Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Trabajo de Diploma para aspirar al título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Título:

"Bioencapsulación de Streptomyces sp. RL8 en nauplios de Artemia franciscana y estudio de su resistencia contra Vibrio patógeno"

Autor: Pável Adrián Ossorio Alvarez.
Tutores: Dr. C Milagro García Bernal.
Dr. C José Manuel Mazón-Suástegui.

Santa Clara
2017-2018

Exergo

El futuro de nuestra patria tiene que ser necesariamente un futuro de hombres de ciencia (…)

Fidel Castro Ruz, 1965.

Dedicatoria

A *mi madre*, por sus incontables noches de desvelo, por no perder nunca de vista mi trayectoria de estudio, por su amor y apoyo infinito.

A *mi abuela Ramonita*, por inculcarme los valores esenciales que han forjado mi personalidad, a ella, donde quiera que esté le agradezco, por dedicar parte de su vida a mí.

A mi abuela Ana, porque sé que anhela tanto este título como yo.

Agradecimientos

Durante el breve, pero intenso período de tiempo, en el que se desarrolló esta investigación, tengo que agradecer a muchas personas, que en mayor o menor cuantía, han aportado su granito de arena para la realización de la misma.

Primero que todo agradecer infinitamente a Yeny Alvarez Ponce, por ser entre otras cosas: madre, padre, amiga y mi mejor consejera, siempre estaré en deuda con ella.

A mi tutora Milagro por confiar en mí, por su trabajo incansable, por hacer que en tiempo record este estudio quedara con buena calidad y por enseñarme parte de su sabiduría.

A mi tutor José Manuel Mazón-Suástegui por su ayuda con la investigación y por su buena labor profesional.

A Marlén, la técnico, que además de ayudarnos con el trabajo de laboratorio nos aportó un toque humorístico con su forma de ser.

A todas aquellas personas que colaboraron, como fueron: mi padre, mi abuela Ana, mi prima Mey, mis tías y mi familia en general. A mi novia y a toda su familia por acogerme como un miembro más.

En fin, a todo el personal del Centro de Bioactivos Químicos.

Resumen

Se llevó a cabo la bioencapsulación del actinomiceto probiótico *Streptomyces* sp. (Cepa RL8) en nauplios (estadio II) de *Artemia franciscana*, buscando su potencial aplicación como vehículo para el suministro del probiótico a juveniles de peces y camarones en cultivo. Se aplicaron dos tratamientos con diferente concentración de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) para el enriquecimiento experimental de nauplios y un tratamiento control, c/u con tres réplicas. Después de 24 h, todos los grupos fueron retados con la cepa patogénica CAIM-170 de *Vibrio parahaemolyticus* a dos diferentes concentraciones (10^5 y 10^7 UFC mL^{-1}) y se registró la supervivencia a las 24 y 48 h posteriores. La supervivencia de los nauplios fue significativamente superior (88.75% y 86.25%) en los grupos enriquecidos con 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1} de RL8, con respecto al grupo control no enriquecido (57.5%). Estos resultados confirman las propiedades probióticas de la cepa RL8; demuestran que incrementa la resistencia de los nauplios enriquecidos de *A. franciscana* ante la cepa CAIM-170 del patógeno *V. parahaemolyticus* y adicionalmente sugieren que ese microcrustáceo tiene potencial como vehículo bioencapsulante para el suministro del probiótico RL8 a larvas de peces y camarones en cultivo.

Palabras claves: probiótico**,** enriquecimiento**,** supervivencia**,** microcrustáceo**.**

Abstract

It was carried out the bioencapsulation of the actinomycete *Steptomyces* sp. (Strain RL8) in nauplii (stage II) of *Artemia franciscana*, seeking its potential application as a vehicle for the supply of probiotic to juveniles of fish and shirimp in culture. Two treatments with different concentrations of RL8 (10^6 and 10^8 CFU mL^{-1}) were applied for the experimental enrichment of nauplii and a control treatment, each with three replications. After 24 h, all groups were challenged whit the pathogenic strain CAIM-170 of *Vibrio parahaemolyticus* at two different concentrations (10^5 and 10^7 UFC mL^{-1}) and survival was recorded at 24 and 48 h later. The survival of the nauplii was significantly higher (88.75% y 86.25%) in the groups enriched whit 10^6 and 10^8 CFU mL^{-1} of RL8 whit respect to the non-enriched control group (57.5%). These results confirm the probiotics properties of the RL8 strain; show that it increases the resistance of enriched *A. franciscana* nauplii in front of strain CAIM-170 of the pathogen *V. parahaemolyticus* and further suggests that this microcrustacean has potential as a bioencapsulating vehicle for the supply of probiotic RL8 to fish and shrimp larvae in aquaculture.

Key words: probiotic, enrichment, survival, microcrustacean.

Índice Pág

1. Introducción 1

2. Revisión bibliográfica 4

2.1 *Artemia* spp. Descripción general 4

2.2 Sistemática y taxonomía del género *Artemia* 6

2.3 Importancia de *Artemia* en la producción acuícola 6

2.4 Enfermedades bacterianas en la acuicultura 8

2.5 Uso de probióticos en la acuicultura 9

2.6 Mecanismos de acción de los probióticos 9

2.6.1 Producción de compuestos inhibitorios 10

2.6.2 Competencia por sitios de adhesión o exclusión competitiva 10

2.6.3 Competencia por nutrientes 11

2.6.4 Modulación del sistema inmunológico 11

2.6.5 Mejoras en la calidad del agua 11

2.7 Modos de administración de los probióticos 12

2.7.1 Bioencapsulación (Artemia) 12

2.7.2 Adición al agua de cultