21°C:

Tiempo (min)	% agua	%CH ₃ CN
0	40	60
6	25	75
8	24	76
13	5	95
20	4	96
20.1	39	61
30	40	60

En una segunda ocasión, se utilizó un equipo Waters 600E de Millipore, con un sistema controlador 486 y un detector UV de 284 nm. La columna utilizada fué de fase reversa

NOVAPACK (WATERS) de 30 cm de largo y 4 μm de diámetro, y las condiciones de separación fueron las mismas antes descritas.

5.7. Cuantificación de las poliaminas.

Para conocer la cantidad producida de poliaminas, se corrió una curva estándar en el HPLC, utilizando tres concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) por separado de putrescina (Sigma, P-7505), espermidina (Sigma, S-0381) y espermina (Sigma, S-2876). La cuantificación se basó en la altura (mm) de los picos de las muestras y los correspondientes a cada poliamina control y su correlación de acuerdo a la fórmula obtenida por regresión lineal simple de las tres concentraciones.

En la segunda ocasión, se realizó una curva estándar con las concentraciones de 1, 20, 40 y 100 nanomoles (nM) de cada poliamina: putrescina, espermidina, espermina y 1, 3-diaminopropano (Sigma, D2, 380-7) (80 mg/100 mL agua destilada) como estándar interno. La cuantificación de las poliaminas se llevó a cabo por la integración de los picos usando el software del equipo.

5.8. Marcaje de células con fluoresceína (Sherr et al., 1987).

Una vez obtenidos los cultivos frescos de levadura en medio líquido, se centrifugaron a 3000 x g, a temperatura ambiente durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en 10 mL de Na_2HPO_4 0.05 M/0.85% NaCl /DTAF (Sigma D-0531) 20mg/ml y se incubaron durante 2 h en baño maría a 37°C. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se eliminó a 5000 rpm, temperatura ambiente durante 10 min. Se lavó con agua de mar estéril (18 ppm) y se centrifugaron en las condiciones anteriores. Se resuspendieron en agua de mar/agua destilada/glicerol (4:4:2) y las levaduras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Se realizó un conteo de unidades

formadoras de colonia (UFC) para medir sobrevivencia y control del número celular antes del experimento.

5.9. Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de *D. labrax*.

El estudio de adhesión *in vitro* se llevó a cabo con las levaduras enlistadas en la Tabla II.

Después de evaluar la producción de poliaminas en las 10 diferentes cepas, se estudió su capacidad de adherirse al tracto digestivo de larvas de *D. labrax* de 41 días de edad, así como en juveniles y larvas de *P. maculatofasciatus* de 3 meses y 45 días, respectivamente.

Los segmentos de intestino fueron puestos en amortiguador de fosfatos (2 mM/NaCl 137 mM, pH 7.4), posteriormente se adicionó el cultivo de las levaduras marcadas con DTAF.

Los segmentos fueron incubados durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con amortiguador de fosfatos para eliminar el exceso de células. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se evaluó la cantidad de levaduras adheridas por campo (40X) mediante microscopía de fluorescencia y con el uso del software Image Pro Plus v. 4.5.0.19, para el caso de la cabrilla.

5.10. Efecto de la incorporación de las cepas CBS 8339 y X2180 en el alimento de larvas de *D. labrax*.

Las levaduras *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) y *Saccharomyces cerevisiae* (X2180), seleccionadas por su capacidad de adhesión al intestino de las larvas y producción de poliaminas, fueron incorporadas al alimento PL17, después de haberlas crecido hasta su fase logarítmica y concentrado por centrifugación a 3000 x g, durante 5 min a temperatura ambiente. El alimento PL17 cuya composición esta patentada (Pat. 99-050449) contiene:

58.4% de proteína, 21.3% de lípidos, (11.6% lípidos neutros y 7.8% de fosfolípidos), 12.2% de cenizas relativas a la materia seca y una humedad de 9.8%. Se prepararon dos tamaños de alimento, 120-200 μm para los primeros 10 días y 200-400 μm hasta el final del experimento. Una vez resuspendidas las levaduras en agua destilada estéril, fueron adicionadas al alimento por medio de un spray en proporción de 0.9 mL de suspensión celular (equivalente 67.5×10^4 UFC para la cepa CBS 8339, dieta DH, y 63×10^4 UFC para la cepa X2180, dieta SC) por gramo de alimento. La cantidad de células mencionada previamente, de la cepa CBS 8339, producen el equivalente de poliaminas de 0.015 nM de espermidina, 0.0056 nM de espermina y 0.0054 nM de putrescina. Después de adicionar la suspensión de levaduras, el alimento fue secado en una estufa a 37°C durante 45 min. La suspensión celular fue almacenada en refrigeración (4°C) después de preparar el alimento para las larvas (cada tres días) y la sobrevivencia de las levaduras durante su almacenamiento fue determinada mediante cuenta viable.

5.11. Cultivo larvario y alimentación de *D. labrax*.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio húmedo de la Unidad Mixta de Nutrición de peces INRA-IFREMER, Centro Brest, Francia.

Las larvas se obtuvieron de la empresa Aquanord, Francia y arribaron a la estación en un estado prelarvario, es decir, sin llevarse a cabo la abertura de la boca (la apertura de ésta se lleva a cabo a los 5 días de la eclosión). Fueron crecidas por 41 días en estanques de fibra de vidrio de 35 L de capacidad a una densidad de 60 organismos L^{-1} . La temperatura osciló entre $18\text{-}19^\circ\text{C}$, la salinidad de 35 g L^{-1} y la intensidad luminosa fue de 9 Wm^{-2} a partir del día 15 de cultivo. Las larvas se cultivaron en agua de mar filtrada en un filtro de arena y pasada por un calentador de tungsteno y degasificada en una columna con anillos de

plástico. Las larvas se alimentaron continuamente *ad libitum* durante 18 h por día con la ayuda de distribuidores automáticos de alimento con bandas (3 g diarios de alimento por réplica). La ingesta del alimento fue verificada por microscopio estereoscópico. Para cada régimen alimenticio y el control, se utilizaron cuatro réplicas. El mantenimiento diario de los tanques consistió en la extracción de las heces y el alimento no consumido por sifoneo.

5.12. Supervivencia y peso de las larvas.

La supervivencia se calculó por el número inicial y final de larvas, multiplicado por 100 para expresarlo en porcentaje. Para el cálculo de la supervivencia se tomaron en cuenta el número de aquellas larvas muestreadas para los ensayos enzimáticos y la extracción del RNA. El peso fue obtenido del muestreo de 30 larvas por estanque, los días 16, 22, 29, 36 y 42 de cultivo.

5.13. Efecto del alimento suplementado con levaduras sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de *D. labrax*.

Durante el crecimiento larvario (día 27) y al final del experimento (día 42), las larvas fueron colectadas por la mañana (8:30) antes de ser alimentadas y puestas a -80°C , hasta su procesamiento. Para los análisis enzimáticos, las larvas fueron disectadas en un vidrio sobre hielo, en 4 segmentos: cabeza, segmento pancreático (PS), segmento intestino (IS) y cola (Fig. 5).

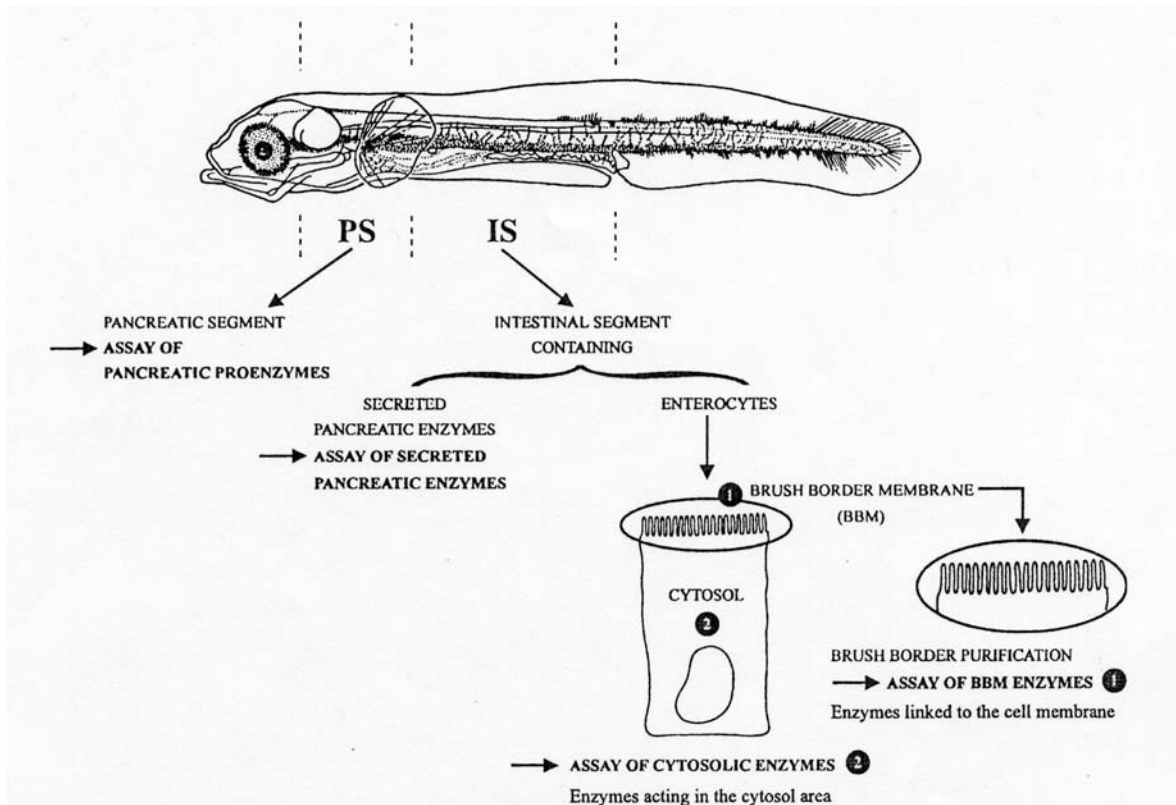


Figura. 5. Diagrama que muestra los segmentos en los que fueron seccionadas las larvas para los análisis enzimáticos y obtención del RNA total (tomado y modificado de Cahu and Zambonino-Infante, 1994). PS: segmento pancreático, IS: segmento intestinal.

Los homogenados se obtuvieron diluyendo los segmentos pancreáticos o intestinales en 5 volúmenes de agua destilada fría, y homogenizados en un aparato POLYTRON PT 2100, durante 30 seg a la máxima intensidad en baño de hielo. Se obtuvo también la actividad enzimática secretada y de las membranas con borde de cepillo mediante los siguientes protocolos:

5.14. Actividad enzimática secretada (AES).

La actividad enzimática detectada en el segmento pancreático, refleja la eficiencia de la síntesis de alguna enzima determinada y su relación con la misma actividad enzimática detectada en el segmento intestinal, obtenemos lo que se conoce como AES:

$$\text{AES} = \frac{I}{(I + P)} \times 100$$

I = actividad enzimática del segmento intestinal
P = actividad enzimática del segmento pancreático

5.15. Obtención de las membranas con borde de cepillo (Crane et al., 1979) modificado por Cahu y Zambonino-Infante (1994).

Una fracción del segmento intestinal (100 mg mínimo) se homogenizó en 30 volúmenes de manitol (50 mM/Tris 2 mM/pH 7) a 4°C; posteriormente se agregó CaCl₂ hasta obtener una concentración final de 10 mM. Después de centrifugar a 9000 x g, durante 10 min a 4°C, se eliminó el sedimento y se centrifugó nuevamente el sobrenadante a 34000 x g durante 20 min a 4°C. Finalmente, el sedimento se homogenizó durante 10-15 seg por ultrasonido en 1 mL de KCl (0.1 M), Dithiotreitol (1 mM) y Tris-HEPES (5 mM) pH 7.5 a 4°C.

De los extractos obtenidos con los diferentes protocolos, se ensayaron las enzimas pancreáticas tripsina (Holm et al., 1988), amilasa (Métais and Bieth, 1968) y lipasa (Iijima et al., 1998). De igual forma, ambas enzimas fueron ensayadas en el intestino para conocer la cantidad secretada. De las membranas con borde de cepillo se ensayaron la enzimas fosfatasa alcalina (PAL) (Bessey et al. 1946), leucino-aminopeptidasa (LAP) (Maroux et al. 1973), maltasa (Dahlqvist, 1970) y la enzima citosólica leucin-alanin-peptidasa (leu-ala) (Nicholson and Kim, 1975). La disminución de la actividad citosólica y los cocientes de la actividad LAP/leu-ala y PAL/leu-ala, nos indican la maduración de los enterocitos, es decir, el paso a una digestión extracelular. La actividad de las diferentes enzimas se refirió como actividad específica (mU/mg de proteína) y la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1974) usando albúmina sérica bovina como estándar. La Tabla III

muestra las condiciones generales del ensayo de las enzimas digestivas, los sustratos utilizados y las unidades en que se expresa la actividad de cada una.

Tabla III. Resumen de las técnicas para el ensayo de actividad enzimática.

Enzima	Temp (°C)	Abs (nm)	Amortiguador	Sustrato	Unidades
Tripsina	25	407	Tris-HCl, 50 mM, pH 8.2. CaCl ₂ 20 mM	Na-Benzoil-DL-Arginin-p-Nitroanilida (BAPNA)	μM de sustrato hidrolizado/min/mL de homogenado
AP	37	407	NaCO ₃ -NaHCO ₃ , 30 mM, pH 9.8	p-Nitrofenil-fosfato (PNPP)	μM de p-Nitrofenol liberados/min/mL de homogenado
Amilasa	37	580	NaH ₂ PO ₄ , M/15, pH 7.4	Almidón	mg de almidón hidrolizado/30 min/mL de homogenado
LAP	37	410	Fosfatos, 80 mM, pH 7.0	Leucino p-nitroanilida 0.1 M en DMSO	μM de sustrato hidrolizado/min/mL de homogenado
Lipasa	30	405	Tris-HCl, 0.25mM, pH 9.0	p-Nitrofenil miristato, 0.53 mM	μM de p-nitrofenol liberado/min/mL de homogenado
Maltasa	37	420	Tris HCl, 50mM, pH 7.0	Maltosa	μM de glucosa liberado/min/ml
Sacarasa	37	420	Tris HCl, 50 mM, pH 7.0	Sacarosa	μM de glucosa liberado/min/ml
Leu-ala	37	530	Tris HCl, 50 mM, pH 8.0	leucina-alanina	nM de sustrato hidrolizado/min/mL de homogenado

5.16. Efecto de dos niveles de inclusión (1.1 y 5.7%) de la cepa CBS 8339 (*D. hansenii*) en el desarrollo del sistema digestivo de larvas de *D. labrax*.

Las larvas de *D. labrax* fueron obtenidas de Aquanord, Francia y las condiciones físicas de cultivo fueron idénticas que el experimento anterior. Se prepararon dietas con dos niveles de inclusión de levadura, 1.1 y 5.7% (peso húmedo), y otra dieta control libre de ellas. Se utilizaron cuatro réplicas para cada tratamiento y las larvas fueron alimentadas hasta el día 38 a partir de la fecha de apertura de la boca (día 5 después de la eclosión).

La sobrevivencia y el peso de las larvas fue obtenido de la misma manera que el experimento anterior tomando el mismo número de organismos los días 13, 20, 27, 34 y 37 de cultivo.

La levadura utilizada en las dietas fue cultivada en un fermentador con 18 litros de medio YPD, a 25°C y aereación constante hasta entrada su fase estacionaria de crecimiento (24 h). La biomasa fue recuperada por centrifugación a 3000 x g y lavada con agua destilada estéril. Los ingredientes de la dieta (Pat. 99-050449, Cahu y Zambonino-Infante, 2001) incluyendo las levaduras (1.1 y 5.7%), fueron mezclados en agua, peletizados y secados a baja temperatura (45°C) durante 20 min. Se obtuvieron también dos tamaños de partículas de alimento, de 120-200 µm y de 200-400 µm.

El número celular de la dieta de 1.1% corresponde a 10⁶ UFC g⁻¹ de alimento y esta biomasa de *D. hansenii* produce 6.74, 19.06 y 7.02 µg de putrescina, espermidina y espermina, respectivamente. A los 30 días después de la eclosión, 5 larvas de cada réplica fueron muestreados y homogenizadas en agua destilada estéril para realizar cuentas microbianas de acuerdo a Gatesoupe, (1995). Las levaduras fueron contadas en medio

sólido YPD adicionado con los antibióticos cloranfenicol (1 mg L^{-1}), polimixina B sulfatada (1.6 mg L^{-1}) y amoxicilina (2.5 mg L^{-1})

5.17. Actividad enzimática digestiva de larvas de *D. labrax*.

Durante el crecimiento larvario (día 26) y al final del experimento (día 36), las larvas fueron colectadas por la mañana (8:30 h) antes de ser alimentadas y puestas a -80°C , hasta su procesamiento. Para los análisis enzimáticos, se utilizaron las mismas enzimas y técnicas antes descritas

5.18. Elaboración de sondas de cDNA para la detección de la lipasa primaria de larvas y adultos de *D. labrax* y sondas para la detección y cuantificación de tripsina, lipasa, GAPDH de *P. maculatofasciatus*.

Antes de proceder a la extracción de RNA total de las larvas, se elaboraron los oligonucleótidos ("primers") mostrados en la (Tabla VIII), seleccionando los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con los mRNA de nuestro interés registrados en los bancos de secuencias con acceso en la siguiente página de internet:

<http://www.infobiogen.fr/services/deambulium/fr/>.

En el día 36, se llevó a cabo la extracción del RNA en larvas recién colectadas (8:30 h) y en ayunas. La disección del segmento pancreático (aproximadamente 150 mg para el día 26 y 250 mg para el día 36) se llevó a cabo sobre un vidrio enfriado con hielo. Se utilizó el protocolo de extracción que acompaña al reactivo de TRIZOL[®] (GIBCO Life Sciences). En una segunda ocasión, se extrajo el RNA total de organismos adultos de *D. labrax*, para la obtención de las sondas de cDNA.

Una vez extraído el RNA se cuantificó y se determinó su pureza utilizando un espectrofotómetro de doble haz marca Milton Roy (Spectronic 1201), y de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{RNA total } (\mu\text{g/mL}) = \text{DO}_{260\text{nm}} * 40 * 1/\text{dilución}$$

El RNA así obtenido, se almacenó en alícuotas de 15 μg a -80°C hasta su uso para la transcripción reversa. Del RNA total se tomaron 5 μg para ser transcritos a cDNA utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) de acuerdo a las instrucciones del kit READY TO GO (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). El cDNA así obtenido corresponde al RNAm de la región pancreática. La amplificación del cDNA se llevó a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo en 50 μL conteniendo 0.1 μg del cDNA, 2.5 U de taq polimerasa (Appligene), 100 μM de dNTP's, 50 pmoles de cada primer, 1X del amortiguador de la reacción (Amersham) y agua destilada estéril. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador ROBOCYCLER[®] Gradient 96 (Stratagene), bajo los siguientes parámetros (Tabla IV):

Tabla IV. Amplificación de los fragmentos seleccionados.

Desnaturalización inicial del cDNA	94°C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización del cDNA formado	94°C	1 min	30 ciclos
Hibridación de los primers	variable *	1 min 1/2	30 ciclos
Elongación del cDNA formado	72°C	2 min	30 ciclos
Elongación final	72°C	7 min	1 ciclo

* La temperatura de hibridación depende de las proporción de G/C que contienen los primers elaborados.

Una vez terminada la PCR, los productos de amplificación fueron separados por electroforesis sobre agarosa al 1.2% y después analizados en un fluorómetro FluoroScan

Multimager de BIO-RAD. La visualización se llevó a cabo mediante la adición de bromuro de etidio en razón de 4 μ L/ 50 mL de amortiguador TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

Posteriormente, se procedió a la purificación de los productos de PCR, cortando las bandas de nuestro interés con un bisturí estéril en un transiluminador. La recuperación y purificación del DNA se obtuvo con el protocolo del kit GENE CLEAN[®] SPIN Kit (BIO 101 INC). Finalmente, los productos de PCR fueron clonados de acuerdo al kit TOPO TA CLONING[®] (Invitrogene) utilizando células competentes de *E. coli* TOP 10F' y al plásmido pCR[®] 2.1-TOPO[®] como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC) para secuenciarse y realizar el análisis de sus homologías.

Para el caso de la cabrilla, se emplearon aquellos primers que dieron resultados con la lubina Europea. El RNA total se obtuvo del hepatopancreas de un ejemplar adulto y los subsecuentes pasos de transcripción reversa, amplificación, purificación, clonación y obtención de plásmidos se llevaron a cabo con las mismas técnicas arriba descritas para la lubina Europea.

5.19. Cuantificación de los mRNA de las enzimas tripsina, lipasa, amilasa y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por RT-PCR de la lubina Europea alimentada con 1.1% y 5.7 de la cepa CBS 8339 (*D. hansenii*).

Para cuantificar los mensajeros de cada enzima, fue necesario realizar curvas de referencia, es decir, amplificar concentraciones conocidas del fragmento correspondiente de cada enzima, purificado con el kit GENE CLEAN[®] SPIN, durante 30 ciclos bajo las condiciones descritas en la Tabla IV. La visualización de los fragmentos se logró mediante su tinción con bromuro de etidio durante la electroforesis en agarosa 3% y la documentación de las

imágenes se efectuó en un aparato Fluor S-Multimager System (BIO-RAD). De la amplificación de los fragmentos, resultan curvas de tipo logarítmico al graficar concentración del cDNA inicial contra la cantidad de DNA producido después de su amplificación. Estas gráficas nos muestran que existe una fase donde los productos de amplificación se acumulan de forma exponencial y también otra fase de plató (saturación de productos) donde existen factores que inhiben su acumulación (perdida de la eficiencia catalítica de la Taq polimerasa, la degradación de los nucleótidos y primers, la reasociación inespecífica de fragmentos producidos, etc). La densidad de las bandas se obtiene por medio del software Scion Image (<http://www.scioncorp.com/>) y la cuantificación del mRNA presente en la muestra se obtiene por la relación mRNA de cualquier enzima/mRNA GAPDH. La GAPDH es considerado estándar interno ya que se ha comprobado que la normalización de los valores obtenidos de las muestras relacionados con los de esta enzima, provee una amplio sentido de comparación en la expresión de genes (Sölch and Arnold, 1996). Para la cuantificación de los mensajeros de cada muestra, solo se consideran aquellos valores obtenidos del producto de amplificación que estén dentro de la fase logarítmica de la curva de calibración.

VI. RESULTADOS

6. 1. Cinéticas de crecimiento de levaduras.

Las levaduras fueron crecidas hasta entrada su fase estacionaria para realizar las mediciones de poliaminas. El crecimiento es expresado en unidades de densidad óptica, a excepción de *C. albicans* donde se expresa en mg de biomasa.

Figura 6. Las cinéticas de crecimiento de las levaduras muestran la entrada de la fase estacionaria, en la cual fué evaluada la producción de poliaminas.

6.2. Producción de poliaminas.

La extracción y detección de poliaminas se realizó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de las levaduras. En la mayoría de las cepas evaluadas se detectaron las poliaminas Put, Spd y Sp pero en diferente proporción. La mayor cantidad de poliaminas fueron detectadas en el medio de cultivo libre de células lo que indica una secreción de éstas por parte de las levaduras (Tabla V y VI). Las concentraciones mas altas se detectaron con las cepas 7835, CBS 8339 y X2180.

Tabla V. Poliaminas detectadas en el medio de cultivo libre de células.

Levadura	Put $\mu\text{g/mL}$	Spd $\mu\text{g/mL}$	Sp $\mu\text{g/mL}$
<i>R. glutinis</i>	0,15	14,00	1,85
<i>S. cerevisiae</i> 7764	0,45	3,10	1,85
Cepa 7835	2,54	12,38	Nd
<i>D. hansenii</i> J26	1,20	15,48	Nd
<i>S. cerevisiae</i> 7765	2,24	13,62	Nd
<i>D. hansenii</i> CBS 8339	0,90	14,86	Nd
<i>S. cerevisiae</i>	0,90	5,57	Nd
<i>S. cerevisiae</i> X2180	1,20	8,67	2,97
Cepa AY1	nd	7,43	1,48
<i>C. albicans</i>	nd	Nd	1,48

Tabla VI. Poliaminas detectadas en el homogenado celular.

Levadura	Put $\mu\text{g/mL}$	Spd $\mu\text{g/mL}$	Sp $\mu\text{g/mL}$
<i>R. glutinis</i>	1,34	nd	nd
<i>S. cerevisiae</i> 7764	1,94	nd	nd
Cepa 7835	nd	nd	nd
<i>D. hansenii</i> J26	2,09	nd	nd
<i>S. cerevisiae</i> 7765	nd	nd	0,37
<i>D. hansenii</i> CBS 8339	2,24	nd	nd
<i>S. cerevisiae</i>	nd	nd	nd
<i>S. cerevisiae</i> X2180	3,29	nd	nd
Cepa AY1	nd	nd	nd
<i>C. albicans</i>	1,64	nd	nd

En un segundo experimento utilizando 1,3-diaminopropano como estándar interno, se detectaron las mismas poliaminas pero las mayores cantidades (tres veces mas) fueron observadas en el medio libre de células con la cepa CBS 8339 en relación a la cepa X2180. En cuanto al extracto celular, se observó un poco mas del doble de Spd y seis veces mas Put con la cepa CBS 8339 que en la X2180 (Tabla VII).

Tabla VII. Concentración de poliaminas (nM mL^{-1}) en el homogenado celular (H) y en el medio de cultivo libre de células (FC).

Cepa	Put		Spd		Sp	
	H	FC	H	FC	H	FC
<i>D. hansenii</i> CBS 8339	6.13	6.22	17.33	31.54	6.38	38.67
<i>S. cerevisiae</i> X2180	1.12	2.11	6.84	10.84	5.25	13.40

6.3. Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de *D. labrax* y la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

Las levaduras que permanecieron adheridas en el intestino después de tres lavados y que mejor adherencia mostraron por microscopía al mucus intestinal de *D. labrax* fueron *D. hansenii* CBS 8339, y *S. cerevisiae* X2180. La cepa YL12 fue utilizada como control de adherencia pues ya se ha demostrado su afinidad al mucus intestinal de peces (Gatesoupe, com. pers.) (Fig. 7).

Los resultados de adhesión fueron confirmados al recuperar estas levaduras en larvas de lubina cuando estas fueron incluidas en su alimento (ver mas adelante). De acuerdo a estos resultados y a la producción de poliaminas, se seleccionaron las cepas CBS 8339 y X2180

para incluirlas en el alimento y conocer el efecto en el desarrollo del tracto digestivo de larvas recién eclosionadas de *D. labrax*.

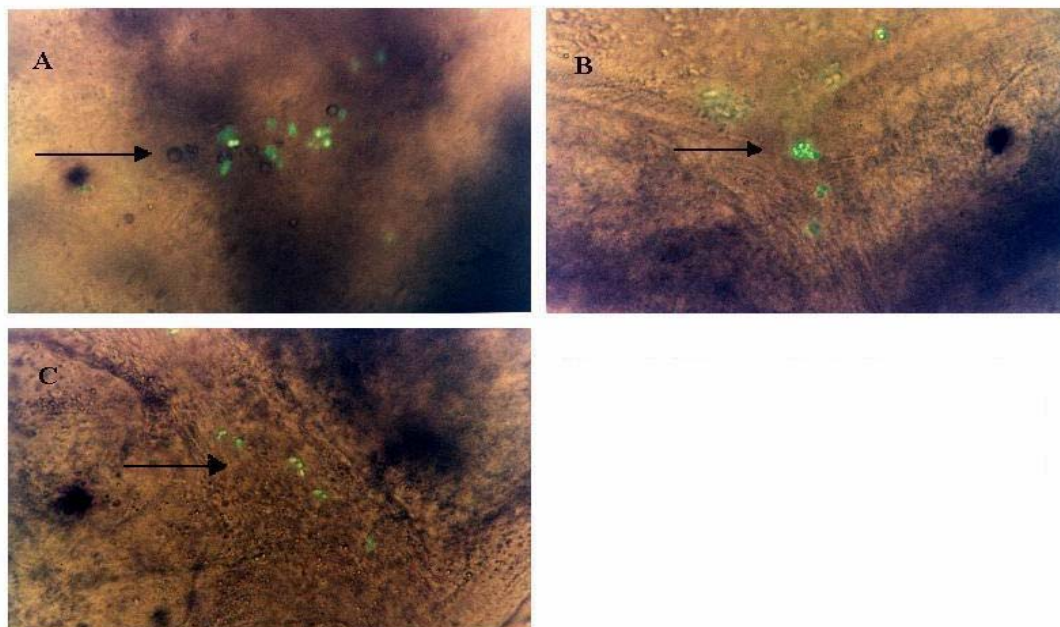


Figura 7. Micrografía de fluorescencia en donde las flechas muestran a las cepas A) *D. hansenii* (CBS 8339), B) *S. cerevisiae* (YL12) y 3) *S. cerevisiae* (X2180) adheridas al intestino de larvas de la lubina Europea *D. labrax* (40 X).

Al igual que en la lubina Europea, las cepas CBS 8339 y X2180 mostraron mayor capacidad de adhesión al intestino de juveniles de la cabrilla arenera como se ve en la Fig. 8 y confirmado mediante análisis de imágenes (Tabla VIII).

Tabla VIII. Cantidad y área intestinal ocupada por las levaduras adheridas.

Levadura	Cantidad	μm^{-2}
1. <i>S. cerevisiae</i> CBS 7764	8	328
2. <i>D. hansenii</i> J26	149	6121
3. <i>S. cerevisiae</i> CBS 7765	58	1869
4. <i>D. hansenii</i> CBS 8339	557	18391
5. <i>S. cerevisiae</i>	154	4453
6. <i>S. cerevisiae</i> X2180	247	7416
7. AY1	34	1137

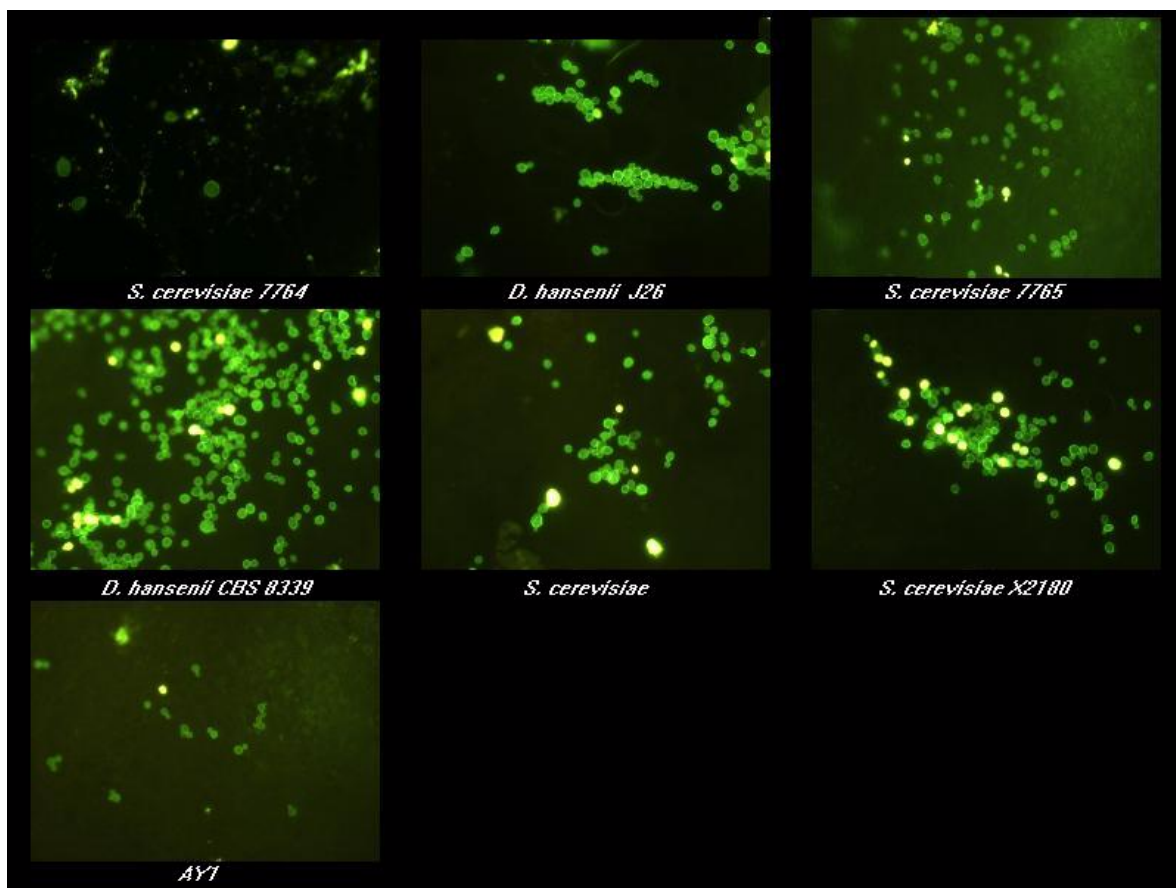


Figura 8. Micrografía de fluorescencia que muestra las levaduras marcadas con DTAF y que están adheridas al intestino de juveniles de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* (40 X).

La cantidad de levaduras adheridas al intestino de larvas de la cabrilla arenera, no pudo ser cuantificada por el analizador de imagenes, debido a interferencias por partículas fluorescentes, como se muestra en la Fig. 9.

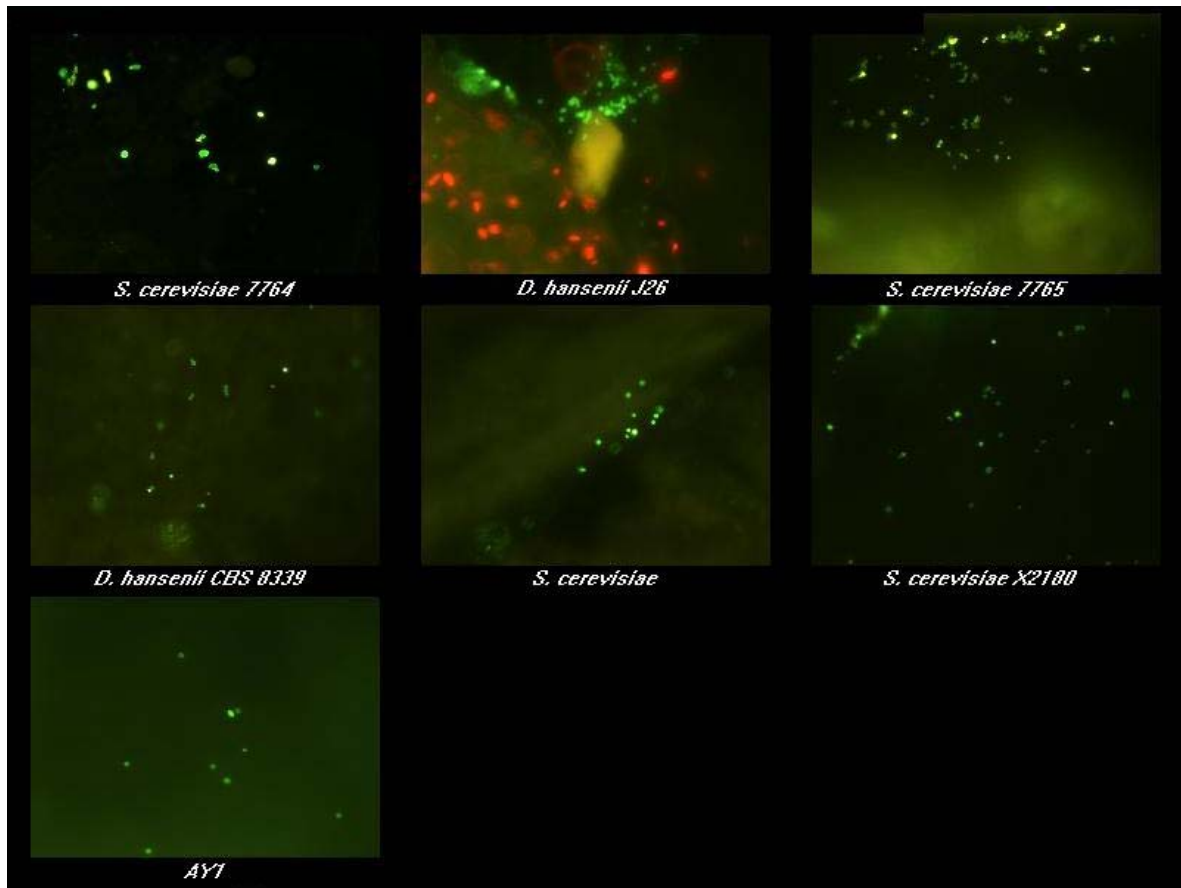


Figura 9. Micrografía de fluorescencia que muestra las levaduras marcadas con DTAF y que están adheridas al intestino de larvas de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus* (40 X).

6.4. Elaboración de una sonda de cDNA para la detección de la lipasa de la lubina Europea *D. labrax*.

Se elaboraron los primers específicos en base a las secuencias registradas del Zebrafish *Danio rerio* (No. AW018709, que es un cDNA 5' similar al precursor de la triacilglicérido lipasa) y a la del ratón doméstico *Mus musculus* (No. X58426, que es un RNA para una triacilglicérido lipasa hepática).

Tabla IX. Primers diseñados para la lipasa.

HL dir1	5'	tgtggcttcaacagc
HL dir2	"	agatcatcca(ct)ggg
HL dir3	"	gggtggctcgctagat
HL rev1	"	cgctccaagrctgta
HL rev2	"	grctgtaccaatca

r = a ó g

Se ensayaron 4 ó 5 temperaturas diferentes para cada primer con la finalidad de conocer la mejor respuesta de amplificación de acuerdo a las temperaturas proporcionadas por el fabricante; además, se realizaron ensayos cruzados con los mismos para obtener mayores posibilidades de éxito:

Combinaciones	No. bases esperadas	Temperaturas probadas °C
dir1-rev1	291	46, 48, 50, 52
dir1-rev2	283	44, 46, 48, 50
dir2-rev1	260	44, 46, 48, 50
dir2-rev2	252	44, 46, 48, 50
dir3-rev1	234	48, 50, 52, 54
dir3-rev2	260	44, 46, 48, 50, 52

De las 6 combinaciones de primers, solamente dieron respuesta positiva el dir1-rev1 (D1R1) y dir3-rev2 (D3R2). Una vez establecida la temperatura óptima (52°C) de amplificación, se realizó una PCR preparativa para purificar el DNA. Así, se obtuvieron dos bandas en el intervalo del peso molecular calculado. Una vez obtenido el DNA por la técnica del kit GENE CLEAN, se procedió nuevamente a su amplificación para verificar su pureza. Posteriormente se procedió a hacer el clonaje de los fragmentos en células competentes de *E. coli* TOP10F' usando el plásmido pCR[®] 2.1-TOPO[®] como vector. Posteriormente, se amplificaron por PCR las colonias positivas transformadas para verificar que el inserto clonado correspondía al nuestro, utilizando los primers M13 del vector.

Después de verificar el tamaño del producto, se procedió a hacer un cultivo masivo de las colonias positivas de *E. coli* para obtener los plásmidos que contenían insertado nuestro fragmento por medio del kit RPM (BIO 101 INC). Una vez obtenido el DNA plasmídico (Fig. 6), las preparaciones se enviaron a secuenciar para conocer su homología con las de los bancos de genes.

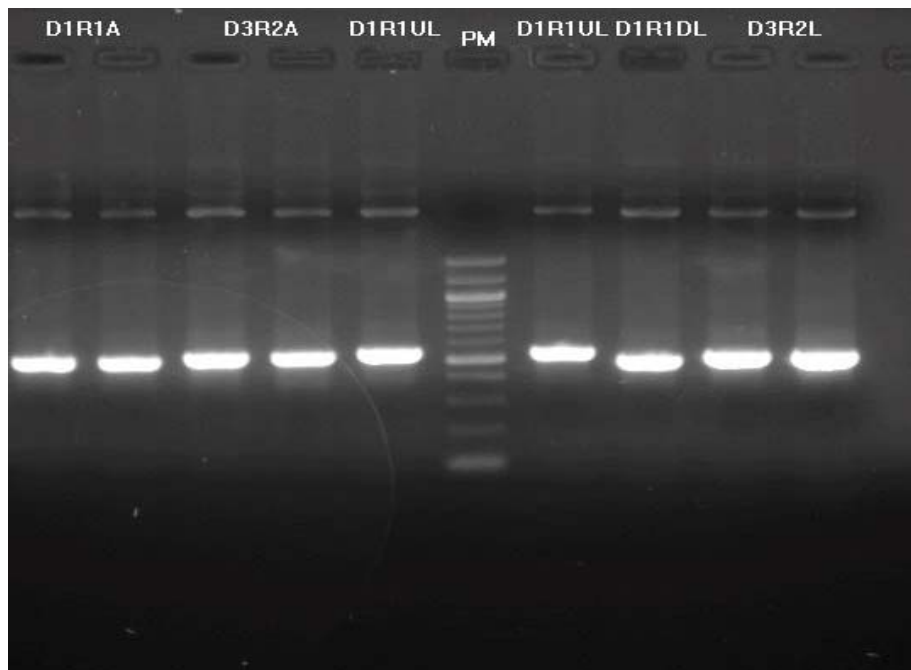


Figura 10. Electroforésis de agarosa que muestra los productos de amplificación del DNA puro (por miniprep) usando los primers M13 del vector pCR[®] 2.1-TOPO[®].

Del resultado de la secuenciación del DNA correspondiente a la combinación D1R1DL, se obtuvo un fragmento de 288 pb (Anexo I) reportado como una triacilglicérido lipasa (EC 3.1.1.) con una homología del 85% en 97 par de bases, a la secuencia de la lipasa hepática del ratón doméstico (*Mus musculus*) (X58426) (Chang et al., 1991). Esta secuencia fue registrada con la clave de acceso AJ275976 del Laboratorio Europeo de Biología molecular (EMBL).

También se lograron obtener las sondas de cDNA que codifican para tripsina AJ344566 (535 pb), GAPDH AJ344567 (421 pb) y triacilglicérido lipasa AJ418039 (288 pb) de la cabrilla (*P. maculatofasciatus*), utilizando los mismos oligos de la lubina.

V. Obtención de las sondas de cDNA de las enzimas digestivas tripsina, lipasa y GAPDH de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

Los primers elaborados para detectar las enzimas lipasa, tripsina, amilasa y GAPDH de la lubina, fueron usados para la cabrilla. Las amplificaciones a partir de cDNA de la cabrilla, se llevaron a cabo bajo el mismo esquema de la Tabla IV, y las correspondientes temperaturas de alineamiento para cada primer: tripsina (60°C), GAPDH (50°C) y triacilglicérido lipasa (52°C).

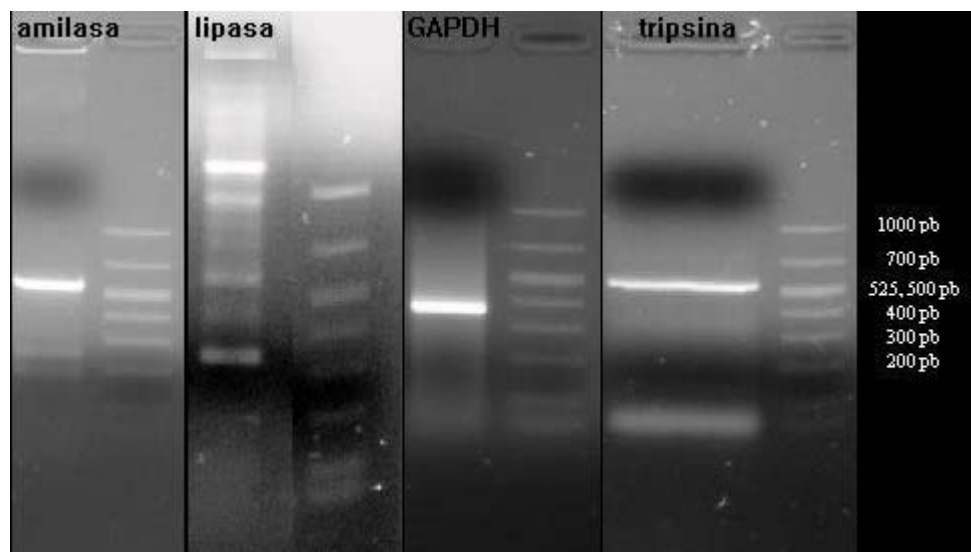


Figura 11. Gel de agarosa que muestra los fragmentos amplificados correspondientes a las enzimas amilasa (564 pb), lipasa (288 pb), GAPDH (366 pb) y tripsina (535 pb) de *P. maculatofasciatus*.

De los fragmentos secuenciados solamente tres de ellos, excepto la amilasa, resultaron con un alto grado de homología a los encontrados en los bancos de genes.

6.5. Efecto de las dietas DH y SC sobre el crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática digestiva de las larvas de *D. labrax*.

Al día 42 de crecimiento la sobrevivencia fue mayor ($44 \pm 2.1\%$) en aquellas larvas alimentadas con la dieta DH, comparado con el grupo control y las alimentadas con la dieta SC ($36 \pm 3.9\%$ y $35 \pm 1.6\%$, respectivamente). La menor incidencia de larvas con espina dorsal deforme (existen diversas causas que originan deformidades de la columna vertebral en larvas de peces, pero entre las más frecuentes son la malnutrición) se observó también en el grupo alimentado con la dieta DH ($0.9 \pm 0.7\%$) comparado con el control y la dieta SC ($5.9 \pm 1.34\%$ y $4.1 \pm 1.22\%$, respectivamente).

En la dieta control no fueron detectadas levaduras durante el experimento y la presencia de bacterias de género *Vibrio* en el intestino de las larvas fué menor de 100 UFC por cada tratamiento, lo que no resulta significativo para nuestros resultados de producción de poliaminas. La variación del número de levaduras viables utilizadas en la elaboración del alimento para las larvas no varió significativamente ($p > 0.05$) durante su almacenamiento en refrigeración.

Pese a los resultados anteriores, el peso promedio de las larvas alimentadas con las dietas con levaduras, fue menor que con la dieta control (Fig. 12).

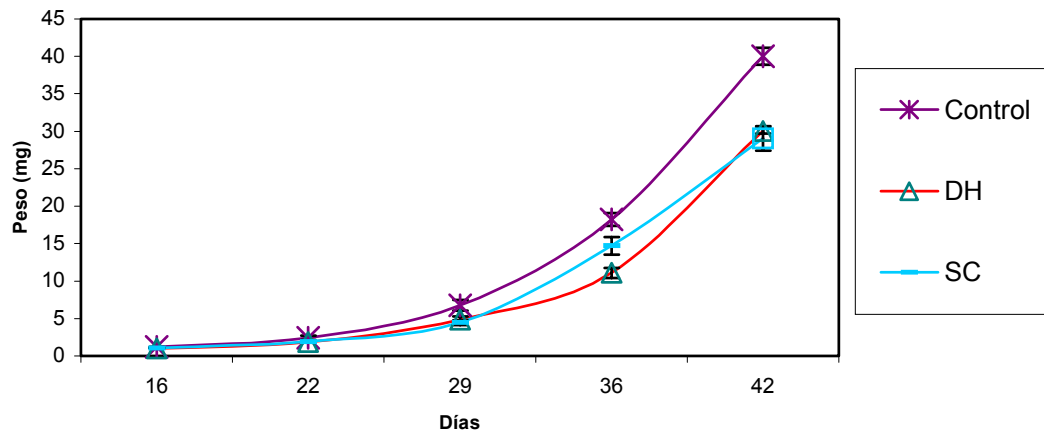


Figura 12. Curva de crecimiento de larvas de la lubina Europea alimentadas con las dietas DH, SC y dieta control, libre de levaduras.

La actividad tripsina secretada en el día 27 por las larvas alimentadas con la dieta DH es igual que las alimentadas con la dieta control y menor con aquellas alimentadas con la dieta SC. El mismo patrón se observa para el término del experimento (Fig. 12).

La actividad amilasa secretada por las larvas con la dieta DH en el día 27, es mayor que los otros dos grupos experimentales; pero al término del experimento, los tres grupos se mantienen en los mismos niveles de secreción (Fig. 13).

La actividad de las enzimas del borde de cepillo (fosfatasa alcalina, aminopeptidasa y maltasa) se vió incrementada significativamente en el día 27 con aquellas larvas alimentadas con la dieta DH (Fig. 14).

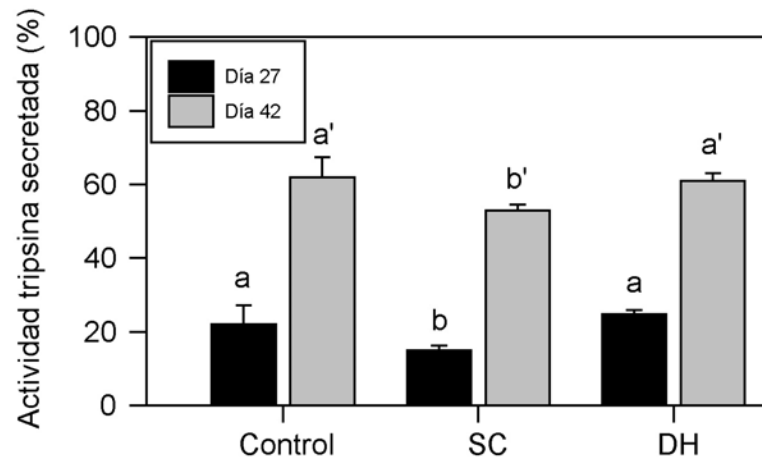


Figura 13. Actividad tripsina secretada en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

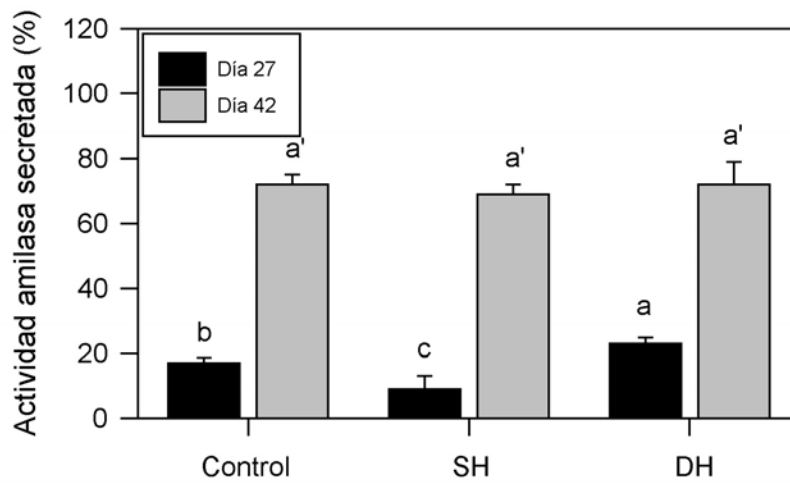


Figura 14. Actividad amilasa secretada por larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

Figura 15. Cocientes de la actividad de las enzimas de las células con borde de cepillo y la enzima citoplásmica leu-ala de larvas alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control. A, día 27 y B, día 42 después de la eclosión.

6.6. Efecto de dos niveles de inclusión (1.1 y 5.7%) de la cepa CBS 8339 sobre el desarrollo del sistema digestivo de larvas de *D. labrax*.

A los 30 días de crecimiento, fueron recuperadas 9.6×10^3 UFC en larvas alimentadas con 1.1% de inclusión de la cepa CBS 8339 lo que demuestra el grado de colonización de estas levaduras. En larvas alimentadas con la dieta control, no se detectó ninguna levadura.

El crecimiento medido en peso húmedo de las larvas de lubina alimentadas con 1.1% de inclusión de la cepa CBS 8339, se vio aumentado casi al doble del obtenido con 5.7% y el control (Fig 16).

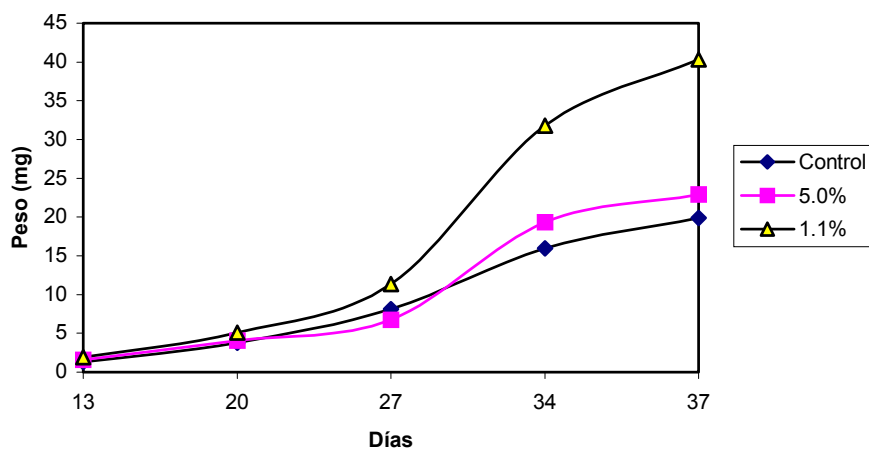


Figura 15. Crecimiento de larvas de la lubina Europea alimentada con dos niveles de inclusión de la cepa CBS 8339.

La sobrevivencia y generación de larvas deformes fue afectada significativamente por aquellas larvas alimentadas con el nivel de 1.1% de inclusión de la cepa CBS 8339 (Tabla X).

Tabla X. Sobrevivencia final del las larvas alimentadas con 1.1 y 5.7% de levaduras.

	Sobrevivencia (%)	Larvas deformes (%)*
Control	42.4 ± 0.79 ^a	13.6 ± 5.53 ^a
5.7% de levadura	45.8 ± 0.30 ^b	6.5 ± 2.81 ^a
1.1% de levadura	46.3 ± 0.82 ^b	1.1 ± 1.63 ^b

Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05).

La dieta elaborada con el nivel de 1.1% de levadura también produjo cambios importantes en la actividad enzimática digestiva en las larvas. Para el día 26, la actividad enzimática secretada del hepatopáncreas muestra un incremento para tripsina (Fig. 16) y amilasa (Fig. 17) con el uso de levaduras; también el mismo patrón para la actividad específica de la lipasa es observado con el uso de levaduras en la dieta.

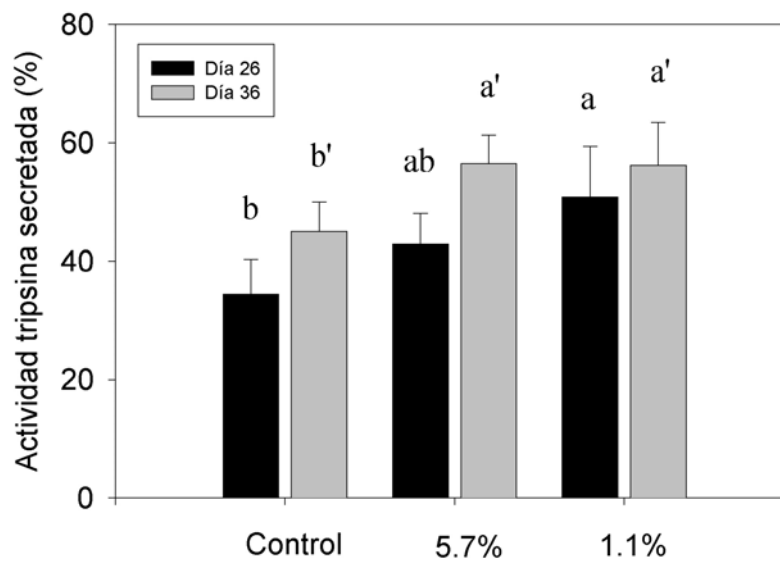


Figura 17. Actividad tripsina secretada de las larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

La actividad específica de la lipasa se incrementó también en las larvas alimentadas con levadura en relación al control ($P < 0.05$) (Fig. 18).

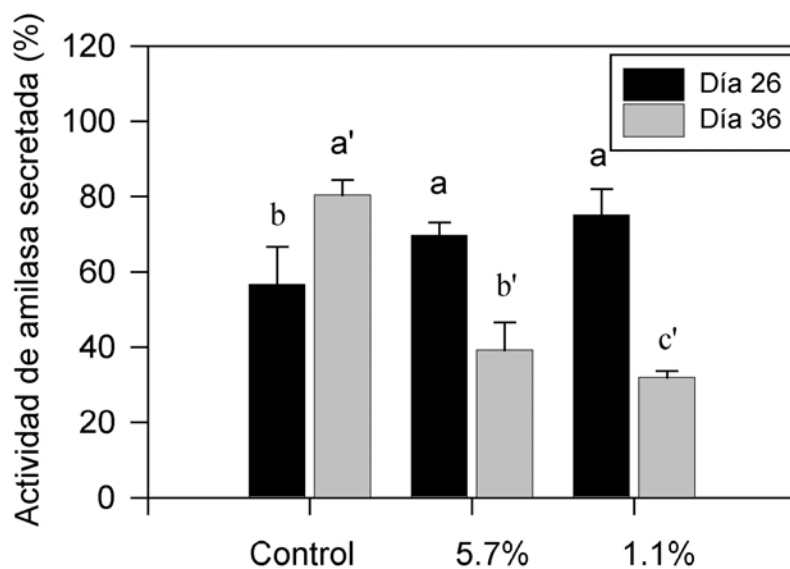


Figura 18. Actividad amilasa secretada de las larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

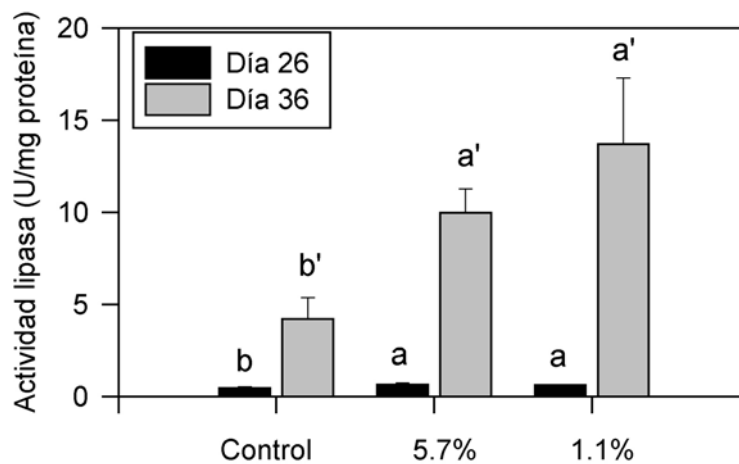


Figura 19. Actividad específica de la lipasa en larvas alimentadas con levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

La actividad de las enzimas del borde de cepillo, se incrementó en las larvas alimentadas con el nivel de 1.1% de levadura. En la Fig. 19, se observa este incremento significativo en la actividad aminopeptidasa, maltasa y fosfatasa alcalina en larvas alimentadas con 1.1% de levadura.

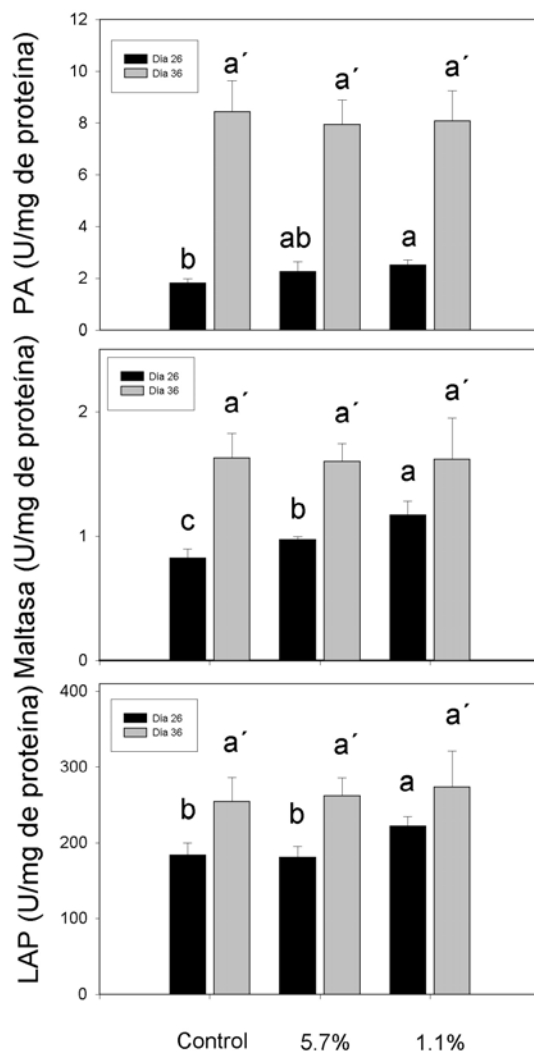


Figura 19. Actividad de las enzimas de las células con borde de cepillo de larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

Para poder cuantificar los niveles de mRNA, fue necesaria la realización de curvas tipo (curvas de calibración) de cada uno de los fragmentos codificantes para lipasa, amilasa, tripsina y GAPDH (Figs. 20, 21, 22 y 23).

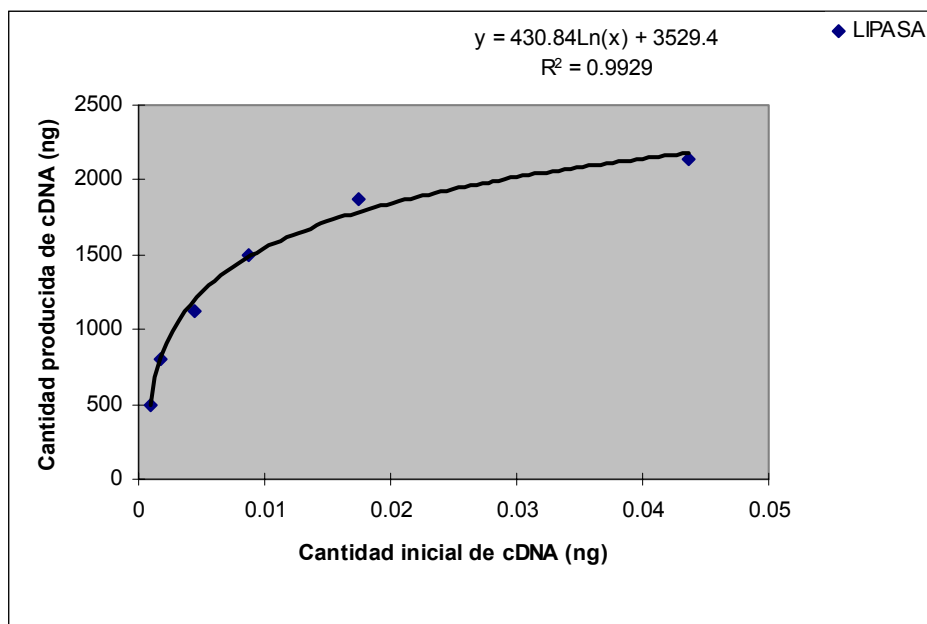


Figura 20. Curva de calibración para la lipasa.

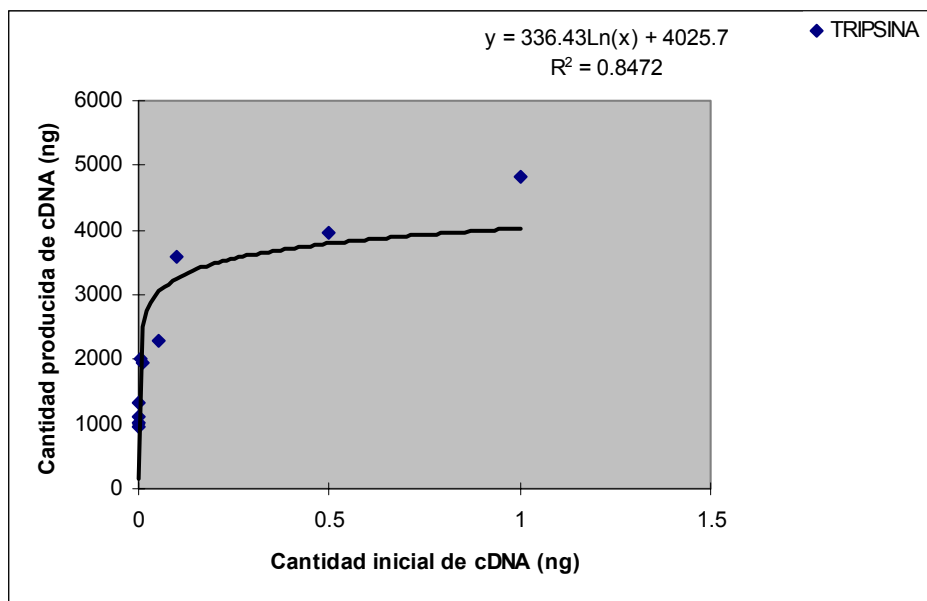


Figura 21. Curva de calibración para la tripsina.

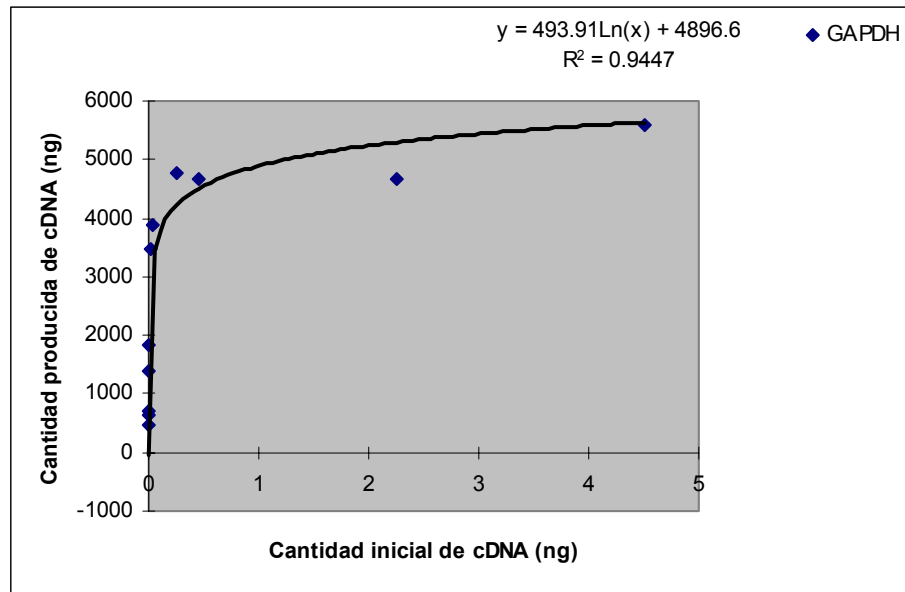


Figura 22. Curva de calibración para la GAPDH.

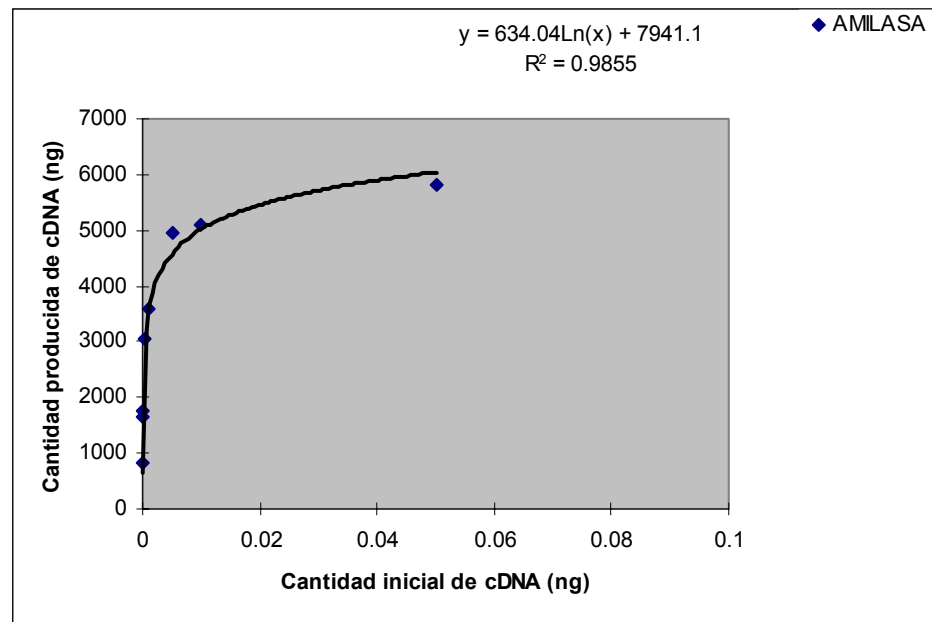


Figura 23. Curva de calibración para la amilasa.

Los niveles de mRNA de amilasa fueron similares en los tres grupos experimentales durante el día 26 de crecimiento. En el día 36 después de la eclosión, se presenta un decremento más pronunciado en aquellas larvas alimentadas con 1.1% de levadura, siendo este el patrón típico de la expresión de los genes que codifican esta enzima (Fig. 24).

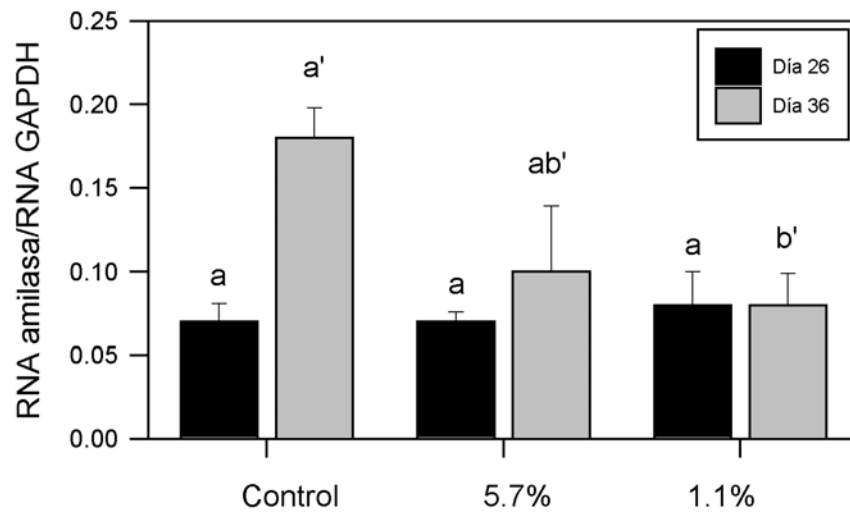


Figura 24. Niveles de mRNA de amilasa en larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

Para el caso de la lipasa, no se observa diferencia significativa para los tres tratamientos y para ambos días de muestreo (Fig. 25).

Los niveles de mRNA para tripsina no presentaron diferencia significativa entre los tres grupos experimentales para el día 26; sin embargo, para el día 42 fueron más altos en los grupos de larvas alimentados con levaduras.

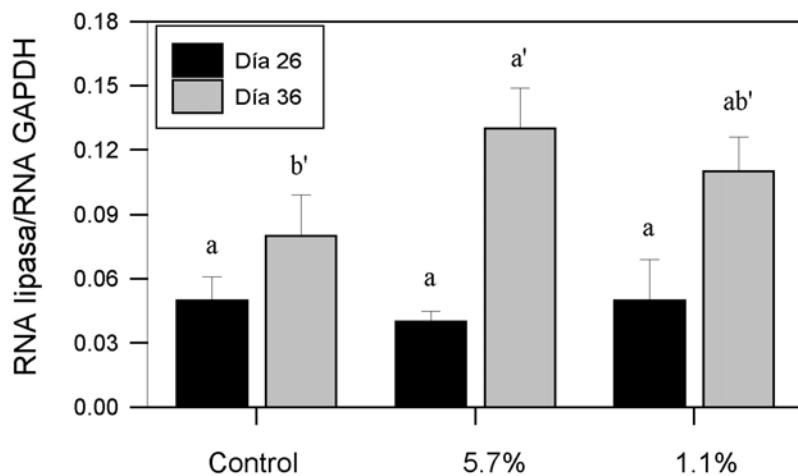


Figura 25. Niveles de mRNA de lipasa en larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control.

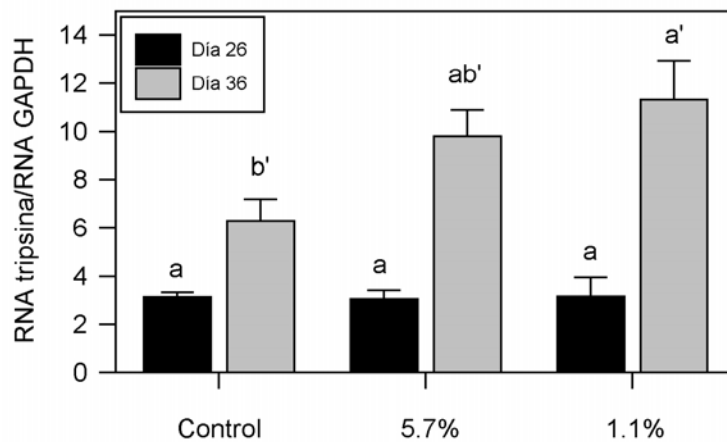


Figura 26. Niveles de mRNA de tripsina para larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

VII. DISCUSIÓN.

De acuerdo a nuestros resultados, podemos decir que la hipótesis de trabajo que planteamos fue acertada, ya que pudimos observar un efecto positivo por la administración de levaduras, seleccionadas por su capacidad de secretar poliaminas y por su capacidad de adhesión al intestino del pez, en la maduración del sistema digestivo de larvas de la lubina Europea. Esta maduración estuvo referida en el incremento de la capacidad digestiva de la larva en relación al control, y que al final del experimento se tradujo en la obtención de larvas con mayor peso, un aumento en la sobrevivencia y disminución de larvas deformes.

Detección y cuantificación de poliaminas en las levaduras.

La técnicas de extracción, marcaje y detección por HPLC resultaron muy sensibles y confiables para la cuantificación de las poliaminas producidas por las levaduras. El uso del estándar interno, 3,5-diaminopropano, para la detección y cuantificación de poliaminas por HPLC, es recomendable ya que nos proporciona información acerca de la reproducibilidad del experimento y una cuantificación mas confiable. Aunado a esta observación, el uso de una columna de menor tamaño de partícula y mayor longitud, favoreció la resolución y detección de poliaminas de las levaduras (Tabla VII), a pesar de manejar las mismas condiciones de separación (gradiente de elución, solventes, flujo, tiempo y temperatura) que manejamos en el primer intento (Tablas V y VI).

La mayor proporción de poliaminas que son detectadas en el medio de cultivo de las levaduras, con respecto al homogenado celular, sugiere que existe secreción activa al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de las levaduras. Contrariamente a nuestros

resultados, Buts et al., (1994) reportan que no existen evidencias de la secreción de espermina y espermidina en *S. boulardii*, pero a las 96 h del crecimiento de esta levadura, observan la presencia de putrescina en el medio de cultivo. Recientemente, Igarashi y Kashiwagi (1999) reportan los mecanismos moleculares que participan en el transporte de poliaminas a través de la pared celular de bacterias y levaduras, además de estar tratando de aislar el (los) gene(s) que codifican para la proteína transportadora de poliaminas TPO1 (transporter for polyamine 1) de *S. cerevisiae*. Ellos mismos argumentan que si las poliaminas son acumuladas por la célula, especialmente la espermina, resultan tóxicas para su crecimiento (Igarashi and Kashiwagi, 1999).

En reportes previos se indica que *S. boulardii* ha sido utilizada para inducir la maduración del tracto digestivo en animales (Buts et al., 1994), mientras que *S. cerevisiae* ha sido estudiada por su capacidad de producción de poliaminas (Tabor y Tabor, 1985).

Los resultados de este trabajo demuestran que *D. hansenii* cepa CBS 8339, posee mayor capacidad de síntesis de poliaminas, si las comparamos con aquellas reportadas por estos autores como lo muestra la Tabla X.

Tabla XI. Producción de poliaminas por tres diferentes especies. La primera y última han sido utilizadas como inductoras de la maduración del tracto digestivo en la rata y en larvas de pez, respectivamente.

Levadura	Put ($\mu\text{mol/g}$)	Spd ($\mu\text{mol/g}$)	Sp ($\mu\text{mol/g}$)
<i>S. boulardii</i> ^a	0.095	3.76	2.93
<i>S. cerevisiae</i> ^b	0.45	2.0	0.3
<i>D. hansenii</i> , CBS 8339 ^c	6.12	17.32	6.38

^a Buts et al., 1994.

^b Tabor y Tabor, 1985.

^c Este trabajo.

Adhesión de las levaduras al intestino

De acuerdo a nuestros resultados *in vitro*, podemos observar que la mejor adhesión al intestino de la lubina, se llevó a cabo con la levadura *D. hansenii* (CBS 8339), seguido de *S. cerevisiae* (YL12), utilizada como control por su capacidad de adhesión (Gatesoupe, com personal) y de *S. cerevisiae* (X2180). La capacidad de adhesión *in vitro* se infirió por la persistencia de las levaduras en el tejido después de ser lavadas tres veces, confirmada por microscopía de fluorescencia y cuantificada por medio del software Image Pro Plus, para el caso de los juveniles de la cabrilla (Tabla VIII). A los 41 días de haber iniciado el cultivo larvario de la lubina, se detectaron 2.5×10^2 y 1.5×10^2 UFC en el intestino de larvas alimentadas con las cepas CBS 8339 y X2180 respectivamente, lo que confirma la capacidad de adhesión *in vivo*. De igual forma, para el día 30 de crecimiento en larvas alimentadas con dos niveles de la levadura CBS 8339, fueron recuperadas la cantidad de $1.1 (\pm 0.2) \times 10^4$ CFU y $6.9 (\pm 0.3) \times 10^4$ CFU en 5 larvas alimentadas con 1.1% y 5.7% respectivamente. Ningún tipo de levadura fue detectado en la dieta control.

Resultados previos (Vázquez-Juárez et al., 1997; Andlid et al., 1995) han demostrado que la cepa CBS 8339 tiene una gran afinidad a la mucosa intestinal de la trucha arco iris, lo que sugiere que el intestino es un importante lugar para el crecimiento y proliferación celular, aunado a que la mucosa gástrica es una rica fuente de nutrientes para estos microbios (Andlid et al., 1995), lo que favorece al aumento en el número de levaduras con el subsecuente incremento de poliaminas aportadas por éstas para el hospedero. Con nuestros resultados, podemos señalar que la adhesión es uno de los factores mas importantes que participan en la colonización del tracto digestivo, y que ha sido parcialmente explicada en terminos de adhesión específica, como por interacciones hidrofóbicas de la superficie celular (Vázquez-Juárez et al., 1997). Para futuras

investigaciones, sería importante conocer los factores específicos y no específicos que *D. hansenii* (CBS 8339) utiliza para su establecimiento y colonización de la mucosa intestinal de la lubina Europea y de la cabrilla arenera, con la finalidad de incrementar esta afinidad y lograr así una mejor invasión y subsecuente colonización. Previamente, se ha reportado que la cabrilla arenera es susceptible a la invasión de bacterias del género *Aeromonas* y *Vibrio* cuando es cultivada bajo condiciones de alta densidad (Cadena-Roa y Roldan, 1995) por lo que sería de gran interés conocer el efecto de la cepa CBS 8339 en la exclusión competitiva de estas especies potencialmente nocivas para el humano.

Efecto de la incorporación de las levaduras D. hansenii 8339 y S. cerevisiae X2180 en la dieta para larvas de D. labrax.

La producción de poliaminas y la capacidad de adherencia fueron factores importantes para seleccionar a las cepas 8339 y X2180, e incorporarlas a las dieta de larvas de la lubina Europea. A pesar de que se obtuvieron mayores porcentajes de sobrevivencia y disminución de la incidencia de larvas deformes en los grupos alimentadas con la cepa CBS 8339 (dieta DH), se obtuvo un bajo peso promedio de las larvas alimentadas con levaduras (Fig. 11) que debió ocurrir dada la baja ingesta del alimento ocasionado por su rápida sedimentación en los estanques. La disminución de la flotabilidad del alimento ocasionó su sedimentación, producto del cambio de textura de éste al ser humedecido, cuando se adicionó la suspensión celular, y después secado con la estufa.

Otro efecto de la adición de la cepa CBS 8339 en la dieta para larvas, es la modulación de la actividad enzimática digestiva en los primeros 27 días del desarrollo larvario de la lubina: la secreción de la amilasa en el día 27 se ve favorecida con respecto al control

($P < 0.05$) cuando es alimentada con la dieta que incluye a esta cepa, el incremento significativo ($P < 0.05$, respecto al control) de la actividad de las enzimas de las células con borde de cepillo, maltasa (32.8%), fosfatasa alcalina (62.5%) y aminopeptidasa (47%) sugieren el paso de una digestión citosólica a una digestión extracelular.

Efecto del nivel de incorporación de D. hansenii 8339 en la dieta para larvas de D. labrax.

La incorporación de diferentes niveles de levadura, produjo efectos benéficos durante el desarrollo del cultivo larvario de la lubina. La mejor tasa de sobrevivencia y la generación de un menor número de larvas deformes (desviación de la columna vertebral) fue obtenido utilizando 1.1% de inclusión de levadura en la dieta (Tabla X). Otro efecto importante en las larvas alimentadas con esta concentración, es la obtención del doble de peso observado en aquellas larvas alimentadas con las otras dos dietas experimentales (5.7% y control) (Fig. 15). Lo que sugiere que las levaduras no participan directamente como un factor nutricional, sino que actúan mediante el aporte de pequeñas cantidades de moléculas que bien pudiera tratarse de factores de crecimiento. Las poliaminas han sido consideradas como factores de crecimiento naturales, que cuando las necesidades no pueden ser cubiertas por biosíntesis, pueden ser satisfechas por fuentes exógenas tales como la flora digestiva o el alimento (Bardócz, et al., 1993).

La incorporación de grandes cantidades de levaduras (más del 50% de los componentes de la dieta) se ha utilizado en peces como fuente alterna de la harina de pescado, sin embargo, no se observaron efectos significativos sobre el crecimiento (Métailler and Huelvan, 1993; Oliva-Teles and Gonçalves, 2001).

Este es el primer reporte donde se observa un efecto benéfico en el peso por la adición de levaduras vivas en larvas de peces. Anteriormente, Noh et al., (1994) mostraron que la incorporación de *S. cerevisiae* conduce a un incremento del 10% en el peso de la carpa. También en mamíferos se han mostrado estos resultados, particularmente en cerdos, donde la sobrevivencia y el desarrollo han sido optimizados al adicionar levaduras en las dietas (Bertin et al., 1997).

En base a nuestros resultados y a las experiencias de los autores arriba mencionados, podemos afirmar que la incorporación de levaduras vivas en la dieta, produce mejores rendimientos que cuando se incorporan células inactivadas, ya que las primeras, tienen la ventaja de proveer al hospedero de poliaminas *in situ* y de forma continua.

Efecto del nivel de incorporación de D. hansenii 8339 sobre la actividad y expresión de las enzimas digestivas en larvas de D. labrax.

Las larvas alimentadas con 1.1% de levadura presentaron un incremento en la secreción y niveles de RNA de amilasa y de tripsina a los 26 días de crecimiento (Figs. 16, 17, 24 y 26). Sin embargo, al final del experimento, (día 36) observamos una caída importante de la secreción de amilasa y de su respectivo mRNA. Este patrón es característico cuando sucede la maduración precoz del sistema digestivo de larvas de peces, y que además, está genéticamente programado. Se sabe que cuando la actividad y niveles de mRNA de amilasa permanecen altos, en los organismos persiste un sistema digestivo poco desarrollado (Cahu and Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante et al., 1996). Este patrón de actividad de la amilasa durante el desarrollo de las larvas, es análogo a lo observado con los altos

niveles de mRNA y actividad específica de lactasa en ratas destetadas y malnutridas (Rossi et al., 1986; Duluc et al., 1992).

Por otro lado, la actividad tripsina se incrementa con respecto a la edad y de acuerdo a la composición del alimento, que en este caso, se ve favorecida con la incorporación de 1.1% de levaduras. Péres et al., (1998), mencionan que la regulación de los genes que codifican la amilasa y tripsina es independiente, que sus genes se expresan bajo la influencia de la edad y la composición de la dieta. En nuestro estudio, la composición de la dieta fue idéntica, con la presencia y cantidad de levadura secretoras de poliaminas como única variante; previamente, Lhoste et al., (1996) observaron que la presencia de la microflora (bacterias) en ratas, y la composición de su dieta pueden modificar la actividad de sus enzimas pancreáticas, además de promover la mejor digestión y absorción de los nutrientes (específicamente los de naturaleza proteica). Los mismos autores reportan que la actividad de la lipasa se incrementa cuando se administran mayores niveles de proteína en ratas con microflora asociada. En nuestro estudio, ambas concentraciones de levadura inducen la actividad específica de la lipasa para ambas fechas y la expresión de su gen para el día 36 (Figs. 18 y 25).

El incremento de la actividad enzimática (aminopeptidasa N, maltasa y fosfatasa alcalina) en las células con borde de cepillo de larvas alimentadas con 1.1% de levaduras para el día 26, demuestra una vez mas que la maduración del sistema digestivo se ha llevado a cabo precozmente. En el día 36 de crecimiento, el proceso de maduración ha terminado, ya que los niveles de actividad de las enzimas del borde de cepillo, son iguales para todos los grupos (Fig. 19). Se ha demostrado que un bajo nivel de actividad de enzimas intracelulares (leucino-alanín peptidasa) y el aumento de actividad de las enzimas de las células con

borde de cepillo, caracterizan la maduración de los enterocitos en mamíferos (Henning, 1987) y en peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1995), es decir, la digestión se lleva a cabo como la de los adultos de cada especie.

La maduración temprana del sistema digestivo y la administración de poliaminas están asociados a la obtención de mayores tasas de sobrevivencia en peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Péres et al., 1997). Estos últimos, obtuvieron un aumento del 33% de sobrevivencia en larvas de la lubina alimentadas con dietas compuestas y 0.33% de espermina (Sigma S3256). Con lo que se demuestra, al igual que en mamíferos, que las poliaminas son un factor importante en la maduración de los enterocitos (Greco et al., 2000).

Se ha observado que en ratas destetadas (20-30 días) y oralmente alimentadas con *S. boulardii* (100 mg/día), incrementan su actividad específica de sacarasa (157%) y maltasa (47.5%) como producto de la liberación de poliaminas (55% espermidina y 43% espermina) (Buts et. al., 1994). Se sabe que las levaduras no penetran a los enterocitos de las larvas, por lo que con nuestros resultados, proponemos que el aporte de las poliaminas lo realizan mediante la secreción de éstas como resultado de su metabolismo una vez que se han establecido en el mucus intestinal.

Hasta el momento, se desconoce el o los mecanismos moleculares mediante los cuales las poliaminas inducen la maduración precoz del sistema digestivo, de manera similar al de los adultos; sin embargo, existen evidencias de que participan en las diferentes etapas de la expresión de los genes (síntesis de DNA y RNA; transcripción y traducción) lo que favorece a los procesos de proliferación y diferenciación celular, lo cual ha sido

documentado por varios autores (Dufour et al., 1988; Buts et al., 1994; Bardócz et al., 1995).

En el caso de la dieta que contenía 5.7% de levadura, podemos decir que los altos niveles de levadura y por consiguiente, las altas concentraciones de poliaminas aportadas en el intestino no permiten un buen desarrollo de las larvas. Podemos suponer que los altos niveles de poliaminas podrían estar ocasionando un retardo en el desarrollo y crecimiento como se observo en pollos (Smith, 1990) alimentados con niveles crecientes de putrescina. Sousadias and Smith (1995) mostraron también que la espermina es mas tóxica que la putrescina, presentando efectos adversos en el crecimiento a concentraciones mayores de 0.075%. Existen otros reportes que mencionan el efecto tóxico que ocasiona el exceso de poliaminas en la célula, y a pesar de que el mecanismo por el cual ocurre no es muy claro, se ha demostrado experimentalmente que la acumulación de moléculas análogas a las poliaminas, generan apoptosis o muerte celular (Hu y Pegg, 1997) y, se ha demostrado también que la concentración de 0.33% de espermina, utilizada por Péres, et al., (1997) con la lubina, es tóxica para pollos (Sousadias y Smith, 1995).

Con nuestros resultados observamos que con la administración de levaduras secretoras de poliaminas, se producen efectos positivos sobre la actividad enzimática digestiva de las larvas. Sin embargo, una de las preguntas que aun quedan por elucidar es, cómo regula la flora digestiva y/o las poliaminas secretadas, la actividad del hepatopáncreas?

Creemos que estas moléculas entran a los enterocitos donde podrían estar activando mecanismos hormonales en cascada, donde las células blanco serían otros organos como el páncreas e hígado (Peulen et al., 2000). De esta forma, podemos observar que las poliaminas secretadas por las levaduras influyen en la maduración pancreática estimulando

el proceso de transcripción de la tripsina y lipasa, y retardando el de la amilasa. Se ha sugerido que la hormona gástrica colecistokinina (CCK) (péptido que se encuentra activo tanto en invertebrados como en vertebrados) regula la secreción de enzimas digestivas como la tripsina y amilasa, entre muchas otras más. Sin embargo, se ha comprobado que en ratas libres de microflora gástrica, los niveles plasmáticos de esta hormona han permanecido constantes con respecto a ratas con microflora (Lhoste et al., 1996). Por lo tanto, es posible que en peces también pueda quedar descartada la posibilidad de que su flora intestinal participe en este proceso o, al menos que la presencia de levaduras en el tracto digestivo de las larvas, induzcan la secreción de CCK mediante mecanismos diferentes a los de las bacterias. Por otra lado, Fioramonti et al., (1994) encontró que la liberación de la CCK es estimulada por poliaminas exógenas en la rata, lo que bien pudiera explicar nuestros experimentos. Para confirmar esta hipótesis, tendrían que realizarse estudios en esta dirección para comprender un poco más el papel de los factores que permiten la liberación de los péptidos involucrados en los procesos digestivos en larvas de peces. Se sabe que durante el primer año de vida la lubina Europea experimenta un lento crecimiento comparado con sus etapas posteriores de desarrollo (Casti et al., 1989). También se ha demostrado que el primer mes de vida, es el período más crítico en el crecimiento y desarrollo de esta especie (Péres et al., 1998) debido a los cambios bioquímicos y fisiológicos efectuados. Por esta razón, es de primordial importancia incluir probióticos en los alimentos para contribuir al aporte de moléculas estimuladoras del crecimiento y diferenciación celular, que finalmente redundaría en una mayor sobrevivencia.

VIII. CONCLUSIONES

El presente trabajo constituye el primer estudio relacionado a la incorporación de levaduras vivas como probióticos y su efecto en la maduración del sistema digestivo en larvas de peces:

Se conoció el potencial de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 como probiótico en el cultivo de larvas de la lubina Europea *D. labrax*.

De las levaduras seleccionadas, *D. hansenii* (CBS 8339) y *S. cerevisiae* (X2180) produjeron las mayores cantidades de putrescina, espermidina y espermina.

Las mismas levaduras mostraron la mayor capacidad de adhesión al intestino de larvas de la lubina Europea y de la cabrilla. La adhesión fue confirmada mas tarde, por la recuperación de las mismas levaduras incluídas en las dietas de larvas de la lubina.

Los efectos positivos de la incorporación de levaduras en la dieta para las larvas, se ven reflejados en la maduración de su sistema digestivo. Esta maduración se traduce en un incremento de la actividad, expresión genética y secreción de enzimas digestivas, así como el paso de una digestión intra a extracelular.

La incorporación de levaduras vivas durante la preparación de las dietas, permite preservar las propiedades físicas de las microdietas; y acompañado del secado a bajas temperaturas, (45°C) aumenta la sobrevivencia de las levaduras en las dietas y por ende, en el intestino de la larva.

Gracias al diseño de sondas moleculares, pudieron ser cuantificados los niveles de mRNA codificante para las enzimas digestivas lipasa, tripsina y amilasa, mismas que serán utilizadas para conocer la expresión de estos mismos genes en la cabrilla en futuras investigaciones.

Prospección a futura investigación:

1. Producción de líneas de levaduras mutantes (knockout) de ODC (ornitina descarboxilasa) para conocer el papel de las levaduras que no producen poliaminas como control negativo de nuestros experimentos.
2. Sobreexpresión de la ODC en la cepa CBS 8339 y conocer el efecto de la superproducción de poliaminas en el desarrollo de las larvas de peces y no por el efecto de la biomasa administrada.
3. Estimulación de la síntesis *de novo* de poliaminas en la cepa CBS 8339 mediante la adición de aminoácidos (ornitina, metionina, arginina) a su medio de cultivo.
4. Monitoreo de mRNA para ODC en larvas recién destetadas, ya que pudiera usarse como marcador o índice de diferenciación y proliferación celular.
5. Monitoreo de la actividad diaminoxidasa o poliaminoxidasa en el intestino de las especies hospederas donde se pretenda utilizar probióticos productores de poliaminas.
6. Monitoreo de moléculas indicadoras de la maduración del tracto digestivo de peces p.e. péptidos trefoil, niveles plasmáticos y mRNA de CCK.
7. Microscopía electrónica de barrido para estudiar la adhesión de levaduras al tracto digestivo.
8. Optimizar el monitoreo *in vivo* de los probióticos mediante técnicas de biología molecular o inmunología.

IX. LITERATURA CITADA

- Abraham, A. K., Olsner, S., and Phil, A. 1979. Fidelity in protein synthesis *in vitro* is increased in the pancreas in presence of spermidine. FEBS Letters 101, 93-96.
- Acuña, J. 1998. Panorama Acuícola. Nov-dic 98.vol.4 no. 1, 22-23.
- Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annu. Rev. Fish. Dis. 2., 281-307.
- Anderson, N. G. and Norris, C. B. 1960. The effects of the amines on the structure of isolated nuclei. Experimental Cell Research 19, 605-618.
- Andlid, T., R. Vázquez-Juárez and L. Gustafsson. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) microb. Ecol. 30:321-324.
- Anguas-Vélez, B. H., R. Civera-Cerecedo, M. Contreras-Olguin, R.A. Rueda-Jasso and J. Guillaume. 2000). Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. J. of Applied aquaculture, vol. 10, (4), 1-15.
- Barbiroli, B., Corti, A. and Caldadera, C. M. 1971. The pattern of synthesis of ribonucleic acid species under action of spermine in the chick embryo. Biochemical Journal 123, 123-124.
- Bardócz, 1993. The role of dietary polyamines. European Journal of Clinical Nutrition, 47, 683-690.
- Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D. S., Grant, G., Pusztai, A., White, A. and Ralph, A. 1995. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. British Journal of Nutrition. 73, 819-828.

- Bardócz, S. 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends in food science and technology, october, vol 6 pp 341-346.
- Benetti, D., Alarcon, J. F., Stevens, O., Rotman, F., Banner-Stevens, G., Zimmerman, S., Feely, M. W., Matzie, W., Orhum, M. R., O'Hanlon, B. y Eldridge, L. 2001. Marine fish Culture. The Advocate, august, vol. 4 issue 4, 71-74.
- Bertin, G., Brault, M., Baud, M., Mercier, M., Tournut, J. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* I-1079, microbial feed additive: zootechnical effects on piglets. Annual meeting of the European Association for Animal Production, Vienna (Austria), august 25-28th, Wageningen Pers, Wageningen (NLD), 418 p.
- Bessey, A.O., Lowry, O.H. and Brock, M.J. 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum J. Biol. Chem. 164: 321-329.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
- Buts, J.P., Keyser, N. and L. Raedemaeker. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, Pediatric Research, 36, No. 4: 522-527.
- Cadena-Roa and Roldan, G. 1995. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla. Universidad Autónoma de Baja California Sur, pp 93.
- Cahu, C. and Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem.

Physiol. , 2:213-222.

Cahu, C. , Zambonino-Infante, J., Escaffre, A.-M., Bergot, P. and Kaushik, S. 1998.

Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. Aquaculture, 169, 1-7.

Cahu, C. and Zambonino-Infante, J.L. 2001. substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Vol 200, pp. 161-180.

Casti. A., Orlandini, G., Soldi, M.E., Davalli, P., Reali, N., Vivani, R. 1989. Tissue polyamine concentration in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): change with age and seasonal of the year. Ital. J. Biochem., vol. 38, pp. 369-373.

Clark M., Johnson S.L., Lehrach H., Lee R., Li F., Marra M., Eddy S., Hillier L., Kucaba T.,

Martin J., Beck C., Wylie T., Underwood K., Steptoe M., Theising B., Allen M., Bowers Y., Person B., Swaller T., Gibbons M., Pape D., Harvey N., Schurk R., Ritter E., Kohn S., Shin T., Jackson Y., Cardenas M., McCann R., Waterston R., Wilson R.; 1998. "WashU Zebrafish EST Project"; Unpublished.

Chang S.F., Netter H.J., Will H.; 1991. "Characterization of cDNA encoding the mouse hepatic triglyceride lipase and expression by in vitro translation". FEBS Lett. 289:69-72.

Cohen, S. S. 1978. What do the polyamines do? Nature, 274, 209-210.

Contreras-Olguin, M., M. Rueda-Jasso, R.A. Matus-Nivon, E. Ortiz-Galindo, J.L. Dumas, and

- M. Osorio-Galindo. 1997. Crianza de larvas y juveniles de cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. V Congreso Nacional de Ictiología. Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, México.
- Corring, T., Juste, C. and Lhoste, E. F. 1989. Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretion. *Nutrition Research Reviews*. 2, 161-180.
- Crane., R.K., Boge, G. and Rigal, A. 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Sclerorhinus canicula*). *Biochimica et Biophysica Acta* 554: 262-267.
- Dabrowsky, K. and Culver, D. 1991. The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of started diets. *Aquaculture Magazine*, march.april, 49-61.
- Dahlqvist, A. 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzym. Biol. Clin.* 11, 112-116.
- Davis, R. H. 1986. Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, vol. 50, no. 3, 280-313.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N. and Lepont, P. 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*, 95: 112-116.
- Duluc, I., Galluser, M., Raul, F. and Freund, J. N. 1992. Dietary control of lactase mRNA distribution along the rat small intestine. *Am. J. Physiol.* 262: G954-G961.
- FAO, 1986-1995. *Aquaculture Statistics*, Fisheries Circular No. 815, Revision 9.
- Fausto, N. 1972. RNA metabolism in isolated perfused normal and regeneration livers: polyamine effects. *Biochimica et Biophysica Acta* 281, 543-553.

- Fiedrow, P. and Szweykowska-Kulinska, Z. 1997. The influence of polyamines on polymerase chain reaction (PCR). *Acta Biochimica Polonica*, vol 44, no. 1, 83-88.
- Filligame, R. H., Jorstad, C. M., and Morris, D. R. 1975. Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavaline A. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 72, 4042-4046.
- Fioramonti, J., Fargeas, M. J., Bertarnd, B., Pradayrol, L. and Buéno, L. 1994. Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *Am. J. Physiol.* 267: G960-G965.
- Gatesoupe, J. F., 1993. Development of fish larvae and rearing conditions in hatcheries. *Costal and stuarine studies*, Lahlou, B. and Vitiello P. (Eds), American Geophysical Union, Washington DC, Capítulo 10, pp. 159-172.
- Gatesoupe, F. J. 1995. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquaculture International*, 3, 150-154.
- Gatesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B. and Male, R. 1994. Pancreatic carboxylester lipase from atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modelling of terciary structure, *Eur. J. Biochem.* 226, 603-612.
- Greco, S., Hugueny, I., George, P., Perrine, P., Louisot, P., Biol. M.C. 2000. Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. *Biochem. J.* 345, 69-75.
- Henning, S.J. 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. *Physiology of the gastrointestinal tract*, pp 285- 300, 2nd edition. edited by L.R. Johnson. Raven

Press, New York.

- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A. and Florholmen, J. 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparisson with bovine serum albumin. *J. Nutri.*, 118: 515-520.
- Houde, E. D. and Schekter, R. C. 1980. Feeding by marine fish larvae: developmental and functional responses. *Env. Biol. Fish.* 5: 315-334.
- Houde, E. D. and Schekter, R. C. 1983. Oxygen uptake and comparative energetics among eggs and larvae of three subtropical marine fishes. *Mar. Biol.* 72: 283-293.
- Hu, R.H. and Pegg, A. E. 1997. Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *Biochem. J.* 328, 307-316.
- Igarashi, K. and Kashiwagi, K. 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* 344, 633-642.
- Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Bioch.* 18:59-69.
- Josuweit, H. 1995. European markets for seabass, seabream and turbot, *Aquaculture Europ.* 20 (2): 6-12.
- Konecki, D., Kramer, G., Pinphanichakarn, P. and Hardesty, B. 1975. Polyamines are necessary for maximum *in vitro* synthesis of globin peptides and play role in chain initiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 169, 192-198.
- Kolkovski, S., Tandler, A. and Izquierdo M.S. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148, 313-322.

- Kyner, D., Zabros, P. and Levin, D. H. 1973. Inhibition of protein chain initiation in eukaryotes by deacetylated transfer RNA and its reversibility by spermine. *Biochemica et Biophysica Acta* 324, 386-396.
- Lhoste, E. F., Catala, I., Fiszlewicz, M., Gueugneau, A.M., Popot, F., Vaissade, P., Corring, T. and Szyllit, O. 1996. Influence of caecal microflora and of two protein levels on the adaptation of the exocrine pancreas: comparative study in germ-free and conventional rats. *British Journal of Nutrition*. 75: 433-444.
- Mallé, P., Vallé, M., Bouquelet, S. 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC*, vol. 79; No. 1, pp. 43-49.
- Maroux, S., Louvard, D. and Baratti, J. 1973. The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. *Biochem. Biophys. Acta*, 321:282-295.
- Métais, P. and Bieth, J. 1968. Determination de l'alfa-amilase par une microtechnique. *Annal. Biol. Clin.*, 26:133-142.
- Metailler, R. et Huelvan, C. 1991. Utilisation de levures dans l'alimentation du juvenile de bar (*Dicentrarchus labrax*), *Fish Nutrition in Practice*, (Kaushik S. J. and Luquet, P. Eds.) INRA, Paris, 1993 (Les Colloques, no. 61) pp 945-948.
- Miret, J.J., Solari, A. J., Barderi, P. A. and Goldemberg, S. H. 1992. Polyamine and cell wall organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 8, 1033-41.
- Nicholson, J. A. and Kim, Y.S. 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63:110-117.
- Noh, S. H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J. 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of israeli carp. *Korean J. Anim. Sci.* 36: 480-486.

- Oliva-Teles, A. and Gonçalves, P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 202, 269-278.
- Osborne, D. L. and Seidel, E. R. 1989. Microflore-derived polyamines modulate obstruction-induced colonic mucosal hypertrophy. *American Journal of Physiology*. 256, G1049-G1057.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
- Pegg, A. E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234, 249-262.
- Péres, A., Cahu, C.L., and Zambonino-Infante, J.L. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 16: 479-485.
- Rossi, T. M., Lee, P. C., Young, C. M. Lerner, A. and Lebenthal, E. 1986. Effect of nutritional rehabilitation on the development of intestinal brush border disaccharidases of postnatal malnourished weanling rats. *Pediatr. Res.* 20:793-797.
- Sherman, F., 1991. Getting started with yeast. In: Guthrie, Ch. and Fink, G. R. (Eds). *Methods in Enzymology*, 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Acad. Press, NY, pp. 3-21.
- Sherr, B. F., Sherr, E.B., and Fallon, R.D. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. and Environ. Microbiol.* vol. 53, No. 5, pp. 958-965.
- Smith, T. K. 1990. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine

- metabolism. P.S.E.B.M. 194: 332-336.
- Solch, J.P. and Arnold, G.L. 1996. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis*, 17:30-39.
- Sousadias, M. G. and Smith, T. K. 1995. Toxicity and growth-promoting of spermine when fed to chicks. *J Anim Sci* 73:2375-2381.
- Tabor, C. W. y Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, vol. 49, no. 1, 81-99.
- Tovar-Ramírez, D. 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, F.J. Gatesoupe and R. Vázquez-Juárez. 2000. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the european sea bass larvae *Dicentrarchus labrax*. AQUA 2000, NICE FRANCE, 2-6 mayo del 2000.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, J.F. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture* (204): 113-123.
- Vallé, M., Malle, P., and Bouquelet, S. 1997. Optimization of liquid chromatography determinatoin of amines in fish. *Journal of AOAC*, vol. 80; No. 1, pp. 49-56.
- Vázquez-Juárez, R., Ascencio F., Andlid, T., Gustafsson, L. and Wadstrom, T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. *Can J. Microbiol.* 12, 1135-41.
- Vázquez-Juárez, R. 1996. Factors involved in the colonization of fish intestine by yeast. Ph D. Thesis, Göteborg University, Sweden.

- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T. and Gustafsson, L. 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(1), 64-71.
- Vu, T. T. 1983. Etude histoenzymologique des activités protéasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 109, 57-69.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, Ch. 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. and Biochem.*, 12:399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, C. 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 109A, No. 2, pp. 209-212.
- Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, Ch. 1999. High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development, *American Society for Nutritional Sciences*, pp. 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. L., Péres, A., Quatzuguel, P. and Le gall, M. M. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* ratios: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139: 129-138.

ANEXO I. Productos del trabajo de tesis.

Publicaciones (banco de genes):

1. Tovar-Ramírez, D. 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
2. Tovar-Ramírez, D. 2001. *Paralabrax maculatofasciatus* partial mRNA for GAPDH, AC AJ344567, 421 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
3. Tovar-Ramírez, D. 2001. *Paralabrax maculatofasciatus* partial mRNA for trypsin, AC AJ344566, 535 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
4. Tovar-Ramírez, D. 2001. *Paralabrax maculatofasciatus* partial mRNA for lipase, AC AJ418039, 290 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).

Simposia:

5. Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, F.J. Gatesoupe and R. Vázquez-Juárez. 2000. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the European seabass larvae *Dicentrarchus labrax*. EAS spec. Publ. N° 28, p. 714.
6. Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, F.J. Gatesoupe, C. Cahu, H. Nolasco-Soria and R. Vázquez-Juárez. 2002. Polyamine producing yeast as potential probiotics for the spotted juvenile sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 10th International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish. Rodas, Grecia.

Capítulos en libros especializados:

7. Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo en peces. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-

Salazar, M., Olvera-Novoa, M., Civera-Cerecedo R. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V symposium. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Artículos:

8. Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, Ch., Cahu, J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae, *Aquaculture*, vol 204/1-2, pp113-123.
9. Tovar-Ramírez, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel. 2002. Dietary incorporation level of live yeast influences European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Marine Biology* (En revisión).

Notas científicas de divulgación:

10. D., Tovar, J., Zambonino, C., Cahu, F. J., Gatesoupe, R., Vázquez-Juárez and R., Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Yeast Newsletter*, vol. LI:8.

Productos de la investigación.

ID DLA275976 standard; RNA; VRT; 288 BP.
 XX
 AC AJ275976;
 XX
 SV AJ275976.1
 XX
 DT 06-MAR-2000 (Rel. 63, Created)
 DT 13-MAR-2000 (Rel. 63, Last updated, Version 2)
 XX
 DE Dicentrarchus labrax partial mRNA for triglyceride lipase
 XX
 KW triglyceride lipase.
 XX
 OS Dicentrarchus labrax (European sea bass)
 OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 OC Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 OC Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidei;
 OC Moronidae; Dicentrarchus.
 XX
 RN [1]
 RP 1-288
 RA Tovar Ramirez D.;
 RT ;
 RL Submitted (03-MAR-2000) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 RL Tovar Ramirez D., Unite Mixte INRA-IFREMER de Nutrition des
 Poissons,
 RL Ifremer, BP 70. IFREMER, 29280 Plouzane, FRANCE.
 XX
 RN [2]
 RA Tovar Ramirez D., Zambonino Infante J.L., Cahu C.L.;
 RT "Effects of dietary incorporation of yeast secreting spermine
 (Debaryomyces
 RT hansenii HF1) on sea bass larvae (Dicentrarchus labrax) development";
 RL Unpublished.
 XX
 DR SPTREMBL; Q91981; Q91981.
 XX
 FH Key Location/Qualifiers
 FH
 FT source 1..288
 FT /country="France"
 FT /db_xref="taxon:13489"
 FT /organism="Dicentrarchus labrax"
 FT /tissue_type="hepatopancreas"
 FT /dev_stage="larvae"
 FT CDS <1..>288
 FT /codon_start=1
 FT /db_xref="SPTREMBL:Q91981"
 FT /note="partial EC number 3.1.1.--"
 FT /product="triglyceride lipase"
 FT /function="hydrolysis of lipids"
 FT /protein_id="CAB76941.1"
 FT /translation="CGFNSSNPLIITHGWSVDGMMESWVVRLATTLKTNLKD VNVVIT
 FT DWLSLAHQHYPTAAQSTRTVGKDIAHLLQSLQVHYQYPVRKAHLIGYSLGA"
 XX
 SQ Sequence 288 BP; 76 A; 78 C; 72 G; 62 T; 0 other;
 tgtggttca acagcagtaa tcccctc atcatcactc acgggtggtc ggtggatgc 60
 atgatggaga gttgggtggt caggttagct acaaccetaa agacaaatct aaaagacgtc 120
 aacgtggtaga ttactgattg gctgtccctg gctcaccagc actacccac agcagcacag 180
 agcaccgca ctgtgggaaa agacatagcc cactgctgc agtcactca ggtacactac 240
 cagtaccag ttagaaaggc tcatttgatt ggctacagcc ttggagcg

ID PMA344566 standard; RNA; VRT; 535 BP.
 XX
 AC AJ344566;
 XX
 SV AJ344566.1
 XX
 DT 18-SEP-2001 (Rel. 69, Created)
 DT 17-JAN-2002 (Rel. 70, Last updated, Version 3)
 XX
 DE Paralabrax maculatofasciatus partial mRNA for trypsin
 XX
 KW trypsin.
 XX
 OS Paralabrax maculatofasciatus (spotted sand bass)
 OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 OC Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 OC Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidae;
 OC Serranidae; Paralabrax.
 XX
 RN [1]
 RP 1-535
 RA Tovar-Ramirez D.;
 RT ;
 RL Submitted (29-AUG-2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 RL Dariel T.R., Unite mixte INRA-IFREMER de Nutrition, Ifremer, BP 70.,
 RL Plouzane, 29280, FRANCE.
 XX
 RN [2]
 RA Tovar-Ramirez D., Zambonino-Infante J.L., Cahu C., Nolasco-Soria H.,
 RA Vazquez-juarez R.;
 RT "Properties of polyamines producers yeast as potential probiotics for the
 RT spotted sand bass Paralabrax maculatofasciatus larvae";
 RL Unpublished.
 XX
 FH Key Location/Qualifiers
 FH
 FT source 1..535
 FT /country="Mexico:Baja California Sur"
 FT /db_xref="taxon:147646"
 FT /organism="Paralabrax maculatofasciatus"
 FT /tissue_type="hepatopancreas"
 FT mRNA <1..>535
 FT /product="trypsin"
 FT CDS <1..>178
 FT /codon_start=1
 FT /product="trypsin"
 FT /EC_number="3.4.21.4"
 FT /function="proteolysis"
 FT /protein_id="CAC69999.1"
 FT /translation="QVSLNSGYHFCGGLVNNENWVVSAAHCYKSRVEVRLGEHNIRVTE
 FT GSEQFISSRVIRH"
 XX
 SQ Sequence 535 BP; 107 A; 172 C; 146 G; 110 T; 0 other;
 cagggtgctc tgaactctgg ctaccacttc tgtggtggct ccctggctca cgagaactgg 60
 gttgtgtctg ctgctcactg ctacaagtcc cgcgttgagg tgcgtctgg agagcacaac 120
 atcagggtca ccgaggaag cgagcagttc atcagctcct cccgcgtcat ccgccacccc 180
 aggtacagct cctacaacat cgacaatgac atcatgctga tcaagctgag caagcccgcc 240
 accctcaacc agtacgtgaa gccctgggct ctgccacca gctgtgcccc cgctggcacc 300
 atgtgcaaa gtcctggctg gggaaacacc atgagctcca ctgctgacag gaacaagctc 360
 cagtgcctgg acctccccat cctgttttc caggactgtg acaactccta ccctggcatg 420
 ataccgagc ccatgtactg cgctggatc ctggaggag gcaaggactc ttaccagggt 480
 gactctggtg gccccgtctg gtgcaacggt gagctgcagg gtgtgtgtc ctggg 535
 //

ID PMA344567 standard; RNA; VRT; 421 BP.
 XX
 AC AJ344567;
 XX
 SV AJ344567.1
 XX
 DT 18-SEP-2001 (Rel. 69, Created)
 DT 17-JAN-2002 (Rel. 70, Last updated, Version 3)
 XX
 DE Paralabrax maculatofasciatus partial mRNA for GAPDH
 XX
 KW gapdh.
 XX
 OS Paralabrax maculatofasciatus (spotted sand bass)
 OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 OC Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
 OC Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidae;
 OC Serranidae; Paralabrax.
 XX
 RN [1]
 RP 1-421
 RA Tovar-Ramirez D.;
 RT ;
 RL Submitted (29-AUG-2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
 RL Dariel T.R., Unite mixte INRA-IFREMER de Nutrition, Ifremer, BP 70.,
 RL Plouzane, 29280, FRANCE.
 XX
 RN [3]
 RA Tovar-Ramirez D., Zambonino-Infante J.L., Cahu C., Nolasco-Soria H.,
 RA Vazquez-juarez R.;
 RT "Properties of polyamines producers yeast as potential probiotics for the
 RT spotted sand bass Paralabrax maculatofasciatus larvae";
 RL Unpublished.
 XX
 FH Key Location/Qualifiers
 FH
 FT source 1..421
 FT /country="Mexico:Baja California Sur"
 FT /db_xref="taxon:147646"
 FT /organism="Paralabrax maculatofasciatus"
 FT mRNA <1..>421
 FT /product="GAPDH"
 FT CDS <1..>122
 FT /codon_start=1
 FT /product="GAPDH"
 FT /EC_number="1.2.1.12"
 FT /protein_id="CAC70000.1"
 FT /translation="AINDPFIDLEYMVYMFKYDSTHGRFKGEVKIEGDKLVIDG"
 XX
 SQ Sequence 421 BP; 99 A; 125 C; 101 G; 96 T; 0 other;
 gccatcaatg acccttcat cgacctggag tacatggctc acatgtcaa gtatgactcc 60
 acccacggcc gcttcaaggg tgaggtcaag atgaggggtg acaagctggt catcgtgga 120
 cacaaaatct ctgtttcca tctgaggac cccccaaca taaatgggg cgtatctggt 180
 gccattacg ttgttgatc cactgggtg ttcaccaca ttgagaaggc ctctgctcac 240
 ttgaaggcgg gtgccaagag ggtcatcctc tctgcacca gcgctgatgc cccatgttc 300
 gtcatggcgg tcaaccacga gaagtacgac aagtcttca cagttgtcag caatgcatcc 360
 tgcaccatgc catcaatgac cccttgcac aagaccctt gccagcaatg catcctgcac 420
 c 421
 //

EMBL:AJ418039

ID AJ418039 standard; RNA; VRT; 288 BP.

XX
AC AJ418039;
XX
SV AJ418039.1
XX
DT 15-NOV-2001 (Rel. 69, Created)
DT 15-NOV-2001 (Rel. 69, Last updated, Version 1)
XX
DE Paralabrax maculatofasciatus partial mRNA for triglyceride lipase (hld8
DE gene)
XX
KW hld8 gene; triglyceride lipase.
XX
OS Paralabrax maculatofasciatus (spotted sand bass)
OC Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
OC Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;
OC Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidei;
OC Serranidae; Paralabrax.
XX
RN [1]
RP 1-288
RA Tovar-Ramirez D.;
RT ;
RL Submitted (31-OCT-2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
RL Tovar-Ramirez D., Unite Mixte de nutrition des poissons, Ifremer, BP 70,
RL Plouzane, 29280, FRANCE.
XX
RN [2]
RA Tovar-Ramirez D., Zambonino-Infante J.L., Gatesoupe J., Cahu C.,
RA Nolasco-Soria H., Vazquez-Juarez R.;
RT "Properties of polyamines producers yeast as potential pr obiotics for the
RT spotted sand bass Paralabrax maculatofasciatus larvae";
RL Unpublished.
XX
FH Key Location/Qualifiers
FH
FT source 1..288
FT /country="Mexico:Baja California Sur"
FT /db_xref="taxon:147646"
FT /organism="Paralabrax maculatofasciatus"
FT /dev_stage="adult"
FT /tissue_type="hepatopancreas"
FT CDS <1..>288
FT /codon_start=1
FT /gene="hld8"
FT /product="triglyceride lipase"
FT /function="hydrolysis of lipids"
FT /protein_id="CAD11928.1"
FT /translation="CGFNSSNPLIIITHGWSLDGMMEGWVVRRLARPLKTTLIDVNVVIT
FT DWLSLAHQHYPTAAQSTRVGVKIDIAHLLQSLQVHYQYPVKKVHLIGYSLGA"
XX
SQ Sequence 288 BP; 70 A; 82 C; 73 G; 63 T; 0 other;
tgtgcttca acagcagtaa tcccctc atcatcactc acgggtggtc gctggacggt 60
atgatggagg gctgggtggt caggftagct cgaccctga agacaactct aatagacgtc 120
aacgtgtgga ttaccgactg gctgtcactg gctcaccagc actacccac agctgcacag 180
agcaccgca ctgttggaaa agacatagct cacctgctgc agtacteca ggtacactac 240
cagtaccggc ttaaaaagg tcaattgatt ggctacagcc ttggagcg 288

PRELIMINARY STUDY OF THE POTENTIAL OF YEASTS AS PROBIOTICS FOR THE EUROPEAN SEA BASS LARVAE, *DICENTRARCHUS LABRAX*

D. Tovar Ramírez^{1,2}, J.L. Zambonino Infante¹, F.J. Gatesoupe¹ and R. Vázquez Juárez²

¹Unité mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER - Centre de Brest - BP 70 - 29280 Plouzané France

²CIBNOR - Patología Marina - POB 128 - La Paz BCS - CP 23 000 México

Abstract

The aim of this study was to select polyamine-producing yeast, with a view to investigate their effect on development and gut maturation in *Dicentrarchus labrax* larvae in future experiments. The yeast strains were selected according to their production of polyamines, and their ability to adhere to the intestine of sea bass. The strains HF1 (*Debaryomyces hansenii*) and X2180 were among the best producers of spermidine and spermine, respectively, and their adhesion potential was high.

Introduction

The interest in probiotics for aquaculture is increasing rapidly. Special attention has been focused on microbes antagonistic to pathogens, but there are many other ways for probiotics to improve the health of the host. For instance, microbial polyamines may stimulate gut maturation in sea bass larvae¹. Yeast are known to produce polyamines, and some strains have strong adhesion potential to intestinal mucus, an important condition for probiotic efficiency². The aim of this study was (1) to assay *in vitro* the production of polyamine by yeast strains, already documented for their adhesion potential to fish mucus³, and (2) to observe their specific adhesion to the gut of sea bass larvae.

Materials and methods

Eight yeast strains were evaluated as polyamine producers. The cells were harvested early in the stationary phase. Cells were broken by sonication. After extraction, putrescine, spermidine and spermine were assayed by HPLC⁴ from the cell homogenate and the medium free-cell culture media.

The intestine was dissected in 41 days old sea bass larvae. Gut segments were introduced into multiwell plates filled with a phosphate buffer solution (pH 7.4), and fitted with cell culture inserts. The segments were incubated for ½ h with yeast cells labelled with DTAF. After three rinsings, the fluorescent yeast cells adhering to the gut were observed under microscope.

Results

Debaryomyces hansenii (HF1), *Saccharomyces cerevisiae* (strains 7764 and YL12), and the unidentified strain X2180 had the best adhering capacity to the gut of sea bass larvae (Fig. 1). Strong differences in polyamine production were observed among the strains (Table 1). However, the strains HF1 and X2180 were the best producers of spermidine and spermine, respectively.

Conclusion

The two selected strains have a good potential as probiotics for sea bass larvae. Their effect *in vivo* will be presented elsewhere (Tovar Ramirez et al., in preparation).

Acknowledgements

This study is a part of the programme PM98S03, supported by the French-Mexican Committee ECOS-Nord. The first author is supported by the fellowship 84016 from CONACYT.

POLYAMINE PRODUCING YEAST AS POTENTIAL PROBIOTICS FOR THE SPOTTED JUVENILE SAND BASS *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tovar-Ramírez, D.^{1,2}, Zambonino-Infante, J. L.¹, Gatesoupe, F. J.,¹ Cahu, C.¹, Nolasco-Soria, H.² and Vázquez-Juárez, R.²

¹Unité mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER, Centre de Brest BP 70, 29280 Plouzané, France.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, PO BOX 128, La Paz, BCS, CP 23000, México.

ABSTRACT

Adhesion to the gastrointestinal tract is one of the main characteristics considered to select potential probiotics. Seven marine yeast strains were labelled with 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino)-fluorescein hydrochloride (DTAF), a non-lethal fluorescent dye. The adhesion to the gut of spotted juvenile sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) was assayed *in vitro*, and evaluated by using fluorescent microscopy. We observed the highest adhesion capacity with *Debaryomyces hansenii* (strain CBS 8339), and *Saccharomyces cerevisiae* (strains 7765 and X2180). *D. hansenii* CBS 8339 and *S. cerevisiae* X2180 were previously selected among the best polyamine-secreting strains, with good adhesion capacity to the gut of European sea bass larvae (Tovar et al., 2000). However, the stimulation of gut maturation was observed in sea bass only with *D. hansenii* (Tovar et al., 2002, Aquaculture 204: 113-123). The effect of the yeast strains should be also compared in spotted sand bass, due to the higher rearing temperature that could affect the efficiency of the candidate probiotics.

Key words: *Paralabrax maculatofasciatus*; polyamines; yeast; adhesion

Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces

D. Tovar-Ramírez^{1,2}, J.L. Zambonino-Infante¹, C. Cahu¹, F.J. Gatesoupe¹ y R. Vázquez-Juárez²

¹ Unité Mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER - Centre de Brest - BP 70 - 29280 Plouzané France, Tel. (0)2 98 224090, Fax. (0)2 98 224653

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita C.P. 23090, La Paz, B.C.S., México. Tel (112) 53633; Fax (112) 53625. rvazquez@cibnor.mx

RESUMEN: El uso de los probióticos en la acuicultura ha cobrado interés en los últimos años. En el presente

estudio se evalúa el potencial probiótico de levaduras en el desarrollo del tracto digestivo en la etapa larvaria de dos especies importantes: la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Se eligieron 10 cepas de levaduras y se seleccionaron aquellas que presentaran una producción de poliaminas importante y una buena capacidad de adhesión al intestino de las larvas del pez. La producción de poliaminas se cuantificó por HPLC en las levaduras mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Para estudiar la adhesión de levaduras al intestino de larvas, se utilizó el marcaje celular con DTAF (5-([4,6-dichlorotriazin-2-YL]amino)- fluorescein) y la observación por microscopía de fluorescencia. Se observó que la cepa HF1 (*Debaryomyces hansenii*) y la X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) produjeron más espermidina y espermina, y mostraron la mejor capacidad de adhesión al intestino de la lubina, respectivamente. Las levaduras seleccionadas se incluyeron al alimento de larvas de la lubina europea para conocer el efecto en su crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática digestiva. Las larvas alimentadas con la dieta que contenía la cepa HF1, experimentaron un aumento del 8.3% en la sobrevivencia, pero no así para el aumento de peso con la dieta de referencia. Se observó que la actividad amilasa secretada de páncreas, así como aquella obtenida de los cocientes entre fosfatasa alcalina, maltasa y leucin-aminopeptidasa y la enzima citosólica leucin-alanin aminopeptidasa, se incrementan en el día 27 para las larvas alimentadas con la cepa HF1; y, posteriormente, se igualan los valores de actividad con respecto a la dieta de referencia en el día 42. Este comportamiento sugiere la maduración temprana del sistema digestivo en larvas alimentadas con la cepa HF1. Finalmente, se cuantificó el mRNA de la lipasa, tripsina y fosfolipasa mediante la técnica de RT-PCR, para conocer la expresión de los genes de estas enzimas como respuesta al estímulo alimenticio elaborado con levaduras. Como producto de este trabajo, se identificó y se registró una secuencia que pertenece a una lipasa en el banco EMBL - (European Bioinformatics Institute) con el No. de acceso AJ275976 y se obtienen los primeros datos del uso de levaduras productoras de poliaminas en la maduración del tracto digestivo de larvas de pez.

PALABRAS CLAVES: Probióticos, levaduras, maduración del tracto digestivo, peces.

Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

Yeast

A Newsletter for Persons Interested in Yeast

Official Publication of the International Commission on Yeasts
of the International Union of Microbiological Societies (IUMS)

JUNE 2002

Volume LI, Number 1

Marc-André Lachance, Editor

University of Western Ontario, London, Ontario, Canada N6A 5B7

<lachance@uwo.ca>

Associate Editors

Peter Biely
Institute of Chemistry
Slovak Academy of Sciences
Dúbravská cesta 9
842 38 Bratislava, Slovakia

Yasuji Oshima
Department of Biotechnology
Faculty of Engineering
Kansai University
3-3-35 Yamate-Cho, Suita-Shi
Osaka 564-8680, Japan

G.G. Stewart
International Centre for Brewing and Distilling
Department of Biological Sciences
Heriot-Watt University
Riccarton, Edinburgh EH14 4AS, Scotland

Patrizia Romano
Dipartimento di Biologia, Difesa
e Biotecnologie Agro-Forestali
Università della Basilicata,
Via Nazario Sauro, 85,
85100 Potenza, Italy

Letters to the Editor	1	M.J. Schmitt, Saabrücken, Germany	8
W.J. Middelhoven, Wageningen, The Netherlands	1	J. du Preez, Bloemfontein, South Africa	9
W.I. Golubev, Puschino, Russia	2	J. Londesborough, VTT, Finland	11
G.I. Naumov and E.S. Naumova, Moscow, Russia	2	M. Hamamoto, Saitama, Japan	12
J.A. Barnett, Norwich, England	4	G. Kunze, Gatersleben, Germany	13
A. Bakalinsky, Corvallis, Oregon, U.S.A.	4	L. Olsson, Lyngby, Denmark	14
E. Minárik, Bratislava, Slovakia	4	P. Raspor, Ljubljana, Slovenia	15
C. Gancedo, Madrid, Spain	5	J.P. Sampaio, Caparica, Portugal	17
W.M. Ingledew, Saskatoon, Saskatchewan, Canada .	5	J. Vorisek, Prague, Czech Republic	18
N.B. Pamment, Melbourne, Victoria, Australia	7	M.A. Lachance, London, Ontario, Canada	18
R. Vasquez Juárez, LaPaz, Baja California Sur, México	8	International Commission on Yeasts	18
		Forthcoming meetings	20
		Brief News Item	22

acetaldehyde strongly inhibited the growth of osmotically-shocked cultures, in contrast to the effects of small quantities of ethanol. The beneficial effects of acetaldehyde appear to be largely confined to cultures exposed to chemical stress, especially

by agents which disturb membrane structure or function. Acetaldehyde addition has potential practical application in overcoming inhibition in such fermentations.

I. **Center of Biological Research, Division of Experimental Biology, P.O. Box 128, La Paz 23000 B.C.S., México. Communicated by R. Vasquez Juárez <rvazquez@cibnor.mx>.**

Recent research.

D. Tovar, J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, and R. Lésel. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae.

Yeasts produce polyamines, and some strains have a strong adhesion potential to intestinal mucus, an important condition for probiotic efficiency. The aim of this study was to explore an *in-situ* production of polyamine by *Debaryomyces hansenii* HF1 (DH), a yeast strain isolated from fish gut, in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* X2180 (SC) (Cecoborg University Collection). The production of polyamines in DH was 3-times higher than that of SC. The main polyamines are spermine and spermidine, produced at a similar level. Both yeasts adhered to the gut of seabass larvae. When the yeasts were introduced into a compound diet, the colonization was

effective in the larvae (10^4 CFU g^{-1} on a body weight basis). The diet DH led to an increase in amylase secretion in 27-day-old larvae, in comparison with the control diet. The secretion of amylase and trypsin was lower with the SC diet, and some delay in trypsin secretion was still observed in this group at day 42. At day 27, the activity of brush border membrane enzymes was stimulated by DH diet, and delayed by SC diet, in comparison with the control diet. The survival of the larvae was also increased with diet DH, but the growth rate was lower than in the control group. That may be due to the introduction of live yeast into the diet, which need to be optimised.

II. **Department of Microbiology, Institute of Applied Molecular Biology, University of the Saarland, Im Stadtwald, Building 2, D-66041 Saarbücken, Germany. Communicated by M.J. Schmitt <mjs@microbiol.uni-sb.de>.**

The following are summaries of recent published papers of the group.

Breinig, F., Tipper, D.J. & M.J. Schmitt. 2002. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell* **108**:395-405.

Saccharomyces cerevisiae K1 killer strains are infected with the M1 double-stranded RNA virus encoding a secreted toxin that kills sensitive cells by disrupting cytoplasmic membrane function. Toxin binding to spheroplasts is mediated by Kre1p, a cell wall protein initially attached to the plasma membrane by its C-terminal GPI anchor. Kre1p binds toxin directly. Both cells and spheroplasts of $\Delta kre1$ mutants are completely toxin resistant; binding to cell walls and spheroplasts

is reduced to 10 and <0.5%, respectively. Expression of K28-Kre1p, an inactive C-terminal fragment of Kre1p retaining its toxin affinity and membrane anchor, fully restored toxin binding and sensitivity to spheroplasts while intact cells remained resistant. Kre1p is apparently the toxin membrane receptor required for subsequent lethal ion channel formation.

Breinig, F. & M.J. Schmitt. 2002. Spacer-elongated cell wall fusions improve cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:637-644.

Fusion proteins for cell surface expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* were constructed that consisted of the C-terminal leader sequence of Kre1p, followed by the nine amino acid viral epitope hemagglutinin (HA), and the carboxyterminal anchoring domain of either Cwp2p or Flo1p. All fusions were constitutively expressed under transcriptional control of the diacylglycerate kinase promoter and immunofluorescence analysis indicated that in each construct the HA peptide was correctly anchored to the outer yeast cell surface. Successful mobilisation of the cell wall fusions by laminarinase treatment indicated that the fusions are *in vivo* covalently linked to cell wall β -D-glucans. FACS analyses further demonstrated that 70%

of the yeast cell population expressed the corresponding cell wall fusion. Neither the number of positive cells within the population nor the distribution of the fusion at the single cell level were negatively affected by replacing the "heterologous" Kre1p leader by the "native" Cwp2p leader. Insertion of a 350 amino acid Ser/Thr-rich spacer sequence into the fusions led to a dramatic increase in HA peptide accessibility on the yeast cell surface. Our data show that FACS analyses represent a valuable means for investigating cell surface expression, and indicate that artificially spacer-elongated cell wall fusions might rise novel possibilities for cell surface expression of heterologous proteins in yeast.

AVANCES EN NUTRICION ACUICOLA V.
Memorias del Quinto Simposium
Internacional de Nutricion Acuicola,
19-22 de Noviembre de 2000
Merida, Yucatan, Mexico

ISBN -970-894-52-9

Copias disponibles en:
Universidad Autonoma de Nuevo Leon
Facultad de Ciencias Biologicas
Programa Maricultura
Cd. Universidad A.P. 7-56,
San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon,
Mexico
C.P. 66450
Tel+ Fax. (81) 352 6390
E-mail: elicruz@hotmail.com
mlzap@wildmail.com

Para citar alguna parte de esta obra, siga
el siguiente estilo:

Autor del escrito, 2000. Nombre del articulo,
pp. #. En: Cruz-Suarez, L.E., Riquelme-Marie,
D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Novoa, M.,
Civera-Cerecedo, R. (Eds.), Avances en
Nutricion Acuicola V. Memorias del Quinto
Simposium Internacional de Nutricion
Acuicola.

Diseño y coordinación técnica de la edición:

L. Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar,
Adriana Gertrud Flores

DISEÑO GRAFICO Y MULTIMEDIA

DSI - Aplicaciones Creativas
Luis Alfonso Franco Garcia
Nancy Saldana Quintero
Alejandro Aguilón Valdez.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biologicas
Universidad Autónoma de Nuevo Leon 2000

Editores:

- Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez,
- Dr. Denis Riquelme Marie,
- Dra. Mireya Tapia Salazar,
- Dr. Miguel A. Olivera Novoa,
- Dr. Roberto Civera Cerecedo

Copyright 2000, Universidad Autónoma de Nuevo Leon,
Facultad de Ciencias Biologicas,
Programa Maricultura.

Todos los derechos reservados

La reproducción total o parcial de esta obra requiere la
autorización escrita por los titulares del derecho de autor.



Avances en Nutrición Acuicola V

Editores
Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez
Dr. Denis Riquelme Marie
Dra. Mireya Tapia Salazar
Dr. Miguel A. Olivera Novoa
Dr. Roberto Civera Cerecedo

Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces.¹

D. Tovar-Ramírez^{1,2}, J.L. Zambonino-Infante¹, C. Cahu¹, F.J. Gatesoupe¹ y R. Vázquez-Juárez²

¹Unité Mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER - Centre de Brest - BP 70 - 29280 Plouzané France, Tel. (0)2 98 224090, Fax. (0)2 98 224653

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita C.P. 23090, La Paz, B.C.S., México. Tel (112) 53633; Fax (112) 53625. rvazquez@cibnor.mx

RESUMEN: El uso de los probióticos en la acuicultura ha cobrado interés en los últimos años. En el presente estudio se evalúa el potencial probiótico de levaduras en el desarrollo del tracto digestivo en la etapa larvaria de dos especies importantes: la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Se eligieron 10 cepas de levaduras y se seleccionaron aquellas que presentarían una producción de poliaminas importante y una buena capacidad de adhesión al intestino de las larvas del pez. La producción de poliaminas se cuantificó por HPLC en las levaduras mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Para estudiar la adhesión de levaduras al intestino de larvas, se utilizó el marcaje celular con DTAF (5-([4,6-dichlorotriazin-2-YL]amino)- fluorescein) y la observación por microscopía de fluorescencia. Se observó que la cepa HF1 (*Debaryomyces hansenii*) y la X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) produjeron más espermidina y espermina, y mostraron la mejor capacidad de adhesión al intestino de la lubina, respectivamente. Las levaduras seleccionadas se incluyeron al alimento de larvas de la lubina europea para conocer el efecto en su crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática digestiva. Las larvas alimentadas con la dieta que contenía la cepa HF1, experimentaron un aumento del 8.3% en la sobrevivencia, pero no así para el aumento de peso con la dieta de referencia. Se observó que la actividad amilasa secretada de páncreas, así como aquella obtenida de los cocientes entre fosfatasa alcalina, maltasa y leucin-aminopeptidasa y la enzima citosólica leucin-alanin aminopeptidasa, se incrementan en el día 27 para las larvas alimentadas con la cepa HF1; y, posteriormente, se igualan los valores de actividad con respecto a la dieta de referencia en el día 42. Este comportamiento sugiere la maduración temprana del sistema digestivo en larvas alimentadas con la cepa HF1. Finalmente, se cuantificó el mRNA de la lipasa, tripsina y fosfolipasa mediante la técnica de RT-PCR, para conocer la expresión de los genes de estas enzimas como respuesta al estímulo alimenticio elaborado con levaduras. Como producto de este trabajo, se identificó y se registró una secuencia que pertenece a una lipasa en el banco EMBL - (European Bioinformatics Institute) con el No. de acceso AJ275976 y se obtienen los primeros datos del uso de levaduras productoras de poliaminas en la maduración del tracto digestivo de larvas de pez.

PALABRAS CLAVES: Probióticos, levaduras, maduración del tracto digestivo, peces.

INTRODUCCION

El cultivo de peces marinos se ha convertido en una actividad creciente que se apoya principalmente de los criaderos para el suministro de larvas alimentadas generalmente con alimento vivo durante su primer mes de vida (Zambonino-Infante y Cahu, 1999). La secuencia de alimentación se basa

¹ Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Nowoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

principalmente en rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia salina* durante los primeros 20-25 días de cultivo, continuando con una combinación del alimento vivo con alimento seco hasta completar el destete (Kolkovski *et al.* 1997a). La alimentación exógena principia pocos días antes de la absorción completa del vitelo mientras que el alimento comienza a ser digerido en un sistema poco desarrollado (Gatesoupe, 1993).

Desde hace años, se ha creído que las larvas de peces no poseen las enzimas necesarias para digerir las dietas compuestas y que la digestión del alimento vivo se realiza por autólisis de estos microorganismos en el tracto digestivo (Zambonino-Infante y Cahu, 1999); por otro lado, también algunos autores han sugerido que las larvas de peces no pueden asimilar las dietas compuestas debido a la insuficiente actividad enzimática (Lauff y Hofer, 1984) y que puede ser compensada por la actividad enzimática del alimento vivo (Dabrowski y Glogowski, 1977). Recientes resultados demuestran que la actividad enzimática de larvas alimentadas con dietas compuestas y con alimento vivo es similar (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a). De igual forma, el hecho de sustituir completamente el alimento vivo por dietas compuestas se obtiene la misma sobrevivencia y crecimiento (Péres *et al.* 1997). En la búsqueda de encontrar sustitutos del alimento vivo para la industria del cultivo de larvas de peces, se ha despertado un enorme interés por el uso de los probióticos como suplementos de los alimentos vivos y elaborados para la acuicultura, y de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas bajo un esquema de cultivo amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Especial atención se ha puesto en aquellos microbios que contrarrestan la invasión de patógenos y aumentan la salud del hospedero al incrementar su resistencia contra éstos, y en aquellos también que aporten moléculas de importancia fisiológica para el hospedero (Tovar *et al.*, 2000a). Desde un amplio sentido, el término de probiótico se aplica a aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, consideramos importante hacer alusión a las moléculas que son aportadas por el microorganismo y que desempeñan una función benéfica para el hospedero, participando en su desarrollo o cubriendo alguna necesidad fisiológica.

Como ejemplo podemos citar las poliaminas, moléculas presentes en todas las células vivas y que son requeridas principalmente en aquellos tejidos con alto recambio celular y de crecimiento (Bardocz, 1993). Entre las poliaminas podemos citar a la putrescina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), espermidina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) y espermina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Hasta la fecha, se han descrito algunas de las funciones que desempeñan en los seres vivos; sin embargo, aún no se tiene elucidado completamente su mecanismo funcional en la célula. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Se han descrito también, funciones específicas como inespecíficas dentro del ciclo de replicación celular, tales como el control e iniciación de la traducción de proteínas, estabilización de la molécula del RNA, estimulación de la asociación de las subunidades ribosomales y estimulación de la síntesis del DNA y RNA (Bardocz, 1993).

Desde el punto de vista de su aplicación, las poliaminas se han utilizado para inducir el desarrollo del tracto digestivo de mamíferos (Buts *et al.* 1993; Buts *et al.* 1994; Dufour, *et al.* 1988) y de peces (Péres *et al.* 1997). Se ha demostrado que la poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo de tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardocz, 1995; Buts *et al.* 1993), y que el suministro de 0.33% de espermina en las etapas larvianas de *Dicentrarchus labrax*, se incrementa la sobrevivencia hasta un 33 % con respecto a la dieta control, libre de poliaminas (Péres *et al.* 1997).

Se sabe que durante las primeras cinco semanas de vida de los peces marinos, se llevan a cabo numerosos cambios funcionales y morfológicos en su sistema digestivo (Péres *et al.* 1997), por lo que es de suma importancia el conocer los factores que regulan el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de las larvas en este período crítico. Para este fin, se está estudiando el uso de levaduras productoras de poliaminas como inductoras de la maduración del sistema digestivo de las larvas de la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Tovar *et al.* 2000a,b), pez de alto potencial económico en Europa (FAO Fisheries Circular, 1986-1995; Josupeit, 1995) y de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. El propósito de este estudio, es conocer el efecto de levaduras seleccionadas por su producción de poliaminas y su adherencia al tracto digestivo de peces, en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina europea. *D. labrax* y de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Las cepas de levaduras evaluadas en este estudio por su producción de poliaminas y capacidad de adherencia al intestino de *D. labrax*, se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio

Cepa	Observación/Referencia
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7764	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> J26	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7765	Aislada de peces Andlid <i>et al.</i> , 1993
<i>Debaryomyces hansenii</i> HF1, CBS 8339	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i> 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180	Cepa de colección Univ. Goteborg
Cepa AY1	Aislada de abulón, no identificada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7835*	Aislada de paciente-Byron <i>et al.</i> 1995
<i>Candida albicans</i> *	Aislada de catéter de paciente (SSA La Paz, B.C.S.)

* Se incluyeron dos cepas consideradas patógenas como referencia.

Medios de cultivo y crecimiento de las levaduras

La reactivación de las levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD y las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en medio de cultivo líquido YNB DIFCO. Como parámetro de crecimiento se consideró el aumento en densidad óptica (550 nm) a 200 rpm y 25 °C. La excepción fue *Candida albicans* cuyo crecimiento se llevó a cabo en tubos de ensaye y se midió su crecimiento por peso seco. Se hizo esta excepción porque durante su crecimiento forma agregados y requiere de mayor agitación.

Método de extracción de poliaminas biogénicas

El método de extracción y detección de poliaminas se llevó a cabo de acuerdo a Mallé *et al.* (1996). Se utilizó ácido perclórico para su extracción y la dansilación para la detección de las poliaminas por HPLC en un aparato LKB-LCC 2552 de PHARMACIA unicord SII, y detector de fluorescencia GILSON mod. 121. Se usó una columna SUPELCOSIL SIGMA-ALDRICH LC-18-DB, de 25 cm de largo, 5 µm de diámetro. Se utilizó un flujo de 1 ml/min con una concentración de agua/acetonitrilo de acuerdo a los tiempos y porcentajes descritos por Malle *et al.* (1996). Para cuantificar las poliaminas se

realizo una curva estándar con putrescina, espermidina y espermina (SIGMA, Co) y el estándar interno 1, 3-diaminopropano (SIGMA).

Marcaje de levaduras

Para observar la adhesión de las levaduras al intestino de las larvas de *D. labrax*, se realizó un marcaje con DTAF de acuerdo a Sherr *et al.* (1987). Se obtuvieron los intestinos de larvas y se incubaron con las levaduras marcadas durante 2 h a 37 °C.

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. labrax

El estudio de adhesión se llevó a cabo con las levaduras enlistadas en la sección de producción de poliaminas. Después de haber evaluado la producción de poliaminas en las 10 diferentes cepas, se procedió a estudiar su capacidad de adherirse al tracto digestivo de larvas de *D. labrax* de 41 días de edad. Los segmentos de intestino fueron puestos en buffer de fosfatos pH 7.4, posteriormente se adicionó el cultivo de las levaduras marcadas con DTAF. Los segmentos fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se evaluó la cantidad de levaduras por campo adheridas por microscopía de fluorescencia (40X).

Efecto del alimento PL17 para D. labrax enriquecido con dos cepas de levadura (D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180) seleccionadas por su adhesión y producción de poliaminas

Las levaduras *D. hansenii* (HF1) y *S. cerevisiae* (X2180), seleccionadas por su capacidad de adhesión al intestino de las larvas y producción de poliaminas, fueron incorporadas al alimento PL17 cuya composición basal esta patentada (Pat. 99-050449) y contiene, 58.4% de proteína, 21.3% de lípidos, (11.6% lípidos neutros y 7.8% de fosfolípidos), 12.2% de cenizas relativas a la materia seca y la humedad fue de 9.8%. El tamaño del alimento fue de 120-200µm del día 10 al 20 después de la eclosión y 200-400 µm del día 20 en adelante).

Las levaduras fueron crecidas hasta su fase logarítmica, se concentraron por centrifugación y luego resuspendidas en agua destilada estéril, para ser adicionadas al alimento por aspersión en proporción de 0.9 mL de suspensión celular (equivalente 67.5×10^4 UFC para *D. hansenii* HF1 y 63×10^4 UFC para *S. cerevisiae* X2180) por gramo de alimento. La cantidad de células de *D. hansenii* cepa HF1 adicionada al alimento, produce 21.93 nM de espermidina, 8.07 nM de espermina y 7.75 nM de putrescina, mientras que *S. cerevisiae* X2180 produce 2.76 nM de espermidina, 6.36 nM de espermina y 1.36 nM de putrescina. Después de adicionar la suspensión de levaduras, el alimento fue secado en una estufa a 37 °C durante 45 min. La suspensión celular fue almacenada en refrigeración (4°C) después de preparar el alimento para las larvas y la sobrevivencia de las levaduras fue medida durante su almacenamiento.

Cultivo larvario y alimentación de D. labrax

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio húmedo de la Unidad Mixta de Nutrición de peces INRA-IFREMER, Centro Brest, Francia. Las larvas se consiguieron en la empresa Aquanord, Francia y arribaron a la estación en un estado prelarvario, es decir, sin haberse llevado a cabo la abertura de la boca. Se mantuvieron en la oscuridad hasta el día 9 sin alimento. Fueron crecidas por 41 días en

estanques de fibra de vidrio de 35 L⁻¹ de capacidad a una densidad inicial de 60 organismos L⁻¹. La temperatura se mantuvo a 13 °C desde el inicio y se incrementó progresivamente a 20 °C en el día 9 después de su eclosión. La salinidad fue de 34 g L⁻¹ y la intensidad luminosa fue de 9 Wm⁻² a partir de la ida 15 de cultivo. Los niveles de oxígeno se mantuvieron por arriba de 6mg L⁻¹. Fueron cultivadas en agua de mar filtrada en un filtro de arena y pasada por un calentador de tungsteno y desgaseada en una columna con anillos de plástico. Las larvas se alimentaron continuamente con un distribuidor automático de bandas, verificándose la ingesta por microscopio estereoscópico. Para cada régimen alimenticio, se utilizaron cuatro réplicas incluyendo un control sin levaduras.

Sobrevivencia y peso de las larvas

La sobrevivencia se calculó por el número inicial y final de larvas, expresándose como %. Se tomó en cuenta también el número de larvas muestreadas para los ensayos enzimáticos y extracción de RNA. El peso de las larvas fue obtenido del muestreo de 10 larvas por estanque, los días 5, 16, 22, 29, 36 y 42 de cultivo.

Efecto del alimento suplementado con levaduras sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de D. labrax

Durante el crecimiento larvario (día 27) y al final del experimento (día 41), las larvas fueron colectadas por la mañana (8:30) antes de ser alimentadas y almacenadas a -80 °C, hasta su proceso. Para la disección de larvas y obtención de homogenados se utilizó la metodología descrita por Cahu y Zambonino-Infante (1994). De los extractos obtenidos, se ensayaron las enzimas pancreáticas tripsina (Holm *et al.* 1988) y amilasa (Métais y Bieth, 1968). De igual forma, ambas enzimas fueron ensayadas en el intestino para conocer la cantidad secretada. De las membranas con borde de cepillo se ensayaron la enzimas fosfatasa alcalina (PAL) (Bessey *et al.* 1946), leucin-aminopeptidasa (LAP) (Maroux *et al.* 1973), y la enzima citosólica leucin-alanin-peptidasa (leu-ala) (Nicholson y Kim, 1975). La actividad de las diferentes enzimas se refirió como actividad específica (miliunidades/ mg de proteína) y la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1974) usando albúmina sérica bovina como estándar. Las membranas con borde de cepillo se obtuvieron de acuerdo a (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; método modificado de acuerdo a Crane *et al.* 1979).

Elaboración de sondas de cDNA para la detección de la lipasa primaria de larvas y adultos de D. labrax

Los oligonucleotidos ("primers") se diseñaron de los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con los mRNA de nuestro interés, registrados en los bancos de secuencias con acceso en la siguiente página de Internet: <http://www.infobiogen.fr/services/deambulum/fr/>.

La extracción del RNA se llevó a cabo en larvas recién colectadas (8:30) en ayunas y adultos. Para la extracción de RNA total se utilizó el segmento pancreático utilizando el protocolo de extracción que acompaña al reactivo de TRIZOLTM de GIBCO Life Sciences. Del RNA total se tomaron 5 µg para ser transcritos a cDNA utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) de acuerdo a las instrucciones del kit READY TO GO de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA. La amplificación del cDNA se llevó a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo en 50 µL conteniendo 0.66 µg del cDNA, 0.2 U de Taq polimerasa (Amersham), 100 µM de dNTP's, 50 pmoles de cada primer, 1X del amortiguador de la reacción (Amersham) y agua destilada estéril hasta completar 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a

cabo en un termociclador ROBOCYCLER Gradient 96 Stratagene CA USA., con los parámetros descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Amplificación de los fragmentos seleccionados

Desnaturalización inicial del cDNA	94 °C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización del cDNA formado	94 °C	1 min	30 ciclos
Hibridación de los primers	variable *	1 min 1/2	30 ciclos
Elongación del cDNA formado	72 °C	2 min	30 ciclos
Elongación final	72 °C	7 min	1 ciclo

* La temperatura de hibridación depende de las proporción de G/C que contienen los primers elaborados.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis sobre agarosa al 1.2 % y analizados en un fluorómetro FluoroScan Multimager de BIO-RAD. La visualización se llevó a cabo gracias a la adición de bromuro de etidio en razón de 4 µL/ 50 mL de TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

Posteriormente, se procedió a la purificación de los fragmentos de cDNA cortando las bandas de nuestro interés. La recuperación y purificación del cDNA se obtuvo con el protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA USA). Finalmente, los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al kit TOPO^R TA CLONING (INVITROGENE, The Netherlands), utilizando células competentes de *E. coli* y al plásmido pCR 2.1 TOPO como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA USA) para enviarse a secuenciar y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

Cuantificación de los ARNm de las enzimas lipasa, fosfolipasa, tripsina y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por RT-PCR

De una alícuota de los fragmentos clonados del cDNA, se procedió a realizar la cuantificación del mRNA para las enzimas tripsina, fosfolipasa, lipasa y GAPDH. Los resultados fueron expresados como mRNA de cada enzima/mRNA de la GAPDH. Se ha demostrado que la normalización de cualquier enzima en relación a la GAPDH provee valores representativos y reproducibles para comparar la expresión genética a nivel del mRNA (Solch y Arnold, 1996).

RESULTADOS

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. Labrax

Las levaduras que demostraron sintetizar una mayor cantidad de poliaminas fueron la HF1 *D. hansenii* y la X2180 *S. cerevisiae*. En este orden, también se observó una mayor capacidad de adherencia al intestino de *D. Labrax* (Fig. 1). Por lo que fueron seleccionadas para llevarse a cabo los bioensayos con larvas recién eclosionadas de *D. Labrax*.

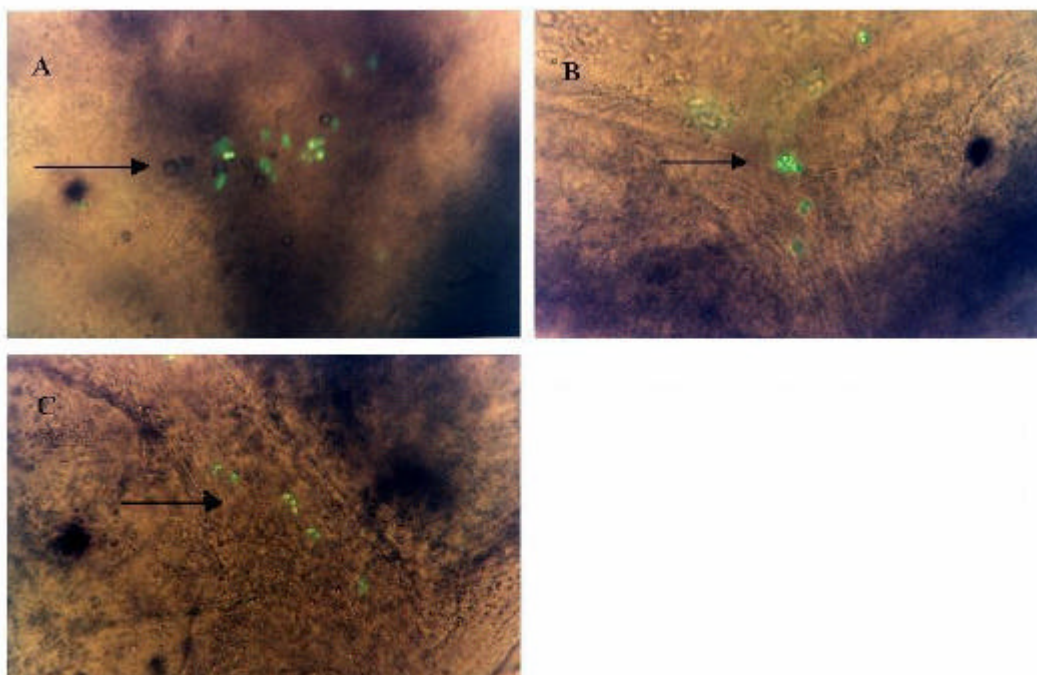


Fig. 1. Micrografía de fluorescencia en donde las flechas muestran a las cepas A) *Debaryomyces hansenii* (HF1), B) *Saccharomyces cerevisiae* (YL12) y 3) *S. cerevisiae* (X2180) adheridas al intestino de larvas de *D. labrax* (40 X).

Efecto de D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180 incorporadas en el alimento de D. labrax

Con el uso de *D. hansenii* cepa HF1 en el alimento, se obtuvo un aumento en la sobrevivencia de larvas hasta un 8.3% con respecto al control. No fue detectado algún tipo de levadura en la dieta control y la presencia de bacterias de género *Vibrio* en el intestino de las larvas fue <100 UFC por cada tratamiento, lo que no resulta significativo para nuestros resultados de producción de poliaminas.

A pesar de los resultados positivos en la sobrevivencia, se obtuvieron menores pesos promedio con respecto al control al usar alimento suplementado con levaduras (Fig. 2). La variación del número de levaduras viables utilizadas en la elaboración del alimento para las larvas no varió significativamente ($p>0.05$) durante su almacenamiento en refrigeración.

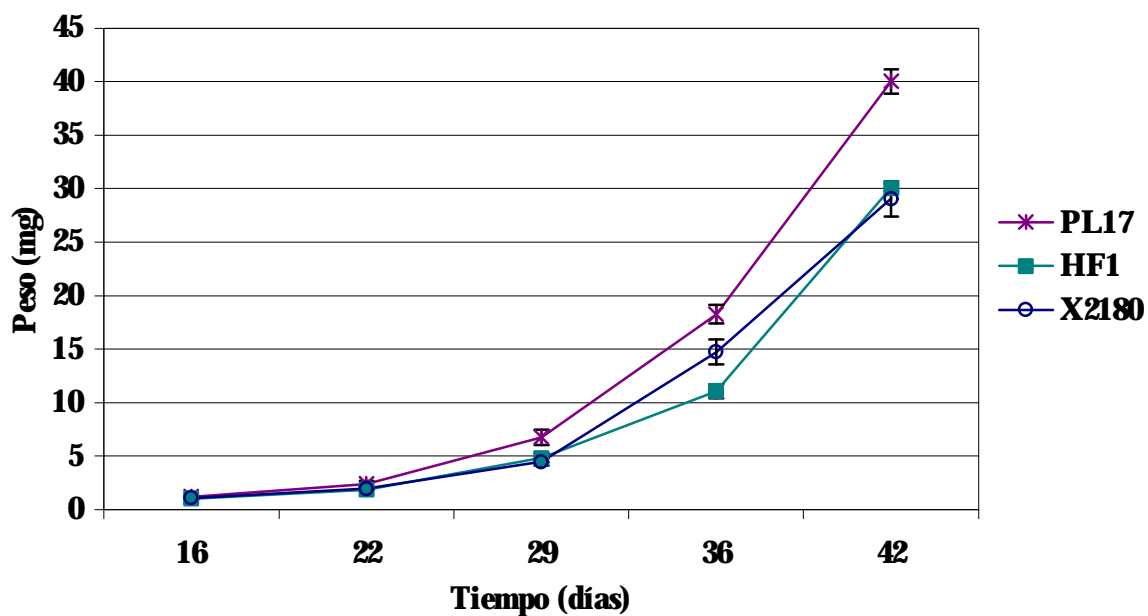


Fig. 2. Peso obtenido de las larvas de *D. labrax* durante su cultivo, alimentado con la dieta control (PL17) y aquellas elaboradas con las cepas HF1 y X2180.

La actividad enzimática tipo tripsina secretada de las larvas en el día 27, es igual con aquellas alimentadas con la dieta control y la elaborada con *D. hansenii* HF1; sin embargo, en ese mismo día la actividad tripsina decrece con la dieta de la cepa X2180. La misma tendencia se observa para el término del experimento (Fig. 3).

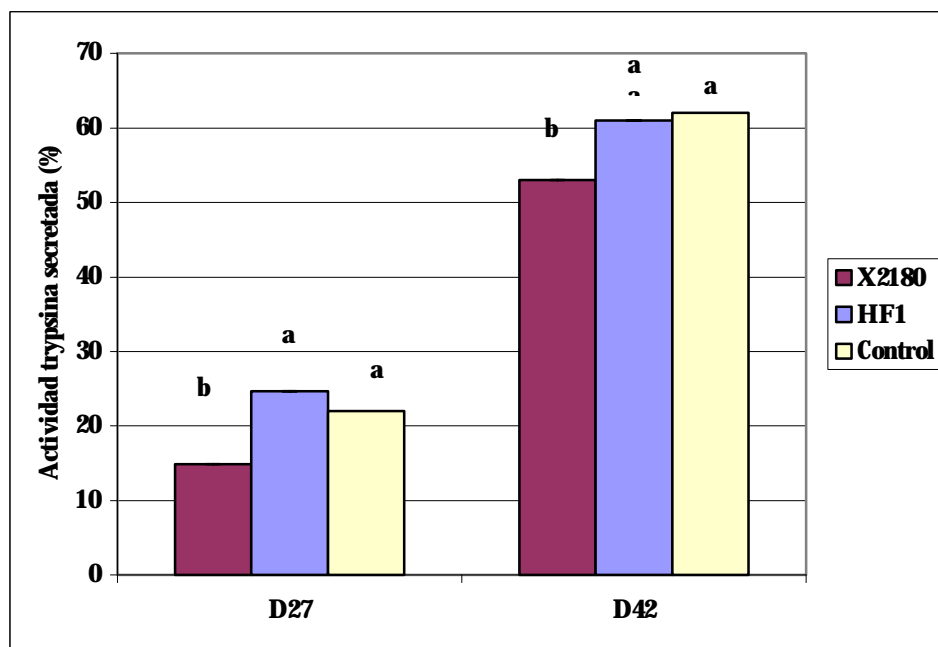


Fig. 3. Actividad tripsina secretada en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

Por otro lado, la actividad enzimática tipo amilasa secretada por las larvas, se incrementa en el día 27 en aquellas alimentadas con la dieta que contiene *D. hansenii* HF1. Al término del experimento, la actividad amilasa secretada se mantiene igual en las larvas alimentadas con las tres dietas (Fig. 4).

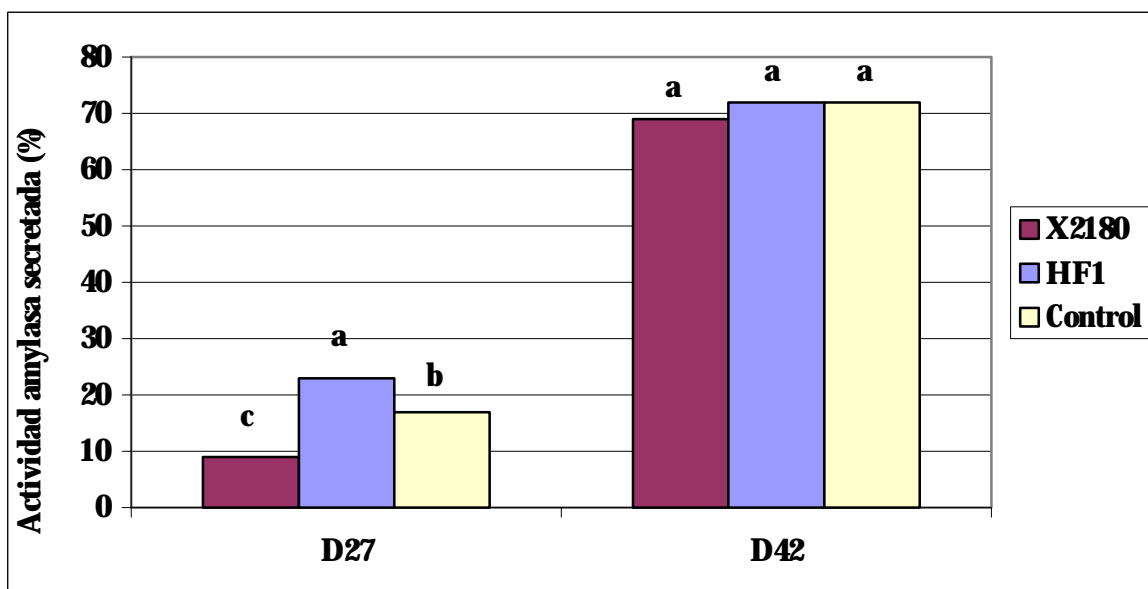


Fig. 4. Actividad enzimática de la amilasa secretada por larvas crecidas hasta el día 27 y 42, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$).

Diseño de sondas de cDNA para la detección de la lipasa de D. labrax

Para el diseño de los primers específicos, se utilizaron las secuencias registradas del Zebrafish *Danio rerio* (No. AW018709, que es un cDNA 5' similar al precursor del triacilglicérido lipasa) y a la del ratón doméstico *Mus musculus* (No. X58426, que es un RNA para una triacilglicérido lipasa hepática).

Primers diseñados para lipasa:

HL dir1	5'	tgtgcttcaacagc	3'
HL dir2	5'	agatcatcca(ct)ggg	3'
HL dir3	5'	gggtggtcgctagat	3'
HL rev1	5'	cgctccaagrctgta	3'
HL rev2	5'	grctgtacccaatca	3'

Se ensayaron las Combinaciones y temperaturas siguientes:

Combinaciones	No. de pares de bases esperado	Temperaturas
dir1-rev1	291	46, 48, 50, 52 °C
dir1-rev2	283	44, 46, 48, 50
dir2-rev1	260	44, 46, 48, 50
dir2-rev2	252	44, 46, 48, 50
dir3-rev1	234	48, 50, 52, 54
dir3-rev2	260	44, 46, 48, 50, 52

De las 6 combinaciones de primers, solamente dieron respuesta positiva el dir1-rev1 (D1R1) y dir3-rev2 (D3R2) (Fig. 5). Una vez purificadas las bandas, se clonaron y se secuenciaron. Del resultado de la secuenciación del cDNA correspondiente a la combinación D1R1DL, se obtuvo un fragmento de 288 pares de bases, reportado ya (Tovar, 2000) como una triacilglicérido lipasa (EC 3.1.1.) con una homología del 85% en 60 pares de bases, a la secuencia de la lipasa hepática del ratón doméstico (*Mus musculus*).

Una vez secuenciados los fragmentos de cDNA de la lipasa y confirmada su homología con secuencias conocidas registradas en las bases de datos, se comenzará a cuantificar el mRNA de las enzimas lipasa, fosfolipasa y tripsina, utilizando el mRNA de la enzima GAPDH como estándar interno (resultados no mostrados), para aquellas larvas alimentadas con levaduras.

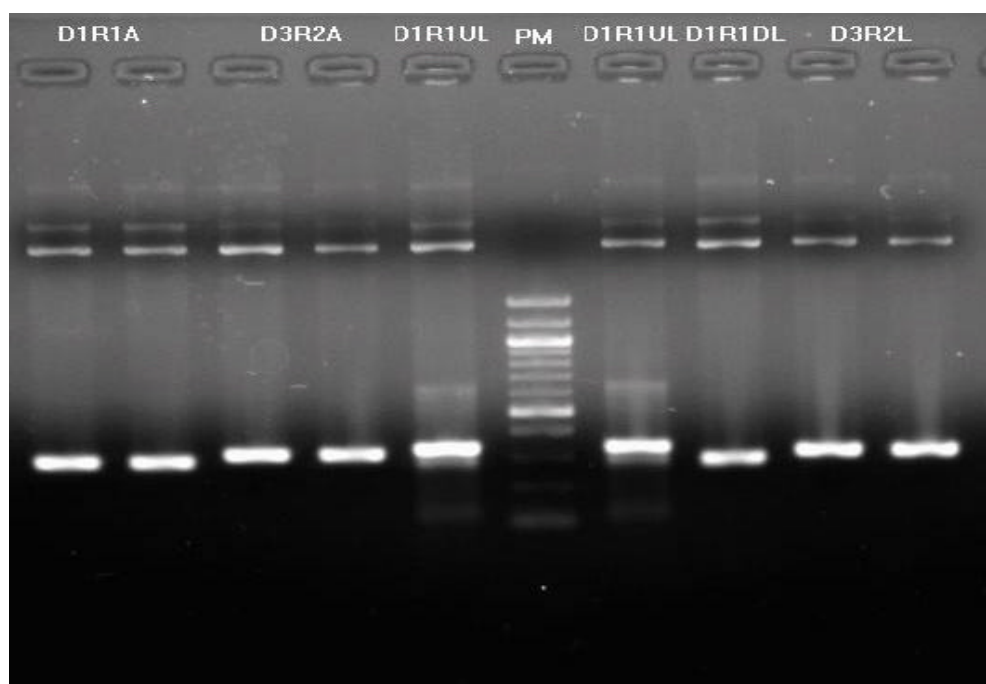


Fig 5 . Electroforésis de agarosa que muestra los productos de amplificación de los cDNA puros –provenientes de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.

DISCUSION

Debido a que el recambio celular en el epitelio intestinal es mayor que en cualquier otro tejido, las poliaminas son vitales para una función y estructura adecuada del tracto digestivo. Además de la síntesis *in situ*, se ha demostrado que en el intestino la demanda requiere de fuentes externas, particularmente aquellas poliaminas suministradas con la dieta y la contribución de la microflora indígena (Bardocz *et al.* 1996).

Resulta interesante la cantidad de poliaminas que son detectadas en el medio de cultivo de las levaduras, y que sugiere una forma de administrarlas directamente al intestino de la larva aprovechando la capacidad de adherencia de las levaduras. La mejor respuesta de adhesión al intestino de la lubina fue observado con *D. hansenii* cepa HF1, seguido de *S. cerevisiae* cepa YL12, y después con *S. cerevisiae* cepa X2180 (Fig. 1). Previos resultados (Vázquez-Juárez *et al.* 1997; Andlid *et al.* 1995) han demostrado que *D. hansenii* HF1 tiene una gran afinidad a la mucosa intestinal de peces, lo que sugiere que el intestino es un importante lugar para el crecimiento y proliferación microbiana en especies en cautiverio, y la mucosa gástrica una rica fuente de nutrientes para estos microbios (Andlid *et al.* 1995).

El aporte de poliaminas al sistema digestivo del pez por las levaduras, puede resultar de mucha importancia en las etapas larvarias para la maduración de su sistema digestivo y lograr una mejor sobrevivencia. Se sabe que durante el primer año de vida la lubina europea experimenta un lento crecimiento comparado con sus etapas posteriores de desarrollo (Casti *et al.* 1989). También se ha demostrado que en el primer mes de vida, es el tiempo mas crítico en el crecimiento y desarrollo de esta especie (Péres *et al.* 1998) por lo que es de primordial importancia incluir probióticos en los alimentos para contribuir al aporte de moléculas estimuladoras del crecimiento y diferenciación celular. Debido a que las levaduras no penetran a los enterocitos de las larvas, suponemos que existe una secreción o liberación de poliaminas como resultado del metabolismo de éstas, lo que inducen el incremento de la sobrevivencia como lo fue observado por Péres *et al.* (1997). En este trabajo, se obtuvo un aumento del 33% de sobrevivencia en larvas alimentadas con 0.33% de espermina pura. Se ha demostrado que estas moléculas son consideradas un factor importante en la maduración de las membranas de borde de cepillo del intestino en mamíferos (Greco *et al.* 2000).

A los 41 días de haber iniciado el cultivo, se detectaron 2.5×10^2 y 1.5×10^2 levaduras en el intestino de larvas alimentadas con *D. hansenii* HF1 y *S. cerevisiae* X2180 respectivamente, lo que confirma nuestros resultados de adhesión y efecto de la dieta enriquecida con la primera cepa. Sin embargo, la obtención de un bajo peso promedio de larvas alimentadas con levaduras, pudo haber sido provocado por el cambio de textura adquirido por el alimento al ser humedecido y luego secado en la estufa, ya que éste se sedimentó en los acuarios a una velocidad mayor que la dieta control.

El efecto positivo *D. hansenii* HF1, lo podemos evidenciar al observar una modulación de la actividad enzimática digestiva en los primeros 27 del desarrollo larvario de la lubina. La Fig. 4 muestra que la secreción de la amilasa en el día 27 se ve favorecida con respecto al control ($P < 0.05$) cuando es alimentada con la dieta que incluye dicha cepa. Esto también se puede evidenciar cuando se analizan los cocientes de actividad enzimática de la Tabla 3. El incremento significativo ($P < 0.05$ contra el control) de la actividad de la maltasa (32.8%), y de las enzimas de las células con borde de cepillo, fosfatasa alcalina (62.5%) y leucin-amino-peptidasa (47%) sugieren el paso de una digestión citosólica a una digestión extracelular (Tovar *et al.* 2000b). Se ha demostrado que un bajo nivel de actividad de enzimas intracelulares (citosólicas) y el aumento de actividad de las enzimas de las células con borde

de cepillo, caracterizan la maduración de los enterocitos en mamíferos (Henning, 1987) y en peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1994).

Tabla 3. Cocientes de actividad enzimática.

	HF1	X2180	Control
Día 27			
AP	56 ± 5.4 ^a	7 ± 2.0 ^c	21 ± 3.6 ^b
LAP	85 ± 10.2 ^a	7 ± 2.0 ^c	45 ± 14.3 ^b
Maltasa	6.4 ± 0.75 ^a	2.4 ± 0.42 ^c	4.3 ± 0.14 ^b
Día 42			
AP	303 ± 67.4	324 ± 80.8	232 ± 51.9 ns
LAP	54 ± 5.6 ^b	74 ± 21.8 ^{a b}	105 ± 26.2 ^a
Maltasa	53 ± 3.5	66 ± 18	41 ± 5 ns

AP- Fosfatasa alcalina

LAP – Leucin-aminopeptidasa

ns – valores sin diferencia significativa

Los valores con diferentes letras poseen diferencia significativa ($p < 0.05$).

Otro efecto positivo de la administración de levaduras productoras de poliaminas, lo podemos observar al incrementarse la sobrevivencia con respecto al control ($P < 0.05$). Anteriormente Cahu y Zambonino-Infante (1994) observaron que la maduración temprana de los enterocitos de peces conduce a la obtención de mayores tasas de sobrevivencia larvaria.

El efecto de la maduración del sistema digestivo, acompañado de la administración de probióticos ha sido bien documentado en mamíferos pero no en peces. Se ha observado que en ratas destetadas (20-30 días) y oralmente alimentadas con *S. boulardii* (100 mg/día), incrementan su actividad específica de sacarasa (157%) y maltasa (47.5%) como producto de la liberación de poliaminas (55% espermidina y 43% espermina) (Buts *et. al.* 1994).

La caracterización parcial del gen de la lipasa, nos permitirá conocer aún mas el papel que juegan los probióticos en el desarrollo y expresión del gen que codifica esta enzima digestiva durante la etapa larvaria de la lubina. Este es el tercer trabajo que reporta la clonación y secuenciación de un fragmento de una lipasa en peces marinos. Previamente, Gjellesvik *et al.* (1994) reportaron la clonación del gen de la carboxilester lipasa del salmón del Atlántico *Salmo salar*; y más recientemente, Clark *et al.* (1998) reportaron un fragmento de una lipasa de Zebrafish *Danio rerio* que posee semejanza al precursor de la triacilglicerido lipasa del ratón (Chang *et al.* 1991).

Con este estudio, se complementará la información concerniente al efecto de dietas compuestas en el crecimiento y desarrollo del sistema digestivo en peces, ya que los reportes del uso de dietas compuestas en etapas larvarias tempranas son escasos (Zambonino-Infante y Cahu, 1999).

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo son parte del proyecto ECOS-ANUIES M98-S03 y proyecto CONACyT 25956B. Dariel Tovar agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. Becario 84016), al Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), a Patrick Quazuguel, Marie Madelaine Legall de la Unité Mixte de Nutrition de Poissons (INRA-IFREMER) por el apoyo recibido.

REFERENCIAS

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L.. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) microb. Ecol., 30, 321-324.
- Bardocz, 1993. The role of dietary polyamines. European Journal of Clinical Nutrition, 47, 683-690.
- Bardocz, S., White, A., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.G., Pusztai, A., 1996. Uptake and bioavailability of dietary polyamines. Biochem. Soc. Trans. 24 (2), 2265.
- Bessey, A.O., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum J. Biol. Chem., 164,321-329.
- Bradford, M.M., 1974. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Buts, J.P., De Keyser, N., Kolanowsky, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Digestive Diseases and Sciences, 38 (6), 1091-1098.
- Buts, J.P., Keyser, N., Raedemaeker, L.. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, Pediatric Research, 36 (4), 522-527.
- Byron, J.K., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Davis, R.W., Stevens DA., 1995. Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. Infect.Immun. 63, 478-485.
- Cahu, Ch., Zambonino-Infante, J.L., 1994. Early weaning of seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol., 2, 213-222.
- Casti. A., Orlandini, G., Soldi, M.E., Davalli, P., Reali, N., Viviani, R., 1989. Tissue polyamine concentration in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): change with age and seasonal of the year. Ital. J. Biochem., 38, 369-373.
- Clark M., Johnson S.L., Lehrach H., Lee R., Li, F., Marra M., Eddy S., Hillier L., Kucaba T., Martin J., Beck C., Wylie T., Underwood K., Steptoe M., Theising B., Allen M.
- Bowers Y., Person B., Swaller T., Gibbons M., Pape D., Harvey N., Schurk R., Ritter E., Kohn S., Shin T., Jackson Y., Cardenas M., McCann R., Waterston R., Wilson R., 1998. "WashU Zebrafish EST Project"; Unpublished.
- Chang S.F., Netter H.J., Will H., 1991. "Characterization of cDNA encoding the mouse hepatic triglyceride lipase and expression by in vitro translation". FEBS Lett., 289, 69-72.
- Crane., R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochim. Biophys. Acta 554: 262-267.
- Dabrowski, K.,Glogoswki, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. Hydrobiologia, 54, 129-134.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. Gastroenterology, 95, 112-116.
- FAO, 1986-1995. Aquaculture Statistics, Fisheries Circular No. 815, Revision 9.
- Gatesoupe, J. F., 1993. Development of fish larvae and rearing conditions in hatcheries. Coastal and stuarine studies. In: Lahlou, B. and Vitiello P. (eds), American Geophysical Union, Washington DC, Capitulo 10, pp. 159-172.
- Gatesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture, Aquaculture, 180, 147-165.
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B., Male, R., 1994. Pancreatic carboxylester liapse from atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modelling of terciary structure, Eur. J. Biochem. 226, 603-612.
- Greco, S., Hugueny, I., George, P., Perrine, P., Louisot, P., Biol. M.C. 2000. Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. J. Biochem., 345, 69-75.
- Henning, S.J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. Physiology of the gastrointestinal tract, pp 285-300., 2nd edition. edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., and Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. J. Nutri., 118, 515-520.
- Josupeit, H., 1995. European markets for seabass, seabream and turbot, Aquaculture Europ. 20 (2), 6-12.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, Aquaculture, 148, 313-322.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Development of proteolytic enzymes in fish and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.
- Mallé, P., Vallé, M., Bouquelet, S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition, Journal of AOAC, vol. 79; No. 1, pp. 43-49.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. Biochem. Biophys. Acta, 321, 282-295.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Determiration de l'alfa-amilase par une microtechnique. Annal. Biol. Clin., 26,133-142.
- Nicholson, J. A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. Anal. Biochem., 63,110-117.

- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 16, 479-485.
- Sherr, B. F., Sherr, E.B., Fallon, R.D., 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 53 (5), pp. 958-965.
- Solch, J.P., Arnold, G.L., 1996. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis*, 17,30-39.
- Tovar-Ramírez, D., 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000a. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the european seabass larvae *Dicentrarchus labrax*. AQUA 2000, NICE FRANCE, 2-6 mayo del 2000.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000b. Improvement of gut maturation in sea bass larvae by yeast incorporation in diet. (En preparación).
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(1), 64-71.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 109A, No. 2, pp. 209-212
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1999. High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development, American Society for Nutritional Sciences, pp. 1195-1200.



ELSEVIER

Aquaculture 204 (2002) 113–123

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae

D. Tovar ^{a,b}, J. Zambonino ^b, C. Cahu ^b, F.J. Gatesoupe ^b,
R. Vázquez-Juárez ^{a,*}, R. Lésel ^c

^a CIBNOR S.C., P.O. Box 128, 23000 La Paz BCS, CP 23000, Mexico

^b Fish Nutrition Laboratory, Unité Mixte INRA-IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

^c Institut National de la Recherche Agronomique, 147 rue de l'Université, 75338 Paris Cédex 07, France

Received 6 December 2000; received in revised form 9 April 2001; accepted 9 April 2001

Abstract

Yeasts produce polyamines, and some strains have a strong adhesion potential to intestinal mucus, an important condition for probiotic efficiency. The aim of this study was to explore an *in situ* production of polyamines by *Debaryomyces hansenii* HF1 (DH), a yeast strain isolated from fish gut, in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* X2180 (SC) (Goteborg University Collection). The production of polyamines by DH was three times higher than that of SC. The main polyamines were spermine and spermidine, produced at a similar level. Both strains adhered to the gut of sea bass larvae. When the yeasts were introduced into a compound diet, the colonization was effective in the larvae (10^4 CFU g^{-1} on a body weight basis). The DH diet led to an increase in amylase secretion in 27-day-old larvae in comparison with the control diet. The secretion of amylase and trypsin was lower in the SC diet, and some delay in trypsin secretion was still observed in this group at day 42. At day 27, the activity of brush border membrane enzymes was stimulated by the DH diet, and delayed by the SC diet, in comparison with the control diet. The survival of the larvae was also increased in the DH diet, but the growth rate was lower than that in the control group. This may be due to the introduction of live yeast into the diet, which needs to be optimised. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Polyamines; Marine fish larvae; Gut maturation; Yeast adhesion; Gut colonization

* Corresponding author. Tel.: +52-112-536-33 ext. 3339; fax: +52-112-536-25.

E-mail address: rvazquez@cibnor.mx (R. Vázquez-Juárez).

1. Introduction

Several studies have recently documented a differentiation process in digestive functions during development of marine fish larvae species, such as European sea bass (Cahu and Zambonino Infante, 1995), *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999) and *Scianops ocellatus* (Buchet et al., 2000). This phenomenon is well-known in other vertebrates and particularly in mammals. Different nutritional factors, and particularly polyamines, are involved in the differentiation and maturation of the intestinal tract in mammals (Dufour et al., 1988). Recently, the role of polyamines in gut maturation of sea bass larvae was evidenced by dietary incorporation of purified spermine (Péres et al., 1997). High spermine levels were incorporated in the diet to compensate the loss of spermine by the leaching from the microparticulated diet in seawater. The settlement of microorganisms secreting polyamines in the larval gut may constitute a way to provide a regular supply of polyamine for the host. Yeast could be an appropriate organism because some strains synthesize and secrete different polyamines molecules (Buts et al., 1993), and they have strong adhesion potential to intestinal mucus in fish (Vázquez-Juárez et al., 1997; Andlid et al., 1998). Besides polyamine production, yeast may improve fish health as antagonists to pathogens and by immunostimulation (Andlid et al., 1995). These multiple beneficial effects could make yeast promising probiotics.

The aim of the present study was to determine whether yeast strains (1) produce polyamines, (2) adhere to the digestive tract of sea bass larvae, and (3) accelerate the maturation of the larval gut.

2. Materials and methods

2.1. Yeasts and polyamine production

Debaryomyces hansenii (strain HF1, CBS 8339) was isolated from the gut of rainbow trout (Andlid et al., 1995). This strain was compared with *Saccharomyces cerevisiae* X2180 (Goteborg University Collection).

The yeasts were cultivated at 25°C in yeast extract–peptone–dextrose broth (YPD) (Sherman, 1991). The cultures were centrifuged (5 min at 1000 × *g* at 4°C) at the early stationary phase determined by spectrophotometry at 550 nm. The supernatant was filtered at 0.2 μm to obtain free-cell culture medium (FC). The polyamines were also extracted from the pellet with two volumes (v/w) of 0.2 M perchloric acid (PCA) and homogenized with two volumes of glass beads (0.3–0.5 mm) by stirring 10 times at 0°C for 30 s. After extraction, the samples were centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at 4°C and 10-fold diluted with PCA. This fraction was considered as the cell homogenate (H). The amines were derivatized with dansyl chloride before HPLC analysis according to the method of Malle et al. (1996). The HPLC apparatus was Waters 600E (Millipore), equipped with a Nova-Pack C18 reverse phase column (390 mm × 39 mm, 4-μm size particles). Measurements of polyamine concentration were made at 284 nm by comparing the integrated surface area of peaks with areas of dansylated polyamines (putrescine

P-7505, spermidine S-0381 and spermine S-2876 from Sigma) of known concentration on a standard curve.

2.2. Animals and diets

Larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were provided by the marine farm Aquanord (Gravelines, France). The larvae were reared at Ifremer, Centre de Brest till 42 days post-hatching (dph). The larvae were distributed into 12 conical fiber glass tanks (35 l) at 2 dph, with an initial stocking density of 60 larvae l^{-1} . The physical rearing conditions were as previously described (Cahu and Zambonino Infante, 1994). Mouth opening occurred at 5 dph, and the larvae were kept in the dark until 9 dph without food according to Chatain (1997). From 10 dph onwards, the larvae were fed one of three compound diets allotted to four tanks each. The basal diet (patent 99-050449) was formulated according to Cahu and Zambonino Infante (2001a) and contained 58.4% protein, 21.3% lipid (11.6% neutral lipid and 7.8% phospholipid) and 12.2% ash related to dry matter. Moisture was 9.8%. The dietary ingredients were mixed with water, pelletized and dried at 50°C for 20 min. The pellets were sieved to obtain particles of two size ranges, 120–200 and 200–400 μm . The yeasts, *D. hansenii* HF1 and *S. cerevisiae* X2180, were cultured in YPD broth till the early stationary phase, then the suspensions were pulverized onto the diets at the rate of 0.9 ml g^{-1} (ca. 7×10^5 CFU g^{-1}) to obtain the diets DH and SC, respectively. Then, these diets were dried again in a drying oven at 37°C for 45 min.

The larvae were fed in large excess by using belt feeders for 18 h/day. The particle size was 120–200 μm from 10 to 20 dph, then 200–400 μm afterwards.

2.3. Sampling and dissection

Ten larvae per tank were sampled at 42 dph in order to obtain final weight. At the end of the experiment, survival was determined by counting the individuals from each tank. The rate of spinal malformations at 42 dph was determined by examining 50 larvae per tank under a binocular microscope. On 27 and 42 dph, 50 larvae per tank were collected for enzymatic assays prior to daily food distribution. They were immediately frozen and stored at -80°C . The larvae were dissected as described by Cahu and Zambonino Infante (1994), in order to separate pancreatic and intestinal segments.

2.4. Enzymatic measurements

The dissected segments were homogenized in five volumes (v/w) of cold distilled water (4°C). Trypsin and amylase were assayed according to Holm et al. (1988) and Métais and Bieth (1968), respectively. Brush border membranes (BBM) were purified from the intestinal segment homogenate according to a method developed for intestinal scraping (Crane et al., 1979; Zambonino Infante et al., 1997). Enzymes of the BBM, aminopeptidase N (AN), maltase and alkaline phosphatase (AP) were assayed according to Maroux et al. (1973), Dahlqvist (1970) and Bessey et al. (1946), respectively. Assay

of a cytosolic enzyme, leucine–alanine peptidase (leu–ala), was performed using the method of Nicholson and Kim (1975). Protein was determined by the procedure of Bradford (1976). Data on pancreatic enzymes, amylase and trypsin were expressed as a ratio of segmental activity/amylase (or trypsin) content in intestinal segment (IU/larva segment) related to amylase (or trypsin) content in pancreatic + intestinal segment (total amylase- or trypsin-content). This ratio reflects the secretion of pancreatic enzymes (Zambonino Infante et al., 1996). Data on intestinal enzymes were expressed as a ratio of specific activity (IU/mg protein) of BBM enzymes, AP, AN and maltase, related to activity of the cytosolic enzyme (leu–ala).

2.5. Microbiological methods

To investigate whether the yeast adhered to the digestive tract of larval sea bass, the yeast cells were labelled with 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino)-fluorescein hydrochloride (DTAF, Sigma D 0531) according to a method modified from Sherr et al. (1987). DTAF (2 mg) were homogenized in 10 ml of a 0.05 M Na_2HPO_4 –0.85% NaCl solution. Then, the solution was filtered at 0.2 μm , and all the following manipulations were done in sterile conditions. Yeast cultures in YPD broth were centrifuged for 10 min at $2700 \times g$, and the pellets were resuspended in the DTAF solution. The suspensions were incubated in a water bath at 37°C for 2 h. After a second centrifugation, the pellets were rinsed in 10 ml of half-strength seawater (18 practical salinity units, psu), then centrifuged again. The pellets were resuspended in a mixture of 2 ml glycerol, 4 ml seawater (36 psu), and 4 ml distilled water. Aliquots of 1 ml were stored in liquid nitrogen for adhesion test, and 0.5 ml were diluted to count the viable yeast cells (ca. 10^7 CFU ml^{-1} , counted on YPD agar). Sea bass larvae were euthanized at 41 dph with 2-phenoxyethanol (1 ml l^{-1}), and the intestine was dissected to obtain ca. 5-mm-long segments. These segments were introduced into cell culture inserts fitted with 8- μm porous membrane (Falcon 3097). The inserts were placed into a 24-well plate (Multiwell Falcon 3504), in wells containing 1 ml of the labelled yeast and 1 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; Sigma P 4417). After 30 min incubation, the gut segments were rinsed three times by moving the inserts into three consecutive wells containing 2 ml of clean PBS. Finally, the fluorescent yeast remaining on the gut was observed under an epifluorescence microscope (magnification $500 \times$).

By the end of the rearing experiment, sea bass larvae were sampled for microbiological counts according to the method of Gatesoupe (1995). The yeast was counted on YPD agar supplemented with antibiotics (chloramphenicol, 1 mg l^{-1} ; polymyxin B sulfate, 1.6 mg l^{-1} ; amoxicillin, 2.5 mg l^{-1}).

2.6. Statistical analysis

Results are given as means \pm SD ($n = 4$). Data on survival, trypsin and amylase secretion levels were arcsine transformed ($\arcsin x^{1/2}$). The variance homogeneity of the data was checked using Bartlett's test (Dagnelie, 1975). Data were compared by

Table 1
Polyamine concentration (nM ml⁻¹) in cell homogenate (H) and free-cell culture medium (FC) at the early stationary phase of development of *D. hansenii* HF1 and *S. cerevisiae* X2180

Strain	Putrescine		Spermine		Spermidine	
	H	FC	H	FC	H	FC
<i>D. hansenii</i> HF1	6.13	6.22	6.38	38.67	17.33	31.54
<i>S. cerevisiae</i> X2180	1.12	2.11	5.25	13.40	6.84	10.84

one-way ANOVA followed by Neuman Keul's multiple range test when significant differences were found at the 0.05 level.

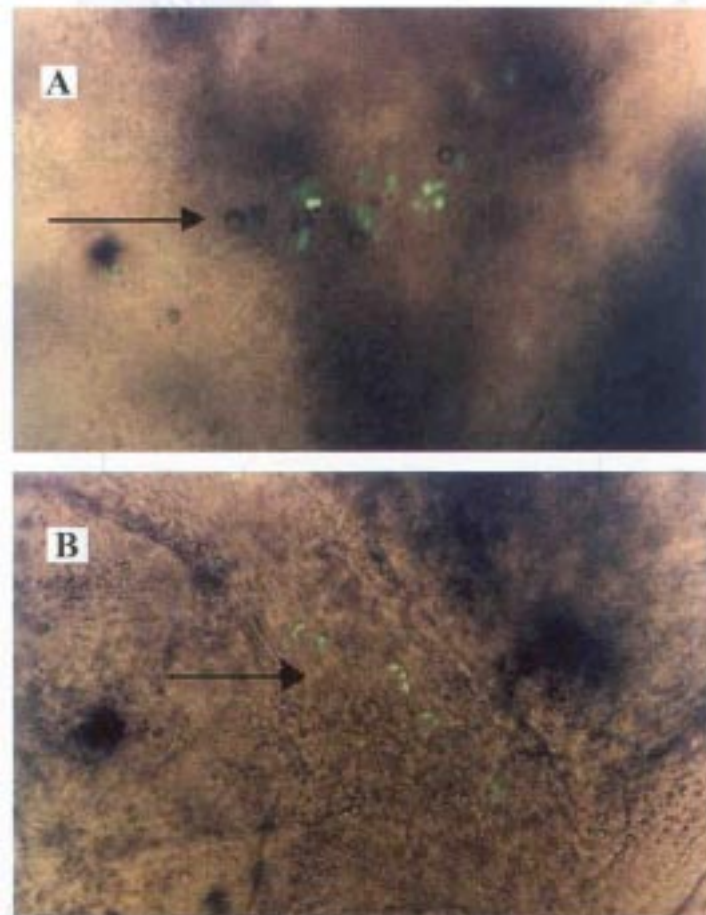


Fig. 1. Fluorescently labelled yeasts (A) *D. hansenii* HF1 and (B) *S. cerevisiae* X2180 adhering to the gut of sea bass larvae (500×).

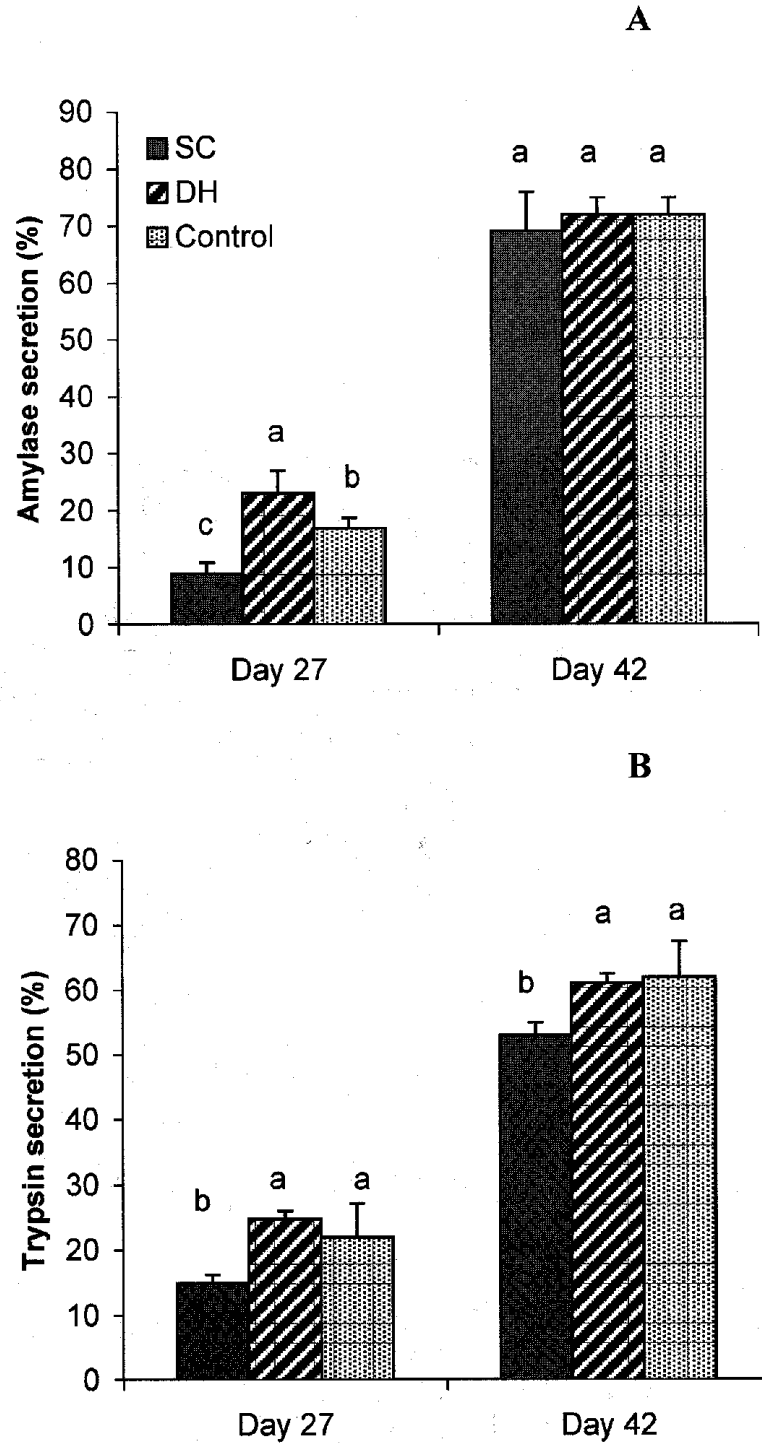


Fig. 2. Percent amylase (A) and trypsin (B) activity in the intestinal segment related to total activity (pancreatic plus intestinal segment) per larvae at 27 and 42 dph. Means \pm SD ($n = 3$) with different superscripts for the same day are significantly different ($P < 0.05$).

3. Results

Three polyamines putrescine, spermidine and spermine were produced by the two yeasts, but the amounts retrieved in the culture medium of *D. hansenii* were three times higher than those of *S. cerevisiae* (fraction FC, Table 1). Spermine and spermidine were the main polyamines produced by the two strains. The spermidine content in *D. hansenii* cells was double of that observed in *S. cerevisiae* (fraction H). The difference in spermine contents was slight, but putrescine was six times more abundant in *D. hansenii* cells than in *S. cerevisiae*.

The two strains adhered to the digestive tract of sea bass at 41 dph, as fluorescently labelled cells remained on the intestinal segments after three rinsings (Fig. 1). This was confirmed by the recovery of 2.5×10^2 colony forming units (CFU) of yeast per larva fed with DH, and 1.5×10^2 CFU per larva fed with SC. Yeast was not detected in the larvae fed with the basal diet.

At 42 dph, survival was significantly higher in DH group ($44 \pm 2.1\%$), compared to that observed in the control group and the SC group ($36 \pm 3.9\%$ and $35 \pm 1.6\%$, respectively). A larval wet weight of 40 ± 1.6 mg was reached at 42 dph in the control group, and it was significantly higher than that of DH (30 ± 1.8 mg) and SC (29 ± 2.1 mg) groups. Rate of spinal malformation was significantly lower in the group fed with DH diet ($0.9 \pm 0.7\%$) than in the control group and group fed with SC ($5.9 \pm 1.34\%$ and $4.1 \pm 1.22\%$, respectively).

Fig. 2A shows the ratio between amylase content in intestinal segment related to amylase content in pancreatic + intestinal segment (total amylase content). This ratio represents the amylase secretion in 27- and 42-dph larvae. Pancreatic secretion of amylase was threefold higher in DH larvae than in SC larvae, and 1.5 times higher than in the control group at 27 dph. Amylase secretion increased in the three dietary groups between 27 and 42 dph to reach the same level at 42 dph. Trypsin secretion (Fig. 2B), assessed in the same way as amylase, was at a similar level in the control group, and in the DH group at 27 dph, then increased similarly at 42 dph. Trypsin secretion in SC group was lower than in the two other groups at 27 and 42 dph.

Table 2

Activity of brush border membrane enzymes versus cytoplasmic leucine–alanine peptidase in 27- and 42-day-old sea bass larvae fed with control diet or diet containing yeast X2180 (SC diet) or *D. hansenii* (DH diet)

Data are given as means \pm SD ($n = 3$). Values with a different superscript letter in a same row are significantly different ($P < 0.05$).

	SC	DH	Control
<i>Day 27</i>			
AP ($\times 10^6$)	7 ± 2.0^c	56 ± 5.4^a	21 ± 3.6^b
AN ($\times 10^6$)	21 ± 4.5^c	85 ± 10.2^a	45 ± 14.3^b
Maltase ($\times 10^6$)	2.4 ± 0.42^c	6.4 ± 0.75^a	4.3 ± 0.14^b
<i>Day 42</i>			
AP ($\times 10^6$)	324 ± 80.8	303 ± 67.4	232 ± 51.9
AN ($\times 10^6$)	74 ± 21.8	65 ± 19.8	105 ± 26.2
Maltase ($\times 10^6$)	66 ± 18.0	53 ± 3.5	41 ± 5.0

Activity ratio of the three intestinal enzymes assayed, AP, AN and maltase, related to leu–ala, was higher for DH group than in the two other dietary groups at day 27. The SC group exhibited the lowest ratios (Table 2). Between day 27 and day 42, specific activity of BBM enzymes increased and specific activity of the cytosolic enzyme decreased for the three dietary groups. At day 42, significant difference did not appear in these ratios between the three dietary groups.

4. Discussion

Growth of sea bass larvae fed exclusively with the compound diet was good in the three dietary groups, compared to that generally obtained with compound diet. This formulated compound diet meets the nutritional requirements of sea bass larvae as reported in Cahu and Zambonino Infante (2001a). The pulverization of yeast suspension on the diet resulted in lower growth rate. It can be assumed that the process of yeast incorporation changed some physical properties of the microparticles. In particular, a decrease of buoyancy was observed, and the sprayed particles sank faster. In this case, feed ingestion by larvae could be reduced. Yeast incorporation during raw material mixing should be considered in further experiments. *D. hansenii* HF1 is a strain isolated from rainbow trout with a high capacity to colonize the gut of this fish (Andlid et al., 1995). The present results do not indicate that the capacity to adhere to larval sea bass intestine was significantly different from that of the reference strain *S. cerevisiae* X2180. However, the colonization level observed in both strains was high in comparison with that observed in trout intestine. It corresponded to 10^4 CFU g^{-1} on a body weight basis, i.e. the same level as that observed by Andlid et al. (1995) but on an intestinal weight basis. The colonization process has been partly explained in terms of the ability of yeast cells to adhere to fish mucus mediated by both specific adhesion and cell surface hydrophobicity (Vázquez-Juárez et al., 1997). Andlid et al. (1995) suggested that the intestine is an important reproduction site and that the yeast can use mucus as the sole source of nutrients. This could contribute to increase yeast numbers in the intestine followed by an increase in polyamine secretion.

Spermine and spermidine were extensively excreted from the cells, whereas putrescine remained at a relatively low level especially in *S. cerevisiae*. The production of the three polyamines in *D. hansenii* was higher than in the reference strain. Most of the polyamines have been reported to have a biological role in cell metabolism and proliferation by stimulating DNA, RNA and protein synthesis (Tabor and Tabor, 1984; Bardócz et al., 1993). Particularly, spermine and spermidine are involved in the differentiation and maturation of the intestinal tract in mammals (Buts et al., 1993). Recently, the role of polyamine in gut maturation of sea bass larvae was evidenced by dietary incorporation of purified spermine (Péres et al., 1997).

Indeed, digestive tract of marine fish is not completely formed at hatching and undergoes major biochemical and physiological changes over several weeks. The digestive processes appear sequentially during the first weeks of life in fish larvae (Dabrowski, 1986; Beccaria et al., 1991). Secretory functions of exocrine pancreas take place chronologically after synthesis functions (Cahu and Zambonino Infante, 1994).

The acquisition of an efficient secretory function in pancreas characterizes the maturation of pancreas. In intestine, cytosolic digestion is well-developed in young larvae and decreases around 25 dph in sea bass, concurrent to an increase of brush border membrane enzyme activity (Cahu and Zambonino Infante, 1995). The change from cytosolic digestion to membranous digestion in enterocyte reflects the change from a larval digestion to an adult mode of digestion. This phenomenon, common to all the studied vertebrates, constitutes the maturation of intestine (Henning, 1985). The maturation level of intestinal digestion can be evaluated by considering the segmental activity ratio of brush border enzymes vs. leu–ala peptidase, which reflects the relative importance of the brush border membrane digestion compared to intracellular digestion.

In our study, elevated levels of amylase and trypsin activities in 27-dph larvae fed with *D. hansenii* showed that the maturation of secretory functions of pancreas in this group was earlier than in the other groups. At day 42, secretion levels of amylase were similar in the three groups, suggesting that the pancreatic maturational process for this enzyme was achieved in the three groups. However, the level of trypsin secretion was still inferior at 42 dph in the larvae fed with *S. cerevisiae* in comparison with the two other groups. It can be suggested that this diet including *S. cerevisiae* tends to delay pancreas maturation. The ratio of activity of brush border membrane enzymes related to cytosolic enzymes was more elevated at 27 dph in group fed with *D. hansenii*, suggesting that this strain improved gut maturation. Intestinal maturation was achieved in the three groups at 42 dph.

In this experiment, the early maturation of pancreas and intestine gave increased survival as shown by Cahu and Zambonino Infante (2001b).

The facilitation of gut maturation and the consequently improvement of survival in group fed with DH can be attributed to the effect of high spermidine and spermine secretion by *D. hansenii* HF1. According to Buts et al. (1993), polyamines initiate and control the expression of adult pattern of intestinal cell functions by acting directly on gene expression at transcriptional and post-transcriptional level. Vertebrate intestinal cells might contain a “local timer” genetically hard-wired (Diamond, 1986), switching on differentiation at the age of 21 day in rats (Dufour et al., 1988) and around 25 days in sea bass (Cahu and Zambonino Infante, 1994). Polyamines act as modulating factors of an internal biological clock (Dufour et al., 1988).

Dietary incorporation of *S. cerevisiae* X2180 did not trigger gut maturation. Two hypotheses need to be tested: (1) the polyamine secretion level of this strain is too low to trigger gut maturation in sea bass, and (2) this strain produced other compound(s) that counteracted the effect on gut maturation. The introduction of live yeast into dry diet for fish larvae deserves further attention. This may be a way to deliver polyamines in situ for gut maturation, but the preparation of the diet needs to be improved.

Acknowledgements

This study is a part of Programme PM98S03, supported by the French–Mexican Committee ECOS-Nord and partially financed by Project 25956B from CONACYT. The first author was also supported by Fellowship 84016 from CONACYT.

References

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30, 321–334.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L., 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 115–126.
- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztaí, A., 1993. Polyamines in food—implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.* 4, 66–71.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture* 99, 339–354.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buchet, V., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184, 339–347.
- Buts, J.P., De Keiser, N., Kolanowski, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Role of dietary polyamines. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1091–1098.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213–222.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431–437.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001a. The phospholipid fraction of dietary lipid supply is determining for sea bass larval development. *J. Nutr.*, in press.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001b. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, in press.
- Chatain, B., 1997. Development and achievements of marine fish-rearing technology in France over the last 15 years. *Hydrobiologia* 358, 7–11.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264–267.
- Dabrowski, K., 1986. Ontogenical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 639–655.
- Dagnelie, P., 1975. Les méthodes de l'inférence statistique. In: Ducolot, J. (Ed.), *Théorie et Méthodes Statistiques*, vol. 2, Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, pp. 1–463.
- Dahlqvist, A., 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzym. Biol. Clin.* 11, 52–56.
- Diamond, J.M., 1986. Hard-wired local triggering of intestinal enzyme expression. *Nature* 324, 408–409.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology* 95, 112–116.
- Gatesoupe, F.J., 1995. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquacult. Int.* 3, 150–154.
- Henning, S.J., 1985. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 231–245.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.* 118, 515–520.
- Malle, P., Valle, M., Bouquelet, S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.* 79, 43–49.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.* 26, 133–142.
- Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63, 110–117.

- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 479–485.
- Ribeiro, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465–473.
- Sherman, F., 1991. Getting started with yeast. In: Guthrie, Ch., Fink, G.R. (Eds.), *Methods in Enzymology. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol. 194, Academic Press, New York, pp. 3–21.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., Fallon, R.D., 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 958–965.
- Tabor, C.W., Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 64–71.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed different artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129–138.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127, 608–614.

AVANCES EN NUTRICION ACUICOLA V.
Memorias del Quinto Simposium
Internacional de Nutricion Acuicola,
19-22 de Noviembre de 2000
Merida, Yucatan, Mexico

ISBN -970-894-52-9

Copias disponibles en:
Universidad Autonoma de Nuevo Leon
Facultad de Ciencias Biologicas
Programa Maricultura
Cd. Universidad A.P. 7-56,
San Nicolas de los Garza, Nuevo Leon,
Mexico
C.P. 66450
Tel+ Fax. (81) 352 6390
E-mail: elicruz@hotmai.com
mlzap@wildmai.com

Para citar alguna parte de esta obra, siga
el siguiente estilo:

Autor del escrito. 2000. Nombre del articulo,
pp. #. En: Cruz-Suarez, L.E., Riquie-Marie,
D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Novoa, M.,
Civera-Cerecedo, R. (Eds.) Avances en
Nutricion Acuicola V. Memorias del Quinto
Simposium Internacional de Nutricion
Acuicola.

Diseño y coordinación técnica de la edición:

Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar,
Adriana Gerda Flores

DISEÑO GRAFICO Y MULTIMEDIA

DSI - Aplicaciones Creativas
Luis Alfonso Franco Garcia
Nancy Saldana Quintero
Alejandro Aguilón Valdez.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biologicas
Universidad Autónoma de Nuevo Leon 2000

Editores:

- Dra. Elizabeth Cruz Suárez,
- Dr. Denis Riquie Marie,
- Dra. Mireya Tapia Salazar,
- Dr. Miguel A. Olivera Novoa,
- Dr. Roberto Civera Cerecedo

Copyright 2000, Universidad Autónoma de Nuevo Leon,
Facultad de Ciencias Biologicas,
Programa Maricultura.

Todos los derechos reservados

La reproducción total o parcial de esta obra requiere la
autorización escrita por los titulares del derecho de autor.



Avances en Nutrición Acuicola V

Editores
Dra. Elizabeth Cruz Suárez
Dr. Denis Riquie Marie
Dra. Mireya Tapia Salazar
Dr. Miguel A. Olivera Novoa
Dr. Roberto Civera Cerecedo

Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces.¹

D. Tovar-Ramírez^{1,2}, J.L. Zambonino-Infante¹, C. Cahu¹, F.J. Gatesoupe¹ y R. Vázquez-Juárez²

¹Unité Mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER - Centre de Brest - BP 70 - 29280 Plouzané France, Tel. (0)2 98 224090, Fax. (0)2 98 224653

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita C.P. 23090, La Paz, B.C.S., México. Tel (112) 53633; Fax (112) 53625. rvazquez@cibnor.mx

RESUMEN: El uso de los probióticos en la acuicultura ha cobrado interés en los últimos años. En el presente estudio se evalúa el potencial probiótico de levaduras en el desarrollo del tracto digestivo en la etapa larvaria de dos especies importantes: la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Se eligieron 10 cepas de levaduras y se seleccionaron aquellas que presentarían una producción de poliaminas importante y una buena capacidad de adhesión al intestino de las larvas del pez. La producción de poliaminas se cuantificó por HPLC en las levaduras mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Para estudiar la adhesión de levaduras al intestino de larvas, se utilizó el marcaje celular con DTAF (5-([4,6-dichlorotriazin-2-YL]amino)- fluorescein) y la observación por microscopía de fluorescencia. Se observó que la cepa HF1 (*Debaryomyces hansenii*) y la X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) produjeron más espermidina y espermina, y mostraron la mejor capacidad de adhesión al intestino de la lubina, respectivamente. Las levaduras seleccionadas se incluyeron al alimento de larvas de la lubina europea para conocer el efecto en su crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática digestiva. Las larvas alimentadas con la dieta que contenía la cepa HF1, experimentaron un aumento del 8.3% en la sobrevivencia, pero no así para el aumento de peso con la dieta de referencia. Se observó que la actividad amilasa secretada de páncreas, así como aquella obtenida de los cocientes entre fosfatasa alcalina, maltasa y leucin-aminopeptidasa y la enzima citosólica leucin-alanin aminopeptidasa, se incrementan en el día 27 para las larvas alimentadas con la cepa HF1; y, posteriormente, se igualan los valores de actividad con respecto a la dieta de referencia en el día 42. Este comportamiento sugiere la maduración temprana del sistema digestivo en larvas alimentadas con la cepa HF1. Finalmente, se cuantificó el mRNA de la lipasa, tripsina y fosfolipasa mediante la técnica de RT-PCR, para conocer la expresión de los genes de estas enzimas como respuesta al estímulo alimenticio elaborado con levaduras. Como producto de este trabajo, se identificó y se registró una secuencia que pertenece a una lipasa en el banco EMBL - (European Bioinformatics Institute) con el No. de acceso AJ275976 y se obtienen los primeros datos del uso de levaduras productoras de poliaminas en la maduración del tracto digestivo de larvas de pez.

PALABRAS CLAVES: Probióticos, levaduras, maduración del tracto digestivo, peces.

INTRODUCCION

El cultivo de peces marinos se ha convertido en una actividad creciente que se apoya principalmente de los criaderos para el suministro de larvas alimentadas generalmente con alimento vivo durante su primer mes de vida (Zambonino-Infante y Cahu, 1999). La secuencia de alimentación se basa

¹ Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Nowoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

principalmente en rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia salina* durante los primeros 20-25 días de cultivo, continuando con una combinación del alimento vivo con alimento seco hasta completar el destete (Kolkovski *et al.* 1997a). La alimentación exógena principia pocos días antes de la absorción completa del vitelo mientras que el alimento comienza a ser digerido en un sistema poco desarrollado (Gatesoupe, 1993).

Desde hace años, se ha creído que las larvas de peces no poseen las enzimas necesarias para digerir las dietas compuestas y que la digestión del alimento vivo se realiza por autólisis de estos microorganismos en el tracto digestivo (Zambonino-Infante y Cahu, 1999); por otro lado, también algunos autores han sugerido que las larvas de peces no pueden asimilar las dietas compuestas debido a la insuficiente actividad enzimática (Lauff y Hofer, 1984) y que puede ser compensada por la actividad enzimática del alimento vivo (Dabrowski y Glogowski, 1977). Recientes resultados demuestran que la actividad enzimática de larvas alimentadas con dietas compuestas y con alimento vivo es similar (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a). De igual forma, el hecho de sustituir completamente el alimento vivo por dietas compuestas se obtiene la misma sobrevivencia y crecimiento (Péres *et al.* 1997). En la búsqueda de encontrar sustitutos del alimento vivo para la industria del cultivo de larvas de peces, se ha despertado un enorme interés por el uso de los probióticos como suplementos de los alimentos vivos y elaborados para la acuicultura, y de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas bajo un esquema de cultivo amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Especial atención se ha puesto en aquellos microbios que contrarrestan la invasión de patógenos y aumentan la salud del hospedero al incrementar su resistencia contra éstos, y en aquellos también que aporten moléculas de importancia fisiológica para el hospedero (Tovar *et al.*, 2000a). Desde un amplio sentido, el término de probiótico se aplica a aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, consideramos importante hacer alusión a las moléculas que son aportadas por el microorganismo y que desempeñan una función benéfica para el hospedero, participando en su desarrollo o cubriendo alguna necesidad fisiológica.

Como ejemplo podemos citar las poliaminas, moléculas presentes en todas las células vivas y que son requeridas principalmente en aquellos tejidos con alto recambio celular y de crecimiento (Bardocz, 1993). Entre las poliaminas podemos citar a la putrescina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), espermidina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) y espermina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Hasta la fecha, se han descrito algunas de las funciones que desempeñan en los seres vivos; sin embargo, aún no se tiene elucidado completamente su mecanismo funcional en la célula. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Se han descrito también, funciones específicas como inespecíficas dentro del ciclo de replicación celular, tales como el control e iniciación de la traducción de proteínas, estabilización de la molécula del RNA, estimulación de la asociación de las subunidades ribosomales y estimulación de la síntesis del DNA y RNA (Bardocz, 1993).

Desde el punto de vista de su aplicación, las poliaminas se han utilizado para inducir el desarrollo del tracto digestivo de mamíferos (Buts *et al.* 1993; Buts *et al.* 1994; Dufour, *et al.* 1988) y de peces (Péres *et al.* 1997). Se ha demostrado que la poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo de tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardocz, 1995; Buts *et al.* 1993), y que el suministro de 0.33% de espermina en las etapas larvianas de *Dicentrarchus labrax*, se incrementa la sobrevivencia hasta un 33 % con respecto a la dieta control, libre de poliaminas (Péres *et al.* 1997).

Se sabe que durante las primeras cinco semanas de vida de los peces marinos, se llevan a cabo numerosos cambios funcionales y morfológicos en su sistema digestivo (Péres *et al.* 1997), por lo que es de suma importancia el conocer los factores que regulan el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de las larvas en este período crítico. Para este fin, se está estudiando el uso de levaduras productoras de poliaminas como inductoras de la maduración del sistema digestivo de las larvas de la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Tovar *et al.* 2000a,b), pez de alto potencial económico en Europa (FAO Fisheries Circular, 1986-1995; Josupeit, 1995) y de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. El propósito de este estudio, es conocer el efecto de levaduras seleccionadas por su producción de poliaminas y su adherencia al tracto digestivo de peces, en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina europea. *D. labrax* y de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Las cepas de levaduras evaluadas en este estudio por su producción de poliaminas y capacidad de adherencia al intestino de *D. labrax*, se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio

Cepa	Observación/Referencia
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7764	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> J26	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7765	Aislada de peces Andlid <i>et al.</i> , 1993
<i>Debaryomyces hansenii</i> HF1, CBS 8339	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i> 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180	Cepa de colección Univ. Goteborg
Cepa AY1	Aislada de abulón, no identificada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7835*	Aislada de paciente-Byron <i>et al.</i> 1995
<i>Candida albicans</i> *	Aislada de catéter de paciente (SSA La Paz, B.C.S.)

* Se incluyeron dos cepas consideradas patógenas como referencia.

Medios de cultivo y crecimiento de las levaduras

La reactivación de las levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD y las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en medio de cultivo líquido YNB DIFCO. Como parámetro de crecimiento se consideró el aumento en densidad óptica (550 nm) a 200 rpm y 25 °C. La excepción fue *Candida albicans* cuyo crecimiento se llevó a cabo en tubos de ensaye y se midió su crecimiento por peso seco. Se hizo esta excepción porque durante su crecimiento forma agregados y requiere de mayor agitación.

Método de extracción de poliaminas biogénicas

El método de extracción y detección de poliaminas se llevó a cabo de acuerdo a Mallé *et al.* (1996). Se utilizó ácido perclórico para su extracción y la dansilación para la detección de las poliaminas por HPLC en un aparato LKB-LCC 2552 de PHARMACIA unicord SII, y detector de fluorescencia GILSON mod. 121. Se usó una columna SUPELCOSIL SIGMA-ALDRICH LC-18-DB, de 25 cm de largo, 5 µm de diámetro. Se utilizó un flujo de 1 ml/min con una concentración de agua/acetonitrilo de acuerdo a los tiempos y porcentajes descritos por Malle *et al.* (1996). Para cuantificar las poliaminas se

realizo una curva estándar con putrescina, espermidina y espermina (SIGMA, Co) y el estándar interno 1, 3-diaminopropano (SIGMA).

Marcaje de levaduras

Para observar la adhesión de las levaduras al intestino de las larvas de *D. labrax*, se realizó un marcaje con DTAF de acuerdo a Sherr *et al.* (1987). Se obtuvieron los intestinos de larvas y se incubaron con las levaduras marcadas durante 2 h a 37 °C.

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. labrax

El estudio de adhesión se llevó cabo con las levaduras enlistadas en la sección de producción de poliaminas. Después de haber evaluado la producción de poliaminas en las 10 diferentes cepas, se procedió a estudiar su capacidad de adherirse al tracto digestivo de larvas de *D. labrax* de 41 días de edad. Los segmentos de intestino fueron puestos en buffer de fosfatos pH 7.4, posteriormente se adicionó el cultivo de las levaduras marcadas con DTAF. Los segmentos fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se evaluó la cantidad de levaduras por campo adheridas por microscopía de fluorescencia (40X).

Efecto del alimento PL17 para D. labrax enriquecido con dos cepas de levadura (D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180) seleccionadas por su adhesión y producción de poliaminas

Las levaduras *D. hansenii* (HF1) y *S. cerevisiae* (X2180), seleccionadas por su capacidad de adhesión al intestino de las larvas y producción de poliaminas, fueron incorporadas al alimento PL17 cuya composición basal esta patentada (Pat. 99-050449) y contiene, 58.4% de proteína, 21.3% de lípidos, (11.6% lípidos neutros y 7.8% de fosfolípidos), 12.2% de cenizas relativas a la materia seca y la humedad fue de 9.8%. El tamaño del alimento fue de 120-200µm del día 10 al 20 después de la eclosión y 200-400 µm del día 20 en adelante).

Las levaduras fueron crecidas hasta su fase logarítmica, se concentraron por centrifugación y luego resuspendidas en agua destilada estéril, para ser adicionadas al alimento por aspersión en proporción de 0.9 mL de suspensión celular (equivalente 67.5×10^4 UFC para *D. hansenii* HF1 y 63×10^4 UFC para *S. cerevisiae* X2180) por gramo de alimento. La cantidad de células de *D. hansenii* cepa HF1 adicionada al alimento, produce 21.93 nM de espermidina, 8.07 nM de espermina y 7.75 nM de putrescina, mientras que *S. cerevisiae* X2180 produce 2.76 nM de espermidina, 6.36 nM de espermina y 1.36 nM de putrescina. Después de adicionar la suspensión de levaduras, el alimento fue secado en una estufa a 37 °C durante 45 min. La suspensión celular fue almacenada en refrigeración (4°C) después de preparar el alimento para las larvas y la sobrevivencia de las levaduras fue medida durante su almacenamiento.

Cultivo larvario y alimentación de D. labrax

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio húmedo de la Unidad Mixta de Nutrición de peces INRA-IFREMER, Centro Brest, Francia. Las larvas se consiguieron en la empresa Aquanord, Francia y arribaron a la estación en un estado prelarvario, es decir, sin haberse llevado a cabo la abertura de la boca. Se mantuvieron en la oscuridad hasta el día 9 sin alimento. Fueron crecidas por 41 días en

estanques de fibra de vidrio de 35 L⁻¹ de capacidad a una densidad inicial de 60 organismos L⁻¹. La temperatura se mantuvo a 13 °C desde el inicio y se incrementó progresivamente a 20 °C en el día 9 después de su eclosión. La salinidad fue de 34 g L⁻¹ y la intensidad luminosa fue de 9 Wm⁻² a partir de la ida 15 de cultivo. Los niveles de oxígeno se mantuvieron por arriba de 6mg L⁻¹. Fueron cultivadas en agua de mar filtrada en un filtro de arena y pasada por un calentador de tungsteno y desgaseada en una columna con anillos de plástico. Las larvas se alimentaron continuamente con un distribuidor automático de bandas, verificándose la ingesta por microscopio estereoscópico. Para cada régimen alimenticio, se utilizaron cuatro réplicas incluyendo un control sin levaduras.

Sobrevivencia y peso de las larvas

La sobrevivencia se calculó por el número inicial y final de larvas, expresándose como %. Se tomó en cuenta también el número de larvas muestreadas para los ensayos enzimáticos y extracción de RNA. El peso de las larvas fue obtenido del muestreo de 10 larvas por estanque, los días 5, 16, 22, 29, 36 y 42 de cultivo.

Efecto del alimento suplementado con levaduras sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de D. labrax

Durante el crecimiento larvario (día 27) y al final del experimento (día 41), las larvas fueron colectadas por la mañana (8:30) antes de ser alimentadas y almacenadas a -80 °C, hasta su proceso. Para la disección de larvas y obtención de homogenados se utilizó la metodología descrita por Cahu y Zambonino-Infante (1994). De los extractos obtenidos, se ensayaron las enzimas pancreáticas tripsina (Holm *et al.* 1988) y amilasa (Métais y Bieth, 1968). De igual forma, ambas enzimas fueron ensayadas en el intestino para conocer la cantidad secretada. De las membranas con borde de cepillo se ensayaron la enzimas fosfatasa alcalina (PAL) (Bessey *et al.* 1946), leucin-aminopeptidasa (LAP) (Maroux *et al.* 1973), y la enzima citosólica leucin-alanin-peptidasa (leu-ala) (Nicholson y Kim, 1975). La actividad de las diferentes enzimas se refirió como actividad específica (miliunidades/ mg de proteína) y la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1974) usando albúmina sérica bovina como estándar. Las membranas con borde de cepillo se obtuvieron de acuerdo a (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; método modificado de acuerdo a Crane *et al.* 1979).

Elaboración de sondas de cDNA para la detección de la lipasa primaria de larvas y adultos de D. labrax

Los oligonucleotidos ("primers") se diseñaron de los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con los mRNA de nuestro interés, registrados en los bancos de secuencias con acceso en la siguiente página de Internet: <http://www.infobiogen.fr/services/deambulum/fr/>.

La extracción del RNA se llevó a cabo en larvas recién colectadas (8:30) en ayunas y adultos. Para la extracción de RNA total se utilizó el segmento pancreático utilizando el protocolo de extracción que acompaña al reactivo de TRIZOLTM de GIBCO Life Sciences. Del RNA total se tomaron 5 µg para ser transcritos a cDNA utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) de acuerdo a las instrucciones del kit READY TO GO de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA. La amplificación del cDNA se llevó a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo en 50 µL conteniendo 0.66 µg del cDNA, 0.2 U de Taq polimerasa (Amersham), 100 µM de dNTP's, 50 pmoles de cada primer, 1X del amortiguador de la reacción (Amersham) y agua destilada estéril hasta completar 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a

cabo en un termociclador ROBOCYCLER Gradient 96 Stratagene CA USA., con los parámetros descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Amplificación de los fragmentos seleccionados

Desnaturalización inicial del cDNA	94 °C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización del cDNA formado	94 °C	1 min	30 ciclos
Hibridación de los primers	variable *	1 min 1/2	30 ciclos
Elongación del cDNA formado	72 °C	2 min	30 ciclos
Elongación final	72 °C	7 min	1 ciclo

* La temperatura de hibridación depende de las proporción de G/C que contienen los primers elaborados.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis sobre agarosa al 1.2 % y analizados en un fluorómetro FluoroScan Multimager de BIO-RAD. La visualización se llevó a cabo gracias a la adición de bromuro de etidio en razón de 4 µL/ 50 mL de TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

Posteriormente, se procedió a la purificación de los fragmentos de cDNA cortando las bandas de nuestro interés. La recuperación y purificación del cDNA se obtuvo con el protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA USA). Finalmente, los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al kit TOPO^R TA CLONING (INVITROGENE, The Netherlands), utilizando células competentes de *E. coli* y al plásmido pCR 2.1 TOPO como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA USA) para enviarse a secuenciar y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

Cuantificación de los ARNm de las enzimas lipasa, fosfolipasa, tripsina y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por RT-PCR

De una alícuota de los fragmentos clonados del cDNA, se procedió a realizar la cuantificación del mRNA para las enzimas tripsina, fosfolipasa, lipasa y GAPDH. Los resultados fueron expresados como mRNA de cada enzima/mRNA de la GAPDH. Se ha demostrado que la normalización de cualquier enzima en relación a la GAPDH provee valores representativos y reproducibles para comparar la expresión genética a nivel del mRNA (Solch y Arnold, 1996).

RESULTADOS

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. Labrax

Las levaduras que demostraron sintetizar una mayor cantidad de poliaminas fueron la HF1 *D. hansenii* y la X2180 *S. cerevisiae*. En este orden, también se observó una mayor capacidad de adherencia al intestino de *D. Labrax* (Fig. 1). Por lo que fueron seleccionadas para llevarse a cabo los bioensayos con larvas recién eclosionadas de *D. Labrax*.

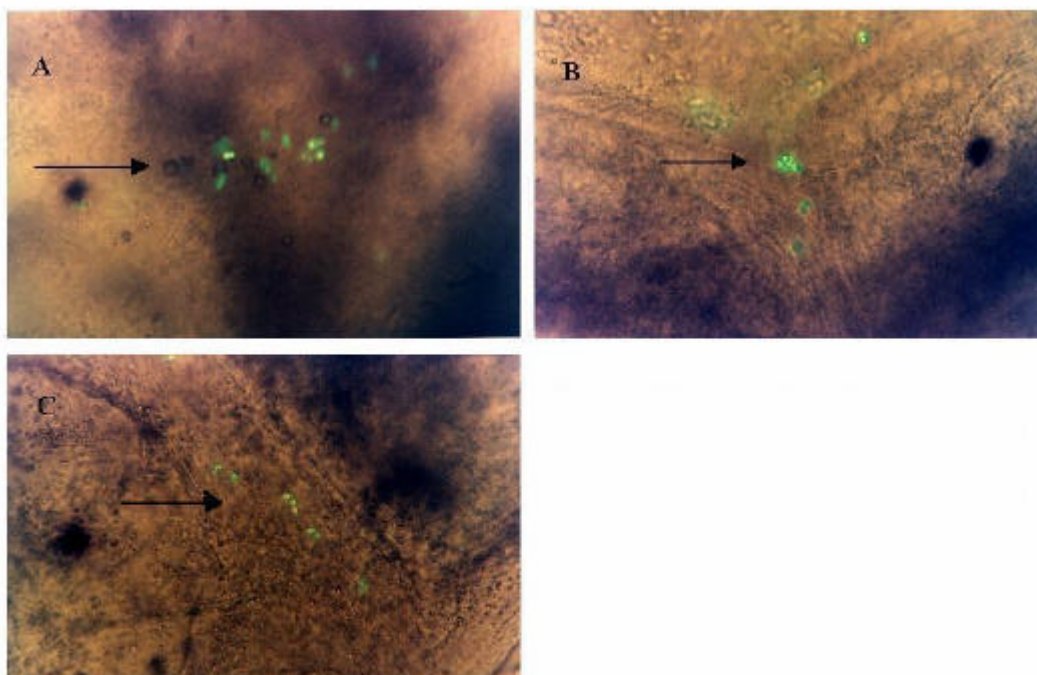


Fig. 1. Micrografía de fluorescencia en donde las flechas muestran a las cepas A) *Debaryomyces hansenii* (HF1), B) *Saccharomyces cerevisiae* (YL12) y 3) *S. cerevisiae* (X2180) adheridas al intestino de larvas de *D. labrax* (40 X).

Efecto de D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180 incorporadas en el alimento de D. labrax

Con el uso de *D. hansenii* cepa HF1 en el alimento, se obtuvo un aumento en la sobrevivencia de larvas hasta un 8.3% con respecto al control. No fue detectado algún tipo de levadura en la dieta control y la presencia de bacterias de género *Vibrio* en el intestino de las larvas fue <100 UFC por cada tratamiento, lo que no resulta significativo para nuestros resultados de producción de poliaminas.

A pesar de los resultados positivos en la sobrevivencia, se obtuvieron menores pesos promedio con respecto al control al usar alimento suplementado con levaduras (Fig. 2). La variación del número de levaduras viables utilizadas en la elaboración del alimento para las larvas no varió significativamente ($p>0.05$) durante su almacenamiento en refrigeración.

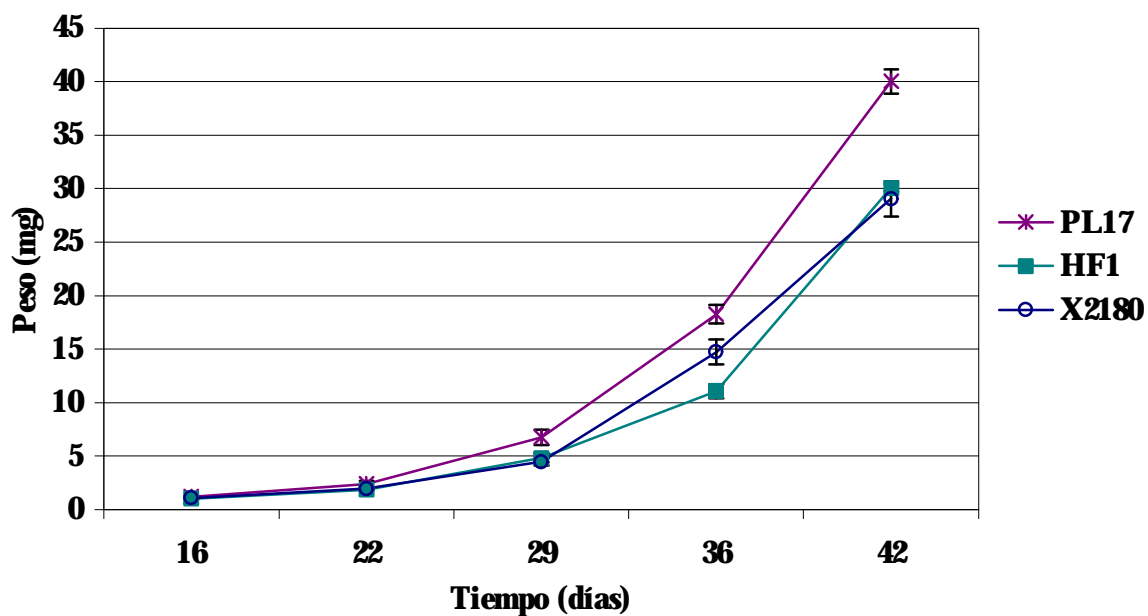


Fig. 2. Peso obtenido de las larvas de *D. labrax* durante su cultivo, alimentado con la dieta control (PL17) y aquellas elaboradas con las cepas HF1 y X2180.

La actividad enzimática tipo tripsina secretada de las larvas en el día 27, es igual con aquellas alimentadas con la dieta control y la elaborada con *D. hansenii* HF1; sin embargo, en ese mismo día la actividad tripsina decrece con la dieta de la cepa X2180. La misma tendencia se observa para el término del experimento (Fig. 3).

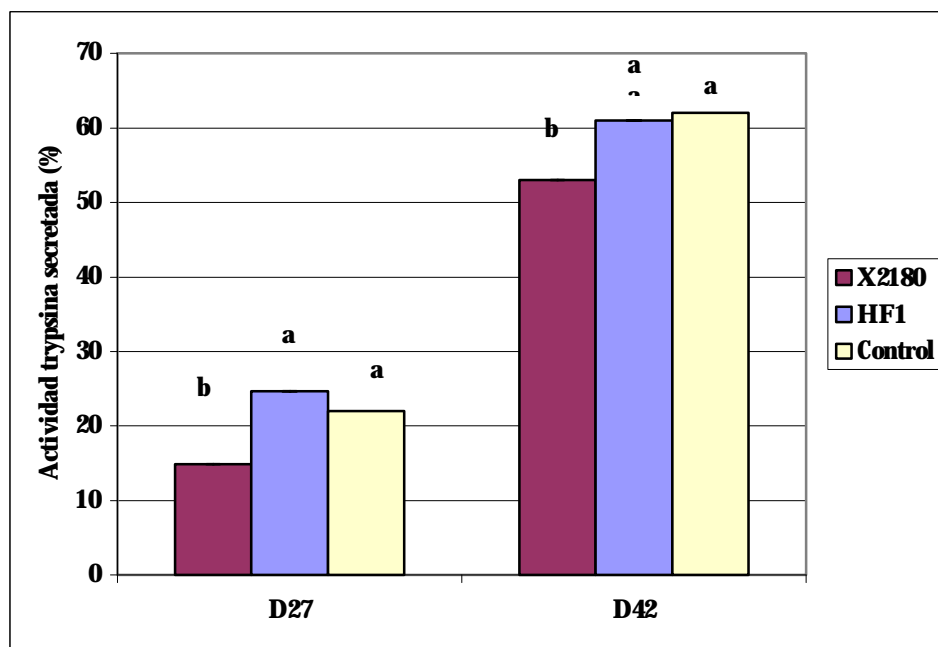


Fig. 3. Actividad tripsina secretada en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

Por otro lado, la actividad enzimática tipo amilasa secretada por las larvas, se incrementa en el día 27 en aquellas alimentadas con la dieta que contiene *D. hansenii* HF1. Al término del experimento, la actividad amilasa secretada se mantiene igual en las larvas alimentadas con las tres dietas (Fig. 4).

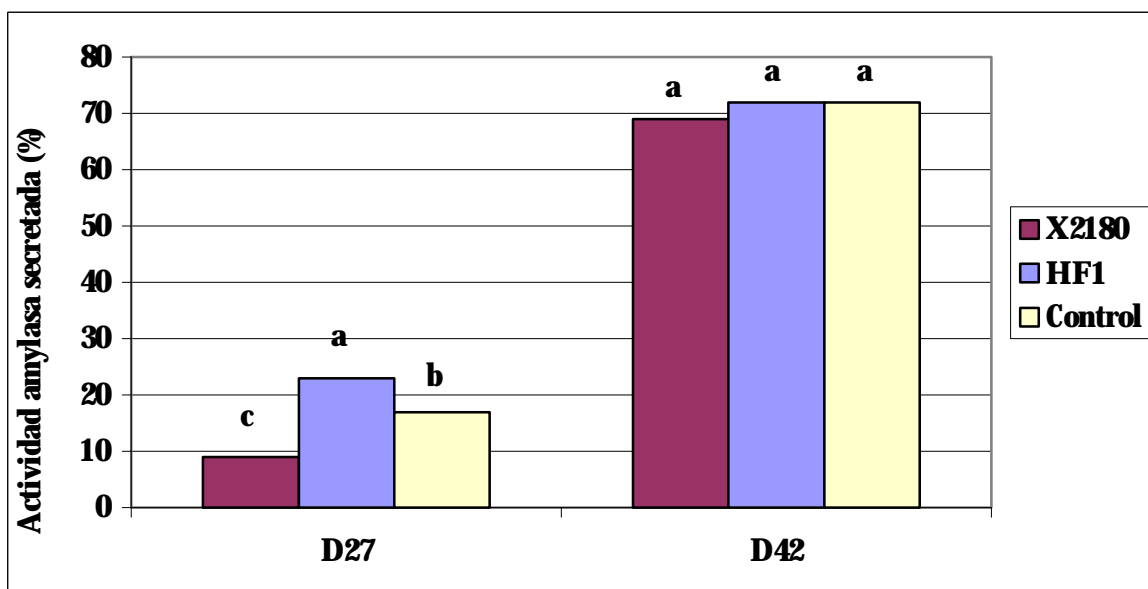


Fig. 4. Actividad enzimática de la amilasa secretada por larvas crecidas hasta el día 27 y 42, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$).

Diseño de sondas de cDNA para la detección de la lipasa de D. labrax

Para el diseño de los primers específicos, se utilizaron las secuencias registradas del Zebrafish *Danio rerio* (No. AW018709, que es un cDNA 5' similar al precursor del triacilglicérido lipasa) y a la del ratón doméstico *Mus musculus* (No. X58426, que es un RNA para una triacilglicérido lipasa hepática).

Primers diseñados para lipasa:

HL dir1	5'	tgtgcttcaacagc	3'
HL dir2	5'	agatcatcca(ct)ggg	3'
HL dir3	5'	gggtggctgctagat	3'
HL rev1	5'	cgctccaagrctgta	3'
HL rev2	5'	grctgtacccaatca	3'

Se ensayaron las Combinaciones y temperaturas siguientes:

Combinaciones	No. de pares de bases esperado	Temperaturas
dir1-rev1	291	46, 48, 50, 52 °C
dir1-rev2	283	44, 46, 48, 50
dir2-rev1	260	44, 46, 48, 50
dir2-rev2	252	44, 46, 48, 50
dir3-rev1	234	48, 50, 52, 54
dir3-rev2	260	44, 46, 48, 50, 52

De las 6 combinaciones de primers, solamente dieron respuesta positiva el dir1-rev1 (D1R1) y dir3-rev2 (D3R2) (Fig. 5). Una vez purificadas las bandas, se clonaron y se secuenciaron. Del resultado de la secuenciación del cDNA correspondiente a la combinación D1R1DL, se obtuvo un fragmento de 288 pares de bases, reportado ya (Tovar, 2000) como una triacilglicérido lipasa (EC 3.1.1.) con una homología del 85% en 60 pares de bases, a la secuencia de la lipasa hepática del ratón doméstico (*Mus musculus*).

Una vez secuenciados los fragmentos de cDNA de la lipasa y confirmada su homología con secuencias conocidas registradas en las bases de datos, se comenzará a cuantificar el mRNA de las enzimas lipasa, fosfolipasa y tripsina, utilizando el mRNA de la enzima GAPDH como estándar interno (resultados no mostrados), para aquellas larvas alimentadas con levaduras.

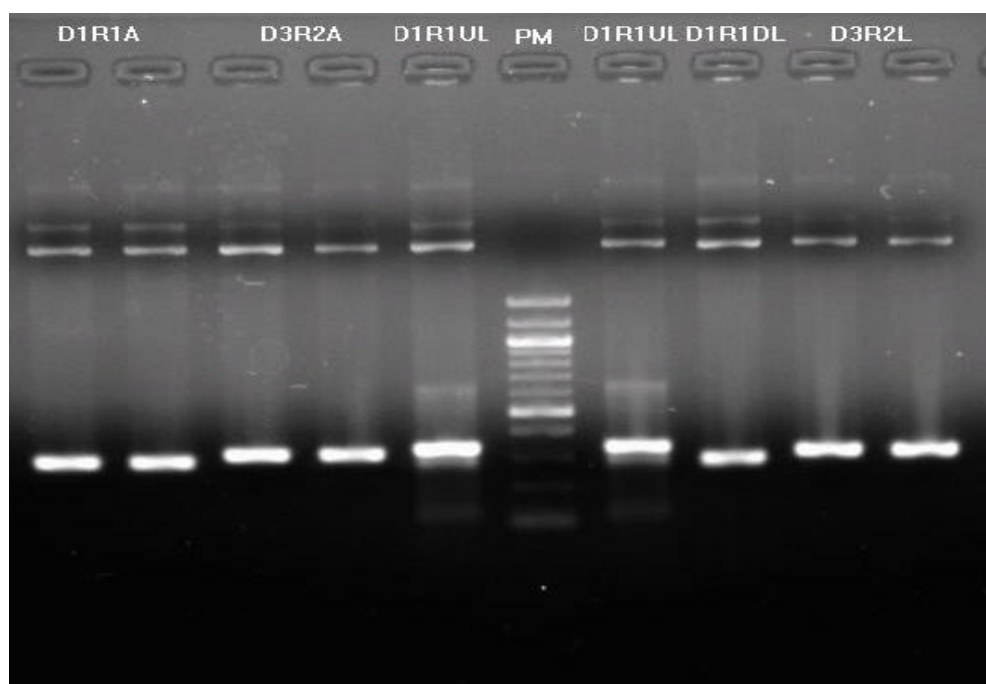


Fig 5 . Electroforésis de agarosa que muestra los productos de amplificación de los cDNA puros –provenientes de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.

DISCUSION

Debido a que el recambio celular en el epitelio intestinal es mayor que en cualquier otro tejido, las poliaminas son vitales para una función y estructura adecuada del tracto digestivo. Además de la síntesis *in situ*, se ha demostrado que en el intestino la demanda requiere de fuentes externas, particularmente aquellas poliaminas suministradas con la dieta y la contribución de la microflora indígena (Bardocz *et al.* 1996).

Resulta interesante la cantidad de poliaminas que son detectadas en el medio de cultivo de las levaduras, y que sugiere una forma de administrarlas directamente al intestino de la larva aprovechando la capacidad de adherencia de las levaduras. La mejor respuesta de adhesión al intestino de la lubina fue observado con *D. hansenii* cepa HF1, seguido de *S. cerevisiae* cepa YL12, y después con *S. cerevisiae* cepa X2180 (Fig. 1). Previos resultados (Vázquez-Juárez *et al.* 1997; Andlid *et al.* 1995) han demostrado que *D. hansenii* HF1 tiene una gran afinidad a la mucosa intestinal de peces, lo que sugiere que el intestino es un importante lugar para el crecimiento y proliferación microbiana en especies en cautiverio, y la mucosa gástrica una rica fuente de nutrientes para estos microbios (Andlid *et al.* 1995).

El aporte de poliaminas al sistema digestivo del pez por las levaduras, puede resultar de mucha importancia en las etapas larvarias para la maduración de su sistema digestivo y lograr una mejor sobrevivencia. Se sabe que durante el primer año de vida la lubina europea experimenta un lento crecimiento comparado con sus etapas posteriores de desarrollo (Casti *et al.* 1989). También se ha demostrado que en el primer mes de vida, es el tiempo mas crítico en el crecimiento y desarrollo de esta especie (Péres *et al.* 1998) por lo que es de primordial importancia incluir probióticos en los alimentos para contribuir al aporte de moléculas estimuladoras del crecimiento y diferenciación celular. Debido a que las levaduras no penetran a los enterocitos de las larvas, suponemos que existe una secreción o liberación de poliaminas como resultado del metabolismo de éstas, lo que inducen el incremento de la sobrevivencia como lo fue observado por Péres *et al.* (1997). En este trabajo, se obtuvo un aumento del 33% de sobrevivencia en larvas alimentadas con 0.33% de espermina pura. Se ha demostrado que estas moléculas son consideradas un factor importante en la maduración de las membranas de borde de cepillo del intestino en mamíferos (Greco *et al.* 2000).

A los 41 días de haber iniciado el cultivo, se detectaron 2.5×10^2 y 1.5×10^2 levaduras en el intestino de larvas alimentadas con *D. hansenii* HF1 y *S. cerevisiae* X2180 respectivamente, lo que confirma nuestros resultados de adhesión y efecto de la dieta enriquecida con la primera cepa. Sin embargo, la obtención de un bajo peso promedio de larvas alimentadas con levaduras, pudo haber sido provocado por el cambio de textura adquirido por el alimento al ser humedecido y luego secado en la estufa, ya que éste se sedimentó en los acuarios a una velocidad mayor que la dieta control.

El efecto positivo *D. hansenii* HF1, lo podemos evidenciar al observar una modulación de la actividad enzimática digestiva en los primeros 27 del desarrollo larvario de la lubina. La Fig. 4 muestra que la secreción de la amilasa en el día 27 se ve favorecida con respecto al control ($P < 0.05$) cuando es alimentada con la dieta que incluye dicha cepa. Esto también se puede evidenciar cuando se analizan los cocientes de actividad enzimática de la Tabla 3. El incremento significativo ($P < 0.05$ contra el control) de la actividad de la maltasa (32.8%), y de las enzimas de las células con borde de cepillo, fosfatasa alcalina (62.5%) y leucin-amino-peptidasa (47%) sugieren el paso de una digestión citosólica a una digestión extracelular (Tovar *et al.* 2000b). Se ha demostrado que un bajo nivel de actividad de enzimas intracelulares (citosólicas) y el aumento de actividad de las enzimas de las células con borde

de cepillo, caracterizan la maduración de los enterocitos en mamíferos (Henning, 1987) y en peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1994).

Tabla 3. Cocientes de actividad enzimática.

	HF1	X2180	Control
Día 27			
AP	56 ± 5.4 ^a	7 ± 2.0 ^c	21 ± 3.6 ^b
LAP	85 ± 10.2 ^a	7 ± 2.0 ^c	45 ± 14.3 ^b
Maltasa	6.4 ± 0.75 ^a	2.4 ± 0.42 ^c	4.3 ± 0.14 ^b
Día 42			
AP	303 ± 67.4	324 ± 80.8	232 ± 51.9 ns
LAP	54 ± 5.6 ^b	74 ± 21.8 ^{a b}	105 ± 26.2 ^a
Maltasa	53 ± 3.5	66 ± 18	41 ± 5 ns

AP- Fosfatasa alcalina

LAP – Leucin-aminopeptidasa

ns – valores sin diferencia significativa

Los valores con diferentes letras poseen diferencia significativa ($p < 0.05$).

Otro efecto positivo de la administración de levaduras productoras de poliaminas, lo podemos observar al incrementarse la sobrevivencia con respecto al control ($P < 0.05$). Anteriormente Cahu y Zambonino-Infante (1994) observaron que la maduración temprana de los enterocitos de peces conduce a la obtención de mayores tasas de sobrevivencia larvaria.

El efecto de la maduración del sistema digestivo, acompañado de la administración de probióticos ha sido bien documentado en mamíferos pero no en peces. Se ha observado que en ratas destetadas (20-30 días) y oralmente alimentadas con *S. boulardii* (100 mg/día), incrementan su actividad específica de sacarasa (157%) y maltasa (47.5%) como producto de la liberación de poliaminas (55% espermidina y 43% espermina) (Buts *et. al.* 1994).

La caracterización parcial del gen de la lipasa, nos permitirá conocer aún mas el papel que juegan los probióticos en el desarrollo y expresión del gen que codifica esta enzima digestiva durante la etapa larvaria de la lubina. Este es el tercer trabajo que reporta la clonación y secuenciación de un fragmento de una lipasa en peces marinos. Previamente, Gjellesvik *et al.* (1994) reportaron la clonación del gen de la carboxilester lipasa del salmón del Atlántico *Salmo salar*; y más recientemente, Clark *et al.* (1998) reportaron un fragmento de una lipasa de Zebrafish *Danio rerio* que posee semejanza al precursor de la triacilglicerido lipasa del ratón (Chang *et al.* 1991).

Con este estudio, se complementará la información concerniente al efecto de dietas compuestas en el crecimiento y desarrollo del sistema digestivo en peces, ya que los reportes del uso de dietas compuestas en etapas larvarias tempranas son escasos (Zambonino-Infante y Cahu, 1999).

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo son parte del proyecto ECOS-ANUIES M98-S03 y proyecto CONACyT 25956B. Dariel Tovar agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. Becario 84016), al Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), a Patrick Quazuguel, Marie Madelaine Legall de la Unité Mixte de Nutrition de Poissons (INRA-IFREMER) por el apoyo recibido.

REFERENCIAS

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L.. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) microb. Ecol., 30, 321-324.
- Bardocz, 1993. The role of dietary polyamines. European Journal of Clinical Nutrition, 47, 683-690.
- Bardocz, S., White, A., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.G., Pusztai, A., 1996. Uptake and bioavailability of dietary polyamines. Biochem. Soc. Trans. 24 (2), 2265.
- Bessey, A.O., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum J. Biol. Chem., 164,321-329.
- Bradford, M.M., 1974. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Buts, J.P., De Keyser, N., Kolanowsky, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Digestive Diseases and Sciences, 38 (6), 1091-1098.
- Buts, J.P., Keyser, N., Raedemaeker, L.. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, Pediatric Research, 36 (4), 522-527.
- Byron, J.K., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Davis, R.W., Stevens DA., 1995. Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. Infect.Immun. 63, 478-485.
- Cahu, Ch., Zambonino-Infante, J.L., 1994. Early weaning of seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol., 2, 213-222.
- Casti. A., Orlandini, G., Soldi, M.E., Davalli, P., Reali, N., Viviani, R., 1989. Tissue polyamine concentration in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): change with age and seasonal of the year. Ital. J. Biochem., 38, 369-373.
- Clark M., Johnson S.L., Lehrach H., Lee R., Li, F., Marra M., Eddy S., Hillier L., Kucaba T., Martin J., Beck C., Wylie T., Underwood K., Steptoe M., Theising B., Allen M.
- Bowers Y., Person B., Swaller T., Gibbons M., Pape D., Harvey N., Schurk R., Ritter E., Kohn S., Shin T., Jackson Y., Cardenas M., McCann R., Waterston R., Wilson R., 1998. "WashU Zebrafish EST Project"; Unpublished.
- Chang S.F., Netter H.J., Will H., 1991. "Characterization of cDNA encoding the mouse hepatic triglyceride lipase and expression by in vitro translation". FEBS Lett., 289, 69-72.
- Crane., R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochim. Biophys. Acta 554: 262-267.
- Dabrowski, K.,Glogoswki, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. Hydrobiologia, 54, 129-134.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. Gastroenterology, 95, 112-116.
- FAO, 1986-1995. Aquaculture Statistics, Fisheries Circular No. 815, Revision 9.
- Gatesoupe, J. F., 1993. Development of fish larvae and rearing conditions in hatcheries. Coastal and stuarine studies. In: Lahlou, B. and Vitiello P. (eds), American Geophysical Union, Washington DC, Capítulo 10, pp. 159-172.
- Gatesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture, Aquaculture, 180, 147-165.
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B., Male, R., 1994. Pancreatic carboxylester liapse from atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modelling of terciary structure, Eur. J. Biochem. 226, 603-612.
- Greco, S., Hugueny, I., George, P., Perrine, P., Louisot, P., Biol. M.C. 2000. Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. J. Biochem., 345, 69-75.
- Henning, S.J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. Physiology of the gastrointestinal tract, pp 285-300., 2nd edition. edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., and Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. J. Nutri., 118, 515-520.
- Josupeit, H., 1995. European markets for seabass, seabream and turbot, Aquaculture Europ. 20 (2), 6-12.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, Aquaculture, 148, 313-322.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Development of proteolytic enzymes in fish and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.
- Mallé, P., Vallé, M., Bouquelet, S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition, Journal of AOAC, vol. 79; No. 1, pp. 43-49.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. Biochem. Biophys. Acta, 321, 282-295.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Determiration de l'alfa-amilase par une microtechnique. Annal. Biol. Clin., 26,133-142.
- Nicholson, J. A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. Anal. Biochem., 63,110-117.

- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 16, 479-485.
- Sherr, B. F., Sherr, E.B., Fallon, R.D., 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 53 (5), pp. 958-965.
- Solch, J.P., Arnold, G.L., 1996. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis*, 17,30-39.
- Tovar-Ramírez, D., 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000a. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the european seabass larvae *Dicentrarchus labrax*. AQUA 2000, NICE FRANCE, 2-6 mayo del 2000.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000b. Improvement of gut maturation in sea bass larvae by yeast incorporation in diet. (En preparación).
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(1), 64-71.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 109A, No. 2, pp. 209-212
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1999. High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development, American Society for Nutritional Sciences, pp. 1195-1200.



ELSEVIER

Aquaculture 204 (2002) 113–123

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae

D. Tovar^{a,b}, J. Zambonino^b, C. Cahu^b, F.J. Gatesoupe^b,
R. Vázquez-Juárez^{a,*}, R. Lésel^c

^a CIBNOR S.C., P.O. Box 128, 23000 La Paz BCS, CP 23000, Mexico

^b Fish Nutrition Laboratory, Unité Mixte INRA-IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

^c Institut National de la Recherche Agronomique, 147 rue de l'Université, 75338 Paris Cédex 07, France

Received 6 December 2000; received in revised form 9 April 2001; accepted 9 April 2001

Abstract

Yeasts produce polyamines, and some strains have a strong adhesion potential to intestinal mucus, an important condition for probiotic efficiency. The aim of this study was to explore an *in situ* production of polyamines by *Debaryomyces hansenii* HF1 (DH), a yeast strain isolated from fish gut, in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* X2180 (SC) (Goteborg University Collection). The production of polyamines by DH was three times higher than that of SC. The main polyamines were spermine and spermidine, produced at a similar level. Both strains adhered to the gut of sea bass larvae. When the yeasts were introduced into a compound diet, the colonization was effective in the larvae (10^4 CFU g^{-1} on a body weight basis). The DH diet led to an increase in amylase secretion in 27-day-old larvae in comparison with the control diet. The secretion of amylase and trypsin was lower in the SC diet, and some delay in trypsin secretion was still observed in this group at day 42. At day 27, the activity of brush border membrane enzymes was stimulated by the DH diet, and delayed by the SC diet, in comparison with the control diet. The survival of the larvae was also increased in the DH diet, but the growth rate was lower than that in the control group. This may be due to the introduction of live yeast into the diet, which needs to be optimised. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Polyamines; Marine fish larvae; Gut maturation; Yeast adhesion; Gut colonization

* Corresponding author. Tel.: +52-112-536-33 ext. 3339; fax: +52-112-536-25.

E-mail address: rvazquez@cibnor.mx (R. Vázquez-Juárez).

1. Introduction

Several studies have recently documented a differentiation process in digestive functions during development of marine fish larvae species, such as European sea bass (Cahu and Zambonino Infante, 1995), *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999) and *Scianops ocellatus* (Buchet et al., 2000). This phenomenon is well-known in other vertebrates and particularly in mammals. Different nutritional factors, and particularly polyamines, are involved in the differentiation and maturation of the intestinal tract in mammals (Dufour et al., 1988). Recently, the role of polyamines in gut maturation of sea bass larvae was evidenced by dietary incorporation of purified spermine (Péres et al., 1997). High spermine levels were incorporated in the diet to compensate the loss of spermine by the leaching from the microparticulated diet in seawater. The settlement of microorganisms secreting polyamines in the larval gut may constitute a way to provide a regular supply of polyamine for the host. Yeast could be an appropriate organism because some strains synthesize and secrete different polyamines molecules (Buts et al., 1993), and they have strong adhesion potential to intestinal mucus in fish (Vázquez-Juárez et al., 1997; Andlid et al., 1998). Besides polyamine production, yeast may improve fish health as antagonists to pathogens and by immunostimulation (Andlid et al., 1995). These multiple beneficial effects could make yeast promising probiotics.

The aim of the present study was to determine whether yeast strains (1) produce polyamines, (2) adhere to the digestive tract of sea bass larvae, and (3) accelerate the maturation of the larval gut.

2. Materials and methods

2.1. Yeasts and polyamine production

Debaryomyces hansenii (strain HF1, CBS 8339) was isolated from the gut of rainbow trout (Andlid et al., 1995). This strain was compared with *Saccharomyces cerevisiae* X2180 (Goteborg University Collection).

The yeasts were cultivated at 25°C in yeast extract–peptone–dextrose broth (YPD) (Sherman, 1991). The cultures were centrifuged (5 min at 1000 × *g* at 4°C) at the early stationary phase determined by spectrophotometry at 550 nm. The supernatant was filtered at 0.2 μm to obtain free-cell culture medium (FC). The polyamines were also extracted from the pellet with two volumes (v/w) of 0.2 M perchloric acid (PCA) and homogenized with two volumes of glass beads (0.3–0.5 mm) by stirring 10 times at 0°C for 30 s. After extraction, the samples were centrifuged at 1000 × *g* for 10 min at 4°C and 10-fold diluted with PCA. This fraction was considered as the cell homogenate (H). The amines were derivatized with dansyl chloride before HPLC analysis according to the method of Malle et al. (1996). The HPLC apparatus was Waters 600E (Millipore), equipped with a Nova-Pack C18 reverse phase column (390 mm × 39 mm, 4-μm size particles). Measurements of polyamine concentration were made at 284 nm by comparing the integrated surface area of peaks with areas of dansylated polyamines (putrescine

P-7505, spermidine S-0381 and spermine S-2876 from Sigma) of known concentration on a standard curve.

2.2. Animals and diets

Larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were provided by the marine farm Aquanord (Gravelines, France). The larvae were reared at Ifremer, Centre de Brest till 42 days post-hatching (dph). The larvae were distributed into 12 conical fiber glass tanks (35 l) at 2 dph, with an initial stocking density of 60 larvae l^{-1} . The physical rearing conditions were as previously described (Cahu and Zambonino Infante, 1994). Mouth opening occurred at 5 dph, and the larvae were kept in the dark until 9 dph without food according to Chatain (1997). From 10 dph onwards, the larvae were fed one of three compound diets allotted to four tanks each. The basal diet (patent 99-050449) was formulated according to Cahu and Zambonino Infante (2001a) and contained 58.4% protein, 21.3% lipid (11.6% neutral lipid and 7.8% phospholipid) and 12.2% ash related to dry matter. Moisture was 9.8%. The dietary ingredients were mixed with water, pelletized and dried at 50°C for 20 min. The pellets were sieved to obtain particles of two size ranges, 120–200 and 200–400 μm . The yeasts, *D. hansenii* HF1 and *S. cerevisiae* X2180, were cultured in YPD broth till the early stationary phase, then the suspensions were pulverized onto the diets at the rate of 0.9 ml g^{-1} (ca. 7×10^5 CFU g^{-1}) to obtain the diets DH and SC, respectively. Then, these diets were dried again in a drying oven at 37°C for 45 min.

The larvae were fed in large excess by using belt feeders for 18 h/day. The particle size was 120–200 μm from 10 to 20 dph, then 200–400 μm afterwards.

2.3. Sampling and dissection

Ten larvae per tank were sampled at 42 dph in order to obtain final weight. At the end of the experiment, survival was determined by counting the individuals from each tank. The rate of spinal malformations at 42 dph was determined by examining 50 larvae per tank under a binocular microscope. On 27 and 42 dph, 50 larvae per tank were collected for enzymatic assays prior to daily food distribution. They were immediately frozen and stored at -80°C . The larvae were dissected as described by Cahu and Zambonino Infante (1994), in order to separate pancreatic and intestinal segments.

2.4. Enzymatic measurements

The dissected segments were homogenized in five volumes (v/w) of cold distilled water (4°C). Trypsin and amylase were assayed according to Holm et al. (1988) and Métais and Bieth (1968), respectively. Brush border membranes (BBM) were purified from the intestinal segment homogenate according to a method developed for intestinal scraping (Crane et al., 1979; Zambonino Infante et al., 1997). Enzymes of the BBM, aminopeptidase N (AN), maltase and alkaline phosphatase (AP) were assayed according to Maroux et al. (1973), Dahlqvist (1970) and Bessey et al. (1946), respectively. Assay

of a cytosolic enzyme, leucine–alanine peptidase (leu–ala), was performed using the method of Nicholson and Kim (1975). Protein was determined by the procedure of Bradford (1976). Data on pancreatic enzymes, amylase and trypsin were expressed as a ratio of segmental activity/amylase (or trypsin) content in intestinal segment (IU/larva segment) related to amylase (or trypsin) content in pancreatic + intestinal segment (total amylase- or trypsin-content). This ratio reflects the secretion of pancreatic enzymes (Zambonino Infante et al., 1996). Data on intestinal enzymes were expressed as a ratio of specific activity (IU/mg protein) of BBM enzymes, AP, AN and maltase, related to activity of the cytosolic enzyme (leu–ala).

2.5. Microbiological methods

To investigate whether the yeast adhered to the digestive tract of larval sea bass, the yeast cells were labelled with 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl] amino)-fluorescein hydrochloride (DTAF, Sigma D 0531) according to a method modified from Sherr et al. (1987). DTAF (2 mg) were homogenized in 10 ml of a 0.05 M Na_2HPO_4 –0.85% NaCl solution. Then, the solution was filtered at 0.2 μm , and all the following manipulations were done in sterile conditions. Yeast cultures in YPD broth were centrifuged for 10 min at $2700 \times g$, and the pellets were resuspended in the DTAF solution. The suspensions were incubated in a water bath at 37°C for 2 h. After a second centrifugation, the pellets were rinsed in 10 ml of half-strength seawater (18 practical salinity units, psu), then centrifuged again. The pellets were resuspended in a mixture of 2 ml glycerol, 4 ml seawater (36 psu), and 4 ml distilled water. Aliquots of 1 ml were stored in liquid nitrogen for adhesion test, and 0.5 ml were diluted to count the viable yeast cells (ca. 10^7 CFU ml^{-1} , counted on YPD agar). Sea bass larvae were euthanized at 41 dph with 2-phenoxyethanol (1 ml l^{-1}), and the intestine was dissected to obtain ca. 5-mm-long segments. These segments were introduced into cell culture inserts fitted with 8- μm porous membrane (Falcon 3097). The inserts were placed into a 24-well plate (Multiwell Falcon 3504), in wells containing 1 ml of the labelled yeast and 1 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; Sigma P 4417). After 30 min incubation, the gut segments were rinsed three times by moving the inserts into three consecutive wells containing 2 ml of clean PBS. Finally, the fluorescent yeast remaining on the gut was observed under an epifluorescence microscope (magnification $500 \times$).

By the end of the rearing experiment, sea bass larvae were sampled for microbiological counts according to the method of Gatesoupe (1995). The yeast was counted on YPD agar supplemented with antibiotics (chloramphenicol, 1 mg l^{-1} ; polymyxin B sulfate, 1.6 mg l^{-1} ; amoxicillin, 2.5 mg l^{-1}).

2.6. Statistical analysis

Results are given as means \pm SD ($n = 4$). Data on survival, trypsin and amylase secretion levels were arcsine transformed ($\arcsin x^{1/2}$). The variance homogeneity of the data was checked using Bartlett's test (Dagnelie, 1975). Data were compared by

Table 1

Polyamine concentration (nM ml⁻¹) in cell homogenate (H) and free-cell culture medium (FC) at the early stationary phase of development of *D. hansenii* HF1 and *S. cerevisiae* X2180

Strain	Putrescine		Spermine		Spermidine	
	H	FC	H	FC	H	FC
<i>D. hansenii</i> HF1	6.13	6.22	6.38	38.67	17.33	31.54
<i>S. cerevisiae</i> X2180	1.12	2.11	5.25	13.40	6.84	10.84

one-way ANOVA followed by Neuman Keul's multiple range test when significant differences were found at the 0.05 level.

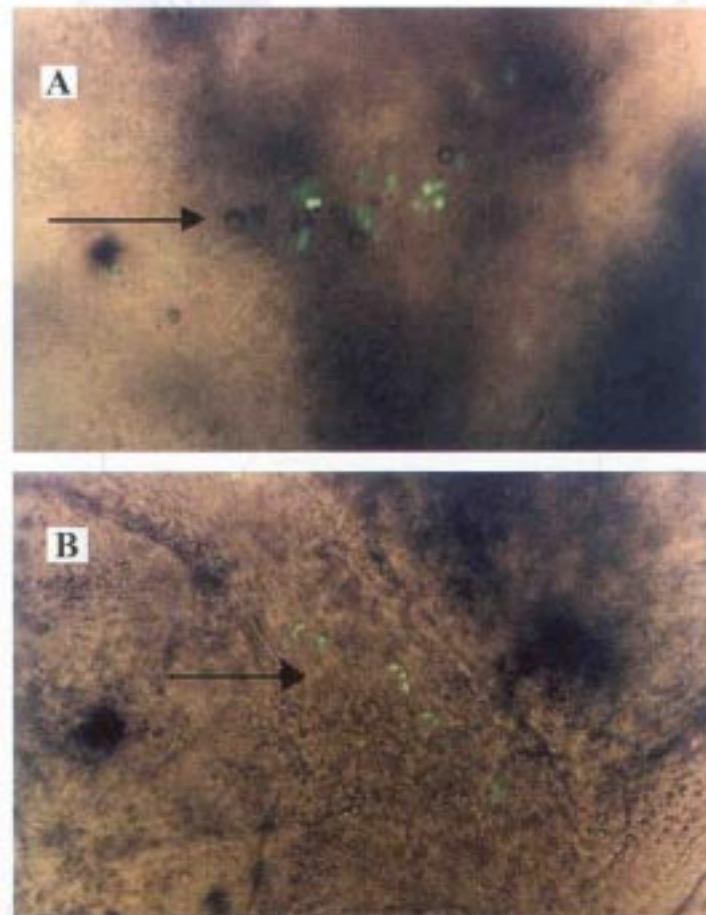


Fig. 1. Fluorescently labelled yeasts (A) *D. hansenii* HF1 and (B) *S. cerevisiae* X2180 adhering to the gut of sea bass larvae (500×).

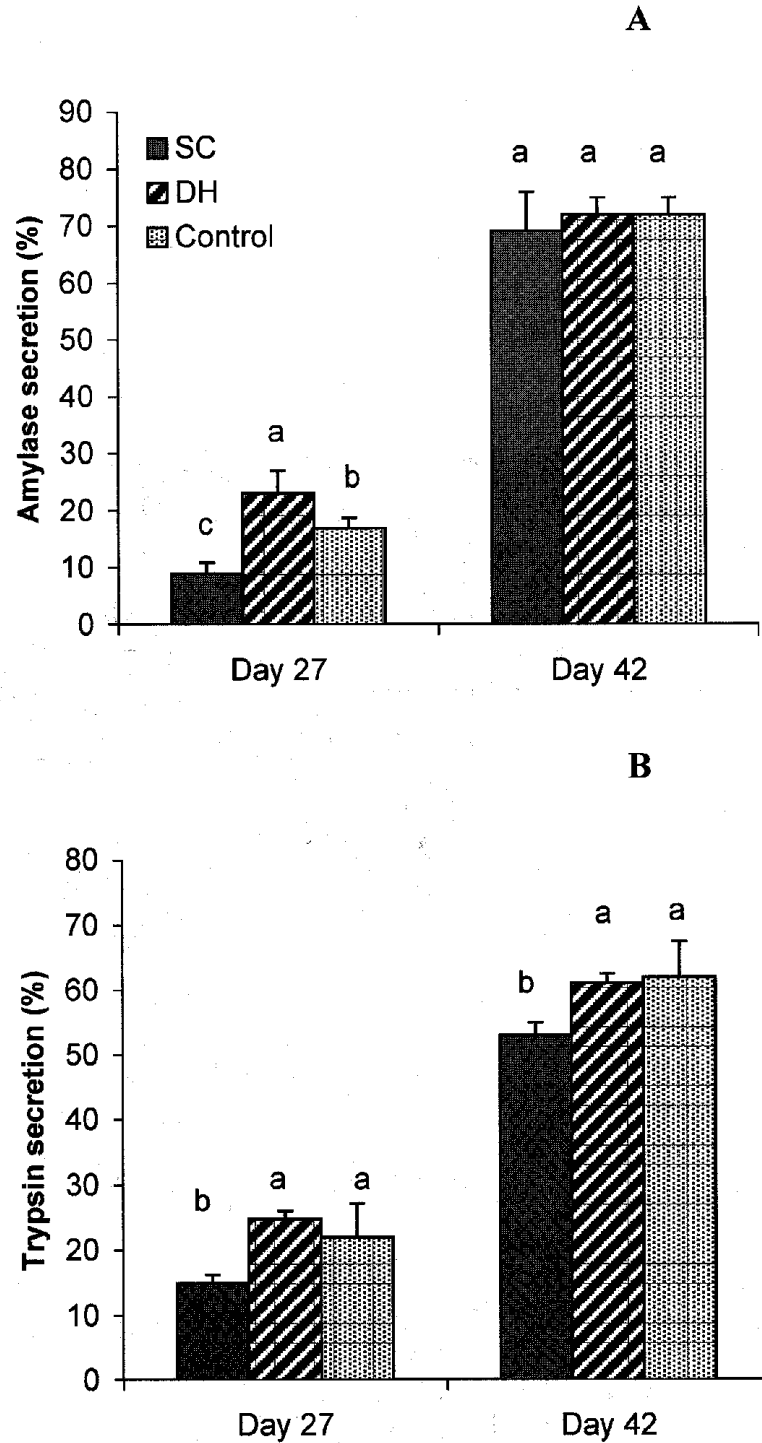


Fig. 2. Percent amylase (A) and trypsin (B) activity in the intestinal segment related to total activity (pancreatic plus intestinal segment) per larvae at 27 and 42 dph. Means \pm SD ($n = 3$) with different superscripts for the same day are significantly different ($P < 0.05$).

3. Results

Three polyamines putrescine, spermidine and spermine were produced by the two yeasts, but the amounts retrieved in the culture medium of *D. hansenii* were three times higher than those of *S. cerevisiae* (fraction FC, Table 1). Spermine and spermidine were the main polyamines produced by the two strains. The spermidine content in *D. hansenii* cells was double of that observed in *S. cerevisiae* (fraction H). The difference in spermine contents was slight, but putrescine was six times more abundant in *D. hansenii* cells than in *S. cerevisiae*.

The two strains adhered to the digestive tract of sea bass at 41 dph, as fluorescently labelled cells remained on the intestinal segments after three rinsings (Fig. 1). This was confirmed by the recovery of 2.5×10^2 colony forming units (CFU) of yeast per larva fed with DH, and 1.5×10^2 CFU per larva fed with SC. Yeast was not detected in the larvae fed with the basal diet.

At 42 dph, survival was significantly higher in DH group ($44 \pm 2.1\%$), compared to that observed in the control group and the SC group ($36 \pm 3.9\%$ and $35 \pm 1.6\%$, respectively). A larval wet weight of 40 ± 1.6 mg was reached at 42 dph in the control group, and it was significantly higher than that of DH (30 ± 1.8 mg) and SC (29 ± 2.1 mg) groups. Rate of spinal malformation was significantly lower in the group fed with DH diet ($0.9 \pm 0.7\%$) than in the control group and group fed with SC ($5.9 \pm 1.34\%$ and $4.1 \pm 1.22\%$, respectively).

Fig. 2A shows the ratio between amylase content in intestinal segment related to amylase content in pancreatic + intestinal segment (total amylase content). This ratio represents the amylase secretion in 27- and 42-dph larvae. Pancreatic secretion of amylase was threefold higher in DH larvae than in SC larvae, and 1.5 times higher than in the control group at 27 dph. Amylase secretion increased in the three dietary groups between 27 and 42 dph to reach the same level at 42 dph. Trypsin secretion (Fig. 2B), assessed in the same way as amylase, was at a similar level in the control group, and in the DH group at 27 dph, then increased similarly at 42 dph. Trypsin secretion in SC group was lower than in the two other groups at 27 and 42 dph.

Table 2

Activity of brush border membrane enzymes versus cytoplasmic leucine–alanine peptidase in 27- and 42-day-old sea bass larvae fed with control diet or diet containing yeast X2180 (SC diet) or *D. hansenii* (DH diet)

Data are given as means \pm SD ($n = 3$). Values with a different superscript letter in a same row are significantly different ($P < 0.05$).

	SC	DH	Control
<i>Day 27</i>			
AP ($\times 10^6$)	7 ± 2.0^c	56 ± 5.4^a	21 ± 3.6^b
AN ($\times 10^6$)	21 ± 4.5^c	85 ± 10.2^a	45 ± 14.3^b
Maltase ($\times 10^6$)	2.4 ± 0.42^c	6.4 ± 0.75^a	4.3 ± 0.14^b
<i>Day 42</i>			
AP ($\times 10^6$)	324 ± 80.8	303 ± 67.4	232 ± 51.9
AN ($\times 10^6$)	74 ± 21.8	65 ± 19.8	105 ± 26.2
Maltase ($\times 10^6$)	66 ± 18.0	53 ± 3.5	41 ± 5.0

Activity ratio of the three intestinal enzymes assayed, AP, AN and maltase, related to leu–ala, was higher for DH group than in the two other dietary groups at day 27. The SC group exhibited the lowest ratios (Table 2). Between day 27 and day 42, specific activity of BBM enzymes increased and specific activity of the cytosolic enzyme decreased for the three dietary groups. At day 42, significant difference did not appear in these ratios between the three dietary groups.

4. Discussion

Growth of sea bass larvae fed exclusively with the compound diet was good in the three dietary groups, compared to that generally obtained with compound diet. This formulated compound diet meets the nutritional requirements of sea bass larvae as reported in Cahu and Zambonino Infante (2001a). The pulverization of yeast suspension on the diet resulted in lower growth rate. It can be assumed that the process of yeast incorporation changed some physical properties of the microparticles. In particular, a decrease of buoyancy was observed, and the sprayed particles sank faster. In this case, feed ingestion by larvae could be reduced. Yeast incorporation during raw material mixing should be considered in further experiments. *D. hansenii* HF1 is a strain isolated from rainbow trout with a high capacity to colonize the gut of this fish (Andlid et al., 1995). The present results do not indicate that the capacity to adhere to larval sea bass intestine was significantly different from that of the reference strain *S. cerevisiae* X2180. However, the colonization level observed in both strains was high in comparison with that observed in trout intestine. It corresponded to 10^4 CFU g^{-1} on a body weight basis, i.e. the same level as that observed by Andlid et al. (1995) but on an intestinal weight basis. The colonization process has been partly explained in terms of the ability of yeast cells to adhere to fish mucus mediated by both specific adhesion and cell surface hydrophobicity (Vázquez-Juárez et al., 1997). Andlid et al. (1995) suggested that the intestine is an important reproduction site and that the yeast can use mucus as the sole source of nutrients. This could contribute to increase yeast numbers in the intestine followed by an increase in polyamine secretion.

Spermine and spermidine were extensively excreted from the cells, whereas putrescine remained at a relatively low level especially in *S. cerevisiae*. The production of the three polyamines in *D. hansenii* was higher than in the reference strain. Most of the polyamines have been reported to have a biological role in cell metabolism and proliferation by stimulating DNA, RNA and protein synthesis (Tabor and Tabor, 1984; Bardócz et al., 1993). Particularly, spermine and spermidine are involved in the differentiation and maturation of the intestinal tract in mammals (Buts et al., 1993). Recently, the role of polyamine in gut maturation of sea bass larvae was evidenced by dietary incorporation of purified spermine (Péres et al., 1997).

Indeed, digestive tract of marine fish is not completely formed at hatching and undergoes major biochemical and physiological changes over several weeks. The digestive processes appear sequentially during the first weeks of life in fish larvae (Dabrowski, 1986; Beccaria et al., 1991). Secretory functions of exocrine pancreas take place chronologically after synthesis functions (Cahu and Zambonino Infante, 1994).

The acquisition of an efficient secretory function in pancreas characterizes the maturation of pancreas. In intestine, cytosolic digestion is well-developed in young larvae and decreases around 25 dph in sea bass, concurrent to an increase of brush border membrane enzyme activity (Cahu and Zambonino Infante, 1995). The change from cytosolic digestion to membranous digestion in enterocyte reflects the change from a larval digestion to an adult mode of digestion. This phenomenon, common to all the studied vertebrates, constitutes the maturation of intestine (Henning, 1985). The maturation level of intestinal digestion can be evaluated by considering the segmental activity ratio of brush border enzymes vs. leu–ala peptidase, which reflects the relative importance of the brush border membrane digestion compared to intracellular digestion.

In our study, elevated levels of amylase and trypsin activities in 27-dph larvae fed with *D. hansenii* showed that the maturation of secretory functions of pancreas in this group was earlier than in the other groups. At day 42, secretion levels of amylase were similar in the three groups, suggesting that the pancreatic maturational process for this enzyme was achieved in the three groups. However, the level of trypsin secretion was still inferior at 42 dph in the larvae fed with *S. cerevisiae* in comparison with the two other groups. It can be suggested that this diet including *S. cerevisiae* tends to delay pancreas maturation. The ratio of activity of brush border membrane enzymes related to cytosolic enzymes was more elevated at 27 dph in group fed with *D. hansenii*, suggesting that this strain improved gut maturation. Intestinal maturation was achieved in the three groups at 42 dph.

In this experiment, the early maturation of pancreas and intestine gave increased survival as shown by Cahu and Zambonino Infante (2001b).

The facilitation of gut maturation and the consequently improvement of survival in group fed with DH can be attributed to the effect of high spermidine and spermine secretion by *D. hansenii* HF1. According to Buts et al. (1993), polyamines initiate and control the expression of adult pattern of intestinal cell functions by acting directly on gene expression at transcriptional and post-transcriptional level. Vertebrate intestinal cells might contain a “local timer” genetically hard-wired (Diamond, 1986), switching on differentiation at the age of 21 day in rats (Dufour et al., 1988) and around 25 days in sea bass (Cahu and Zambonino Infante, 1994). Polyamines act as modulating factors of an internal biological clock (Dufour et al., 1988).

Dietary incorporation of *S. cerevisiae* X2180 did not trigger gut maturation. Two hypotheses need to be tested: (1) the polyamine secretion level of this strain is too low to trigger gut maturation in sea bass, and (2) this strain produced other compound(s) that counteracted the effect on gut maturation. The introduction of live yeast into dry diet for fish larvae deserves further attention. This may be a way to deliver polyamines in situ for gut maturation, but the preparation of the diet needs to be improved.

Acknowledgements

This study is a part of Programme PM98S03, supported by the French–Mexican Committee ECOS-Nord and partially financed by Project 25956B from CONACYT. The first author was also supported by Fellowship 84016 from CONACYT.

References

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30, 321–334.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L., 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 115–126.
- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztaí, A., 1993. Polyamines in food—implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.* 4, 66–71.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture* 99, 339–354.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buchet, V., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184, 339–347.
- Buts, J.P., De Keiser, N., Kolanowski, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Role of dietary polyamines. *Dig. Dis. Sci.* 38, 1091–1098.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213–222.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431–437.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001a. The phospholipid fraction of dietary lipid supply is determining for sea bass larval development. *J. Nutr.*, in press.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001b. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, in press.
- Chatain, B., 1997. Development and achievements of marine fish-rearing technology in France over the last 15 years. *Hydrobiologia* 358, 7–11.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264–267.
- Dabrowski, K., 1986. Ontogenical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 639–655.
- Dagnelie, P., 1975. Les méthodes de l'inférence statistique. In: Ducolot, J. (Ed.), *Théorie et Méthodes Statistiques*, vol. 2, Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, pp. 1–463.
- Dahlqvist, A., 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzym. Biol. Clin.* 11, 52–56.
- Diamond, J.M., 1986. Hard-wired local triggering of intestinal enzyme expression. *Nature* 324, 408–409.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology* 95, 112–116.
- Gatesoupe, F.J., 1995. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquacult. Int.* 3, 150–154.
- Henning, S.J., 1985. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu. Rev. Physiol.* 47, 231–245.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.* 118, 515–520.
- Malle, P., Valle, M., Bouquelet, S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.* 79, 43–49.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.* 26, 133–142.
- Nicholson, J.A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63, 110–117.

- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 479–485.
- Ribeiro, L., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 179, 465–473.
- Sherman, F., 1991. Getting started with yeast. In: Guthrie, Ch., Fink, G.R. (Eds.), *Methods in Enzymology. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol. 194, Academic Press, New York, pp. 3–21.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B., Fallon, R.D., 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 958–965.
- Tabor, C.W., Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 64–71.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed different artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139, 129–138.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127, 608–614.



Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development

D. Tovar-Ramírez^{a,b,*}, J. Zambonino Infante^b, C. Cahu^b,
F.J. Gatesoupe^b, R. Vázquez-Juárez^a

^a Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Patología Marina, POB 128, La Paz, BCS CP 23000, Mexico

^b Unité Mixte INRA–IFREMER de Nutrition des Poissons, BP 70, 29280, Plouzané, France

Received 21 November 2003; received in revised form 28 January 2004; accepted 28 January 2004

Abstract

Recent results have demonstrated that live yeast in diets improved gut maturation in sea bass larvae. In this study, we tested the absence and two levels of live yeast in sea bass larvae diets. Specimens were fed from time of mouth opening to 37 days after hatching a diet of 0%, 1.1%, or 5.7% wet weight of live yeast (*Debaryomyces hansenii* CBS 8339). Yeast incorporation improved survival 10%, and reduced malformed larvae. In groups fed 1.1% yeast, only 1% of larvae were malformed, compared to 14% in the control group. Final mean weight in groups fed 1.1% yeast was twice that of other groups. Activities and concentrations of mRNA trypsin and lipase were higher in the two groups fed yeast than in the control group, whereas activity and concentration of mRNA amylase were lower. This suggests that the pancreas matured faster in the two groups fed yeast. Activities of intestinal enzymes alkaline phosphatase, aminopeptidase N, and maltase in the group fed 1.1% yeast were higher than those in the two other groups, revealing earlier development of intestinal digestion. The best results were obtained with the diet containing 1.1% yeast cell biomass, corresponding approximately to 10^6 CFU g^{-1} in the diet and 1.1×10^4 CFU per larva 30 days after hatching. The dose-dependent effect of yeast on rearing performance could be attributed to the amount of polyamines secreted by live yeast in the gut lumen of larvae.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fish larvae; Gut maturation; Enzymes; Amylase, trypsin, lipase; Polyamines

* Corresponding author. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Patología Marina, POB 128, La Paz, BCS CP 23000, Mexico. Tel.: +52-612-1238518; fax: +52-612-1253625.

E-mail address: dtovar04@cibnor.mx (D. Tovar-Ramírez).

1. Introduction

As commercial aquaculture expands, juvenile marine fish production still depends on the supply of live food organisms. Compound diets are considered an alternative to live prey in rearing marine fish larvae (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). Probiotics are microbial cells that are administered to enter and stay alive in the gastrointestinal tract with the aim of improving health, and might enhance the quality of farmed fish (Gatesoupe, 1999). Yeasts are promising candidates as probiotics, because of their abilities to produce polyamines and to adhere and grow in the intestinal mucus of fish (Buts et al., 1994; Vázquez-Juárez et al., 1997; Andlid et al., 1998; Tovar et al., 2002). Polyamines are ubiquitous molecules that participate in numerous biological processes (Tabor and Tabor, 1984), including cell replication and differentiation, and biosynthesis of nucleic acids and proteins (Bardócz et al., 1993). The role of dietary polyamines in mammals has been studied extensively, but literature concerning their effects on fish is scarce. Péres et al. (1997) observed a dose-dependent effect of purified spermine on gut maturation in sea bass larvae weaned onto dry food. Recently, Tovar et al. (2002) incorporated live yeast by spraying different strains on pellets fed to sea bass larvae, from mouth opening onwards. These authors showed that *Debaryomyces hansenii* enhanced maturation of the digestive tract in marine fish larvae. It was suggested that the beneficial effect on the digestive tract was due to high secretion of spermine and spermidine by the yeast. Nevertheless, larval growth did not increase with the introduction of spermine or yeast in these preliminary experiments. The aims of the present study were to optimize the incorporation method and amount of live yeast in a compound diet.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

The yeast *D. hansenii* (CBS 8339) was isolated from the gut of rainbow trout (Andlid et al., 1995). It was cultured in yeast extract peptone dextrose broth (YPD) (Sherman, 1991) until the early stationary phase. The cell suspension was then concentrated by centrifugation at $3000\times g$, and rinsed with sterile water for 5 min at 4 °C. Five sea bass larvae were sampled at 30 dph from each of the four replicates for microbiological counts, according to the method of Gatesoupe (1995). The yeast was counted on YPD agar supplemented with antibiotics (chloramphenicol, 1 mg l⁻¹; polymyxin B sulfate, 1.6 mg l⁻¹; Amoxicillin, 2.5 mg l⁻¹).

2.2. Animals and diets

European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) were provided by the marine farm Aquanord (Gravelines, France) and reared at IFREMER, Centre de Brest until 37 days post-hatching (dph). Larvae were distributed into 12 conical fiberglass tanks (35 l) at 2 dph, with initial stocking density of 60 larvae l⁻¹. They were supplied with running

seawater which had been filtered through a sand filter, then passed successively through a tungsten heater and degassing column packed with plastic rings. Temperature range was 18–19 °C, salinity 34.5 g/l. Oxygen level was maintained above 6 mg/l by setting the water exchange up to 30% per h (flow rate: 0.18 l per min). Light intensity was 9 Wm⁻² maximum at the surface. From 6 days post-hatching (dph) onwards, larvae were fed one of three compound diets, 4 tanks each, containing 1.1% yeast, 5.7% yeast, or no yeast (control). The 1.1% and 5.7% diets contained approximately 10⁶ and 6×10⁶ colony-forming units (CFU) g⁻¹, respectively. The basal diet (patent WO 0064273) contained 58.4% protein, 21.3% lipid (7.8% neutral lipid and 11.6% phospholipid), 12.2% ash related to dry matter, and 9.8% moisture. The dietary ingredients, including yeast, were mixed with water, pelletized, and dried at 45 °C for 20 min. The pellets were sieved to obtain particles of two size ranges: 120–200 and 200–400 µm. The larvae were fed in excess with belt feeders 18 h per day, with 120–200 µm particles from 6 to 20 dph, and with 200–400 µm particles thereafter.

2.3. Sampling and dissection

Larval growth for each dietary group was determined every week on the morning before feeding at 13, 20, 27, 34, and 37 dph by sampling 10 larvae tank⁻¹ (4 tanks per dietary group). These sampling days correspond to critical developmental phases of digestive functions of sea bass larvae (Cahu and Zambonino-Infante, 1994). For enzymatic analysis, 50 larvae were collected from each tank on days 26 and 36. Another 60 larvae were collected for mRNA studies from only three tanks the same sampling days, following the method of Cahu and Zambonino-Infante (1994). Dissection produced a crude mixture of organs of each segment. The pancreatic segment contained pancreas, liver, heart, muscle, spine and a very short portion of intestine. The intestinal segment contained intestine, muscle, and spine. Nevertheless, the assays revealed actual gut digestive activity, since the enzymes assayed were located mainly in digestive organs (Zambonino-Infante et al., 1997). Larvae for enzymatic assays were frozen and stored at –80 °C until determination, and those for RNA extraction were processed immediately. At the end of the experiment, survival was determined by counting the individuals in each tank, and spinal malformation by examining 50 larvae per tank with a binocular microscope.

2.4. Enzymatic measurements

Pancreatic segments were homogenized in 5 volumes (v/w) of cold distilled water (4 °C): final volumes were between 3 and 5 ml. The three pancreatic enzymes were assayed in duplicates using 50 µl homogenate each. Trypsin activity was assayed according to Holm et al. (1988) using *N*α-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA, Sigma) as substrate. Amylase activity was assayed according to Métails and Bieth (1968), using iodine solution to reveal non-hydrolyzed starch. Lipase was assayed according to Iijima et al. (1998) using *p*-nitrophenyl myristate (Sigma) as substrate. Brush border membranes (BBM) from the intestinal segment were purified according to a method developed for intestinal scraping (Crane et al., 1979). BBM enzymes, aminopeptidase N

Table 1
Primer sequences and annealing temperatures

Primer	5' Primer	3' Primer	Annealing temperature (°C)
Trypsin ^a	CAggTgTCTCTgAAC	CCCA(Ag)gACACAACACCCCT	60
Amylase	TT(CT)gAgTggCgCTgg	(Ag)ggCCACATgTgCTT	52
Lipase ^b	TGTggCTTCAACAgC	CgC TCCAAg(Ag)CT GTA	50
GAPDH ^a	gCCATCAATgACCCCTT	ggTgCAggATgCATTgC	50

^a Pères et al. (1998).

^b This work.

(AN), maltase, and alkaline phosphatase (AP) were assayed according to Maroux et al. (1973), Dahlqvist (1970), and Bessey et al. (1946), respectively, expressed as IU/mg protein. Protein was determined according to Bradford (1976).

2.5. mRNA quantification

TRIzol[®] reagent (Gibco BRL) was used for total RNA extraction. Then, 5 µg total RNA was reverse-transcribed to cDNA with the Ready To Go T-Primed First-Strand kit (Pharmacia Biotech). Primers and annealing temperatures are given in Table 1. Next, 50 µl reaction mixture containing 1 µl cDNA, 2.5 U of *Taq* polymerase (Qbiogene), 40 nM dNTPs (Eurogentec), 50 pmol of each primer, 1X buffer solution (Qbiogene), and water sufficient to make 50 µl solution were amplified in a thermocycler (Robocycler[®] gradient 96, Stratagene). PCR conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 30 s, followed by 30 cycles including denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at specific enzyme temperatures for 1.5 min, and 2 min elongation at 72 °C. A final extension cycle was performed at 72 °C for 7 min. Quantification of RT-PCR products coding for each enzyme was performed by applying 2–10 µl of each product to a 3% agarose–1 µg/ml ethidium bromide gel (2% agarose plus 1% low melting temperature

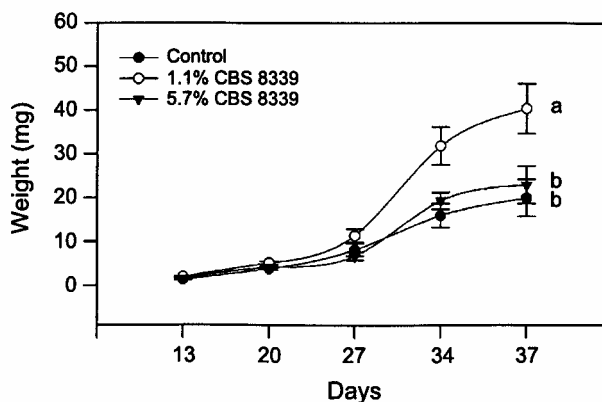


Fig. 1. Growth of *D. labrax* larvae fed a control diet and two diets containing different percentages of yeast. Each data point represents observations for 40 randomly taken larvae treatment⁻¹. Means ± S.D. with different superscripts for the 37 dph are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2

Percent survival and spinal deformity of sea bass larvae fed with or without (control) diets supplemented with yeast

Group	Survival (%)	Larvae with spinal malformation (%)
Control	42.4±0.79 ^b	13.6±5.53 ^a
1.1% CBS 8339	46.3±0.82 ^a	1.1±1.63 ^b
5.7% CBS 8339	45.8±0.30 ^a	6.5±2.81 ^a

Results relating to survival are presented as means±S.D. of quadruplicate observations. Total number of larvae employed per tank at trial start was 2100 ($n=8400$ per treatment).

Observations relating to spinal deformity were made for 50 animals tank⁻¹ ($n=200$ treatment⁻¹).

agarose). The cDNA spots were captured in a multi-imager (Fluor S-Multimager System, Bio-Rad) and measured by software (Scion Image, available at <http://www.scioncorp.com/>). The quantification of mRNA coding for each enzyme was normalized relative to the mRNA-specific housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Values obtained for amylase, lipase, and trypsin were normalized to GAPDH by calculation of the mRNA of each enzyme/GAPDH mRNA.

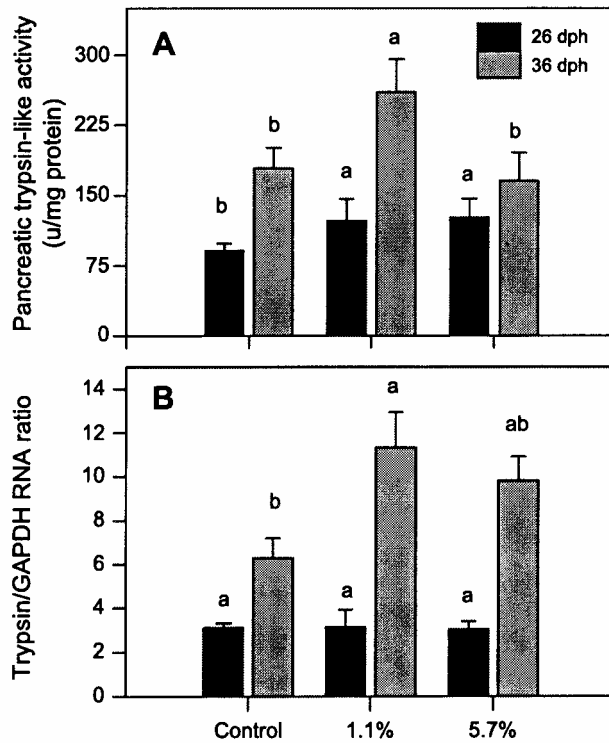


Fig. 2. Trypsin-like activity (A) and ratio of mRNA trypsin to mRNA GAPDH concentrations (B) in pancreatic segments of *D. labrax* larvae fed a control diet and two diets containing yeast, at 26 and 36 dph. Means±S.D. ($n=4$ for enzymes activities; $n=3$ for RNA ratios) for the same day with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.6. Acquisition of cDNA probe coding for lipase

cDNA was obtained as described above and primers specific for lipase (Table 1) were obtained by alignment of most conserved regions from those sequences that coded for triglyceride lipase of zebrafish (EMBL AW018709) and mice (EMBL X58426). Purified lipase fragment (288 bp) was obtained according to the protocol of GeneClean Spin kit (BIO 101 USA) and cloned according the protocol of Topo Ta Cloning (Invitrogene, The Netherlands) into TOP10F' competent cells, using the pCR® 2.1-TOPO® as a vector. Plasmids were obtained by mini-prep according to RPM kit (BIO 101 USA) and sequenced. The resulting sequence was deposited at the European Bioinformatics Institute (EMBL) under access number AJ275976.

2.7. Statistical analysis

The samples from each treatment (4 tanks; 3 tanks for mRNA studies) were maintained as separate entities and the results are given as mean \pm S.D ($n=4$; $n=3$ for mRNA studies). Data on survival, and trypsin, amylase, and lipase secretion levels were

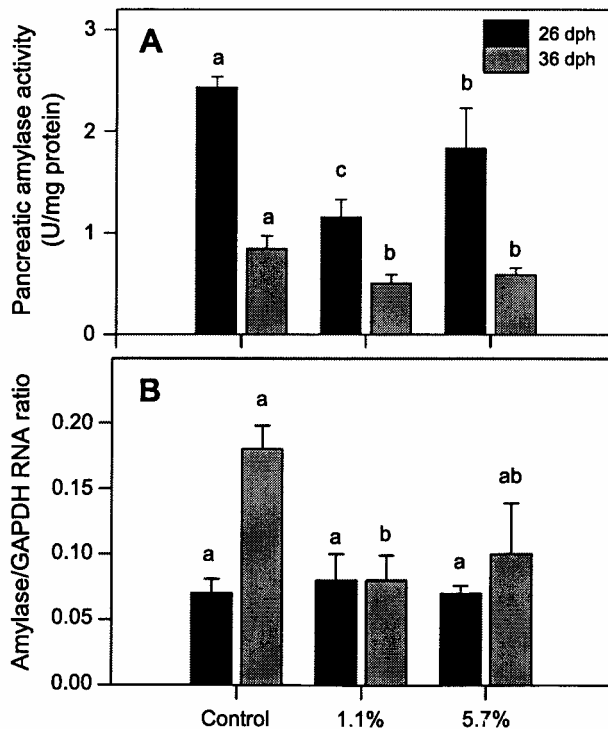


Fig. 3. Amylase activity (A) and ratio of mRNA amylase to mRNA GAPDH concentrations (B) in pancreatic segments of *D. labrax* larvae fed a control diet and two diets containing yeast, at 26 and 36 dph. Means \pm S.D. ($n=4$ for enzymes activities; $n=3$ for RNA ratios) for the same day with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

arcsine transformed ($\arcsin x^{1/2}$). The variance homogeneity of the data was checked, using Bartlett's test (Dagnelie, 1975). Data were compared by one-way ANOVA followed by Neuman–Keul's multiple-range test when significant differences were found ($P<0.05$).

3. Results

At 30 dph, yeast was recovered from the gut of sea bass larvae at the rate of $(1.1\pm 0.2)\times 10^4$ and $(6.9\pm 0.3)\times 10^4$ CFU per larva fed 1.1% and 5.7% live yeast, respectively. The yeast was not detected in the control group.

The growth of larvae fed 1.1% live yeast was twice that of either of the two other dietary groups at 36 dph (Fig. 1). Also, survival of larvae fed either concentration of yeast was significantly higher than the control group (Table 2). The 1.1% yeast diet produced a larvae malformation rate $(1.1\pm 1.63\%)$ lower than either 5.7% yeast or the control $(6.5\pm 2.81\%$ and $13.6\pm 5.53\%$, respectively).

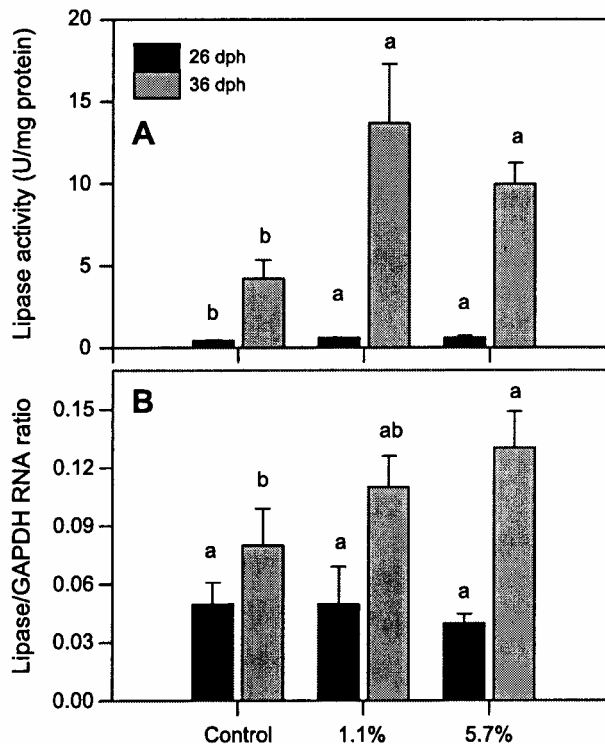


Fig. 4. Lipase activity (A) and ratio of mRNA lipase to mRNA GAPDH concentrations (B) in pancreatic segments of *D. labrax* larvae fed a control diet and two diets containing yeast, at 26 and 36 dph. Means \pm S.D. ($n=4$ for enzymes activities; $n=3$ for RNA ratios) for the same day with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

At 26 dph, trypsin-specific activity was higher in larvae fed either concentration of yeast than in control diet larvae (Fig. 2A). However, mRNA coding for trypsin on the same date was the same for all experimental groups (Fig. 2B). At 36 dph, the highest

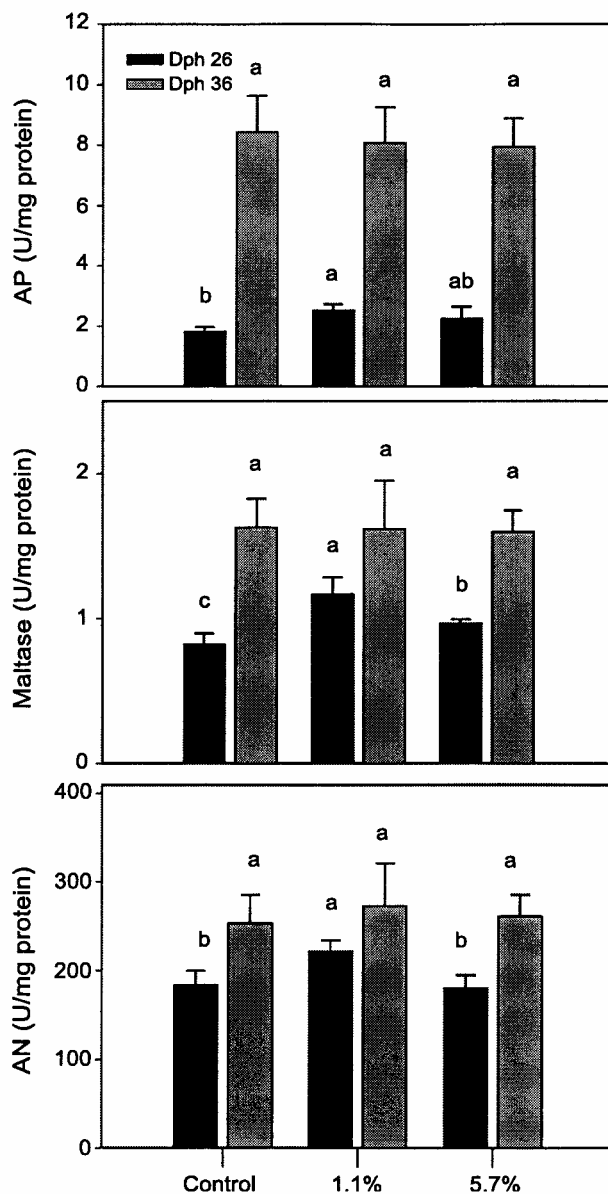


Fig. 5. Specific activity of alkaline phosphatase (AP), maltase and aminopeptidase N (AN) from brush border membrane of *D. labrax* larvae fed diet and diets containing two levels of yeast at 26 and 36 dph. Means \pm S.D. ($n=4$) with different superscripts for the same day are significantly different ($P<0.05$).

trypsin specific activity and mRNA concentrations were observed in the group fed 1.1% yeast. This trypsin activity should be considered as a trypsin-like activity since pancreatic segment contains a little portion of intestine. In contrast to trypsin, amylase specific activity at 26 and 36 dph was higher in the control group than those fed yeast (Fig. 3A). The mRNA ratios also were highest for the control group at 36 dph (Fig. 3B). Amylase mRNA levels were the same for all groups at 26 dph.

At 26 and 36 dph, specific lipase activity was higher in larvae fed yeast (Fig. 4A). However, at 26 and 36 dph, mRNA concentration for this enzyme was not significantly different in any group (Fig. 4B).

At 26 dph, higher specific activities for brush border membrane enzymes AP, maltase, and AN were observed in larvae fed 1.1% yeast (Fig. 5). At 36 dph, all groups presented the same enzymatic activity.

4. Discussion

Larvae survival and skeletal development were better in the two groups fed diets containing yeast than in the control group. Moreover, a marked effect on growth of fish larvae was noted for the first time. Growth improvement by live yeast incorporation in diet has been previously described in juvenile and adult fish. Noh et al. (1994) showed that dietary incorporation of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) led to 10% increase in weight gain in 4 kg carp. These effects have been demonstrated also in developing mammals, particularly in pigs (Bertin et al., 1997).

The beneficial effects of dietary live yeast seem particularly determining in developing animals, since it affects survival, growth, and conformation. Interestingly, the effect on growth in our experiment was observed in the group fed 1.1% yeast but not in the group with 5.7% yeast. The amount of yeast retrieved from larvae was almost proportional to the dietary level, suggesting that yeast cells were kept alive in the gut, and that the yeast did not act through a direct nutritional effect. The incorporation of large proportions of inactive yeast up to 50% of dietary ingredients in fish diet was tested as a protein source alternative to fish meal, but no significant improvement in growth was reported (Métailler and Huelvan, 1993; Oliva-Teles and Gonçalves, 2001). The positive effects of live yeast might be due to molecules such as growth factors released by the yeast, and acting at low concentration. The yeast used in this experiment, *D. hansenii*, secretes several polyamines in higher quantities than other strains incorporated in test diets for humans and animals (Table 3). Putrescine, spermine, and spermidine are considered essential growth factors (Bardócz, 1993).

Péres et al. (1997) reported enhanced survival in sea bass larvae fed diets containing purified spermine. Tovar et al. (2002) also observed a beneficial effect on sea bass survival by spraying live yeast on micropellets, but this incorporation method changed some physical properties of the microparticles, leading to a decrease in feed ingestion that adversely affected larva growth. Mixing yeast with raw material preserved the physical properties of micropellets. This new process, combined with a lower drying temperature (45 °C), improved yeast survival in fish larvae. This improvement was illustrated by the fact that 1.1×10^4 CFU yeast larva⁻¹ were recovered from larvae fed the diet containing

Table 3
Concentration of polyamines ($\mu\text{mol/g}$) measured in different yeast species

Yeast	Putrescine	Spermidine	Spermine
<i>S. boulardii</i> ^a	0.095	3.76	2.93
<i>S. cerevisiae</i> ^b	0.45	2.00	0.30
<i>D. hansenii</i> , CBS 8339 ^c	6.12	17.32	6.38

^a Buts et al. (1994).

^b Tabor and Tabor (1985).

^c Tovar et al. (2002).

10^6 CFU g^{-1} (1.1%), whereas 2.5×10^2 CFU larva⁻¹ were retrieved in the previous experiment with the diet containing a similar dose of the same strain (ca. 7.5×10^5 CFU g^{-1} ; Tovar et al., 2002).

A different mode of yeast action can be considered to explain the better performance of larvae fed live yeast. We hypothesized that live yeast induced better performance than inactive yeast or purified polyamines, because live yeast provided polyamines in situ in the intestine. Nevertheless, 5.7% yeast and consequent high release of polyamines in the intestinal lumen did not lead to faster larval growth. The diet of these larvae contained 6.9×10^4 CFU per individual, but their growth was close to that of the control in which *D. hansenii* was not detected. It remains possible that increased levels of dietary yeast led to growth depression due to elevated levels of putrescine, as has been previously observed in chicks (Smith, 1990). Sousadias and Smith (1995) showed that spermine is more toxic than putrescine, and observed adverse effects on growth for dietary concentrations higher than 0.075%.

The dietary incorporation of purified polyamines or live yeast that secrete polyamines influenced intestinal cell differentiation in developing and adult animals (Buts et al., 1994; Deloyer et al., 1996). In young animals, cell differentiation matures digestive functions of the intestine and pancreas in mammals (Peulen et al., 2000) and in fish (Péres et al., 1997). Maturation of the pancreas and intestine was characterized extensively for sea bass larvae fed live prey or compound diets (Cahu and Zambonino-Infante, 1995). A recent review extended this description to larvae of other marine species (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). In our experiment, maturation of the exocrine pancreas of all dietary groups was observed between day 26 and day 36. This was a functional maturation, since pancreas organogenesis in sea bass is reached around 3 days post-hatching (Beccaria et al., 1991). After this time, a growth phase only has been reported for this organ. A decrease in amylase expression and an increase in trypsin and lipase expression during normal development were reported for sea bass larvae fed live prey (Cahu and Zambonino-Infante, 1995; Zambonino-Infante and Cahu, 1999). In our work, larvae fed yeast matured earlier than control after day 26, as revealed by lower amylase expression and higher lipase and trypsin expression.

Precocious maturation of intestinal cells was observed also in the larvae fed yeast. This was revealed at day 26 by higher activity of brush border membrane enzymes alkaline phosphatase, aminopeptidase N, and maltase in these two groups than in control. Day 26 coincides with the beginning of the maturation process of enterocytes as described for larvae fed live prey (Cahu and Zambonino-Infante, 1995). Cahu and Zambonino-Infante

(1995) reported that higher activities in brush border membranes of young larvae were correlated with higher survival. The three groups apparently matured at day 36 since their enzyme activities were the same at that time.

Polyamines seem to have a broad influence on digestive tract maturation. Particularly, the roles of dietary spermine and spermidine were described by Dufour et al. (1988). These molecules enter enterocytes, inducing a hormonal cascade that affects organs like the pancreas and liver (Peulen et al., 2000). In our experiment, it is likely that the polyamines secreted by yeast influenced pancreatic maturation by enhanced transcription of trypsin and lipase expression, and lowered amylase messenger transcription.

Assimilation of polyamines enhanced maturation and induced a pattern of adult enzyme expression in sea bass larvae, as observed by Péres et al. (1997), who used synthetic spermine. In this sense, *D. hansenii* strain CBS 8339 appears to be a good candidate for diet supplementation because it adheres to the gastric mucus (Vázquez-Juárez et al., 1997) and produces polyamines in situ. *D. hansenii* produces significant amounts of putrescine. However, spermidine and spermine are considered the “right polyamines” because putrescine is converted mainly to non-polyamine metabolites (Bardócz et al., 1993).

The beneficial effects of live yeast on sea bass larvae development could be attributed to the role of polyamines in promoting intestinal maturation and increasing the ability of enterocytes to absorb nutrients. Bardócz et al. (1993) argued that polyamine requirements are higher in young animals during periods of intensive growth. However, the results of our experiment indicate that *D. hansenii* yeast population should not exceed approximately 10^4 CFU larva⁻¹ for an optimum effect in sea bass development.

Acknowledgements

This study is a part of program PM98S03, supported by the French–Mexican Committee ECOS-Nord, and partially financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Project 25956B). The first author was supported also by CONACYT fellowship 84016 and by the French National Institute for Agronomic Research (INRA). CIBNOR editing staff suggested improvements to the text.

References

- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L., 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30, 321–334.
- Andlid, T., Vázquez-Juárez, R., Gustafsson, L., 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 115–126.
- Bardócz, S., 1993. The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47, 683–690.
- Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., Pusztai, A., 1993. Polyamines in food—implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.* 4, 66–71.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared extensively and intensively. *Aquaculture* 99, 339–354.
- Bertin, G., Brault, M., Baud, M., Mercier, M., Tourmut, J., 1997. *Saccharomyces cerevisiae* I-1079, microbial feed additive: zootechnical effects on piglets. Annual meeting of the European Association for Animal Production, Vienna (Austria), August 25–28. Wageningen Press, Wageningen (NLD). 418 pp.

- Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321–329.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buts, J.P., Keyser, N., Raedemaeker, L., 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.* 36, 522–527.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 213–222.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431–437.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161–180.
- Crane, R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Biochim. Biophys. Acta* 554, 264–267.
- Dagnelie, P., 1975. Les méthodes de l'inférence statistique. In: Ducolot, J. (Ed.), *Théorie et Méthodes Statistiques*, vol. 2. Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, pp. 1–463.
- Dahlqvist, A., 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzymol. Biol. Clin.* 1, 52–56.
- Deloyer, P., Dandriofosse, G., Bartholomeus, C., Romain, N., Klimek, M., Salmon, J., Gérard, P., Goessens, G., 1996. Polyamine and intestinal properties in adult rats. *Br. J. Nutr.* 76, 627–637.
- Dufour, C., Dandriofosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology* 95, 112–116.
- Gatesoupe, F.J., 1995. A method for the early assessment of the quality of turbot larvae. *Aquacult. Int.* 3, 150–154.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: in vivo comparison with bovine serum albumin. *J. Nutr.* 118, 515–520.
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59–69.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Métailler, R., Huelvan, C., 1993. Utilisation des levures dans l'alimentation du juvénile de bar (*Dicentrarchus labrax*). In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice* Les Colloques, vol. 61. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 945–948.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Détermination de l' α -amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Clin.* 26, 133–142.
- Noh, S.H., Han, K., Won, T.H., Choi, Y.J., 1994. Effect of antibiotics, enzyme, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. *Korean J. Anim. Sci.* 36, 480–486.
- Oliva-Teles, A., Gonçalves, P., 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 202, 269–278.
- Peulen, O., Deloyer, P., Grandfils, C., Loret, S., Dandriofosse, G., 2000. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. *Livest. Prod. Sci.* 66, 109–120.
- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish. Physiol. Biochem.* 16, 479–485.
- Péres, A., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 145–152.
- Sherman, F., 1991. Getting started with yeast. In: Guthrie, C., Fink, G.R. (Eds.), *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Methods in Enzymology*, vol. 194. Academic Press, New York, pp. 3–21.
- Smith, T.K., 1990. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194, 332–336.
- Sousadias, M.G., Smith, T.K., 1995. Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks. *J. Anim. Sci.* 73, 2375–2381.
- Tabor, C.W., Tabor, H., 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790.

- Tabor, C.W., Tabor, H., 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49, 81–99.
- Tovar, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., Lésel, R., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture* 204, 113–123.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 64–71.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* development. *J. Nutr.* 129, 1195–1200.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae—Review. *Comp. Biochem. Physiol.* 130, 477–487.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labra* larval development. *J. Nutr.* 127, 608–614.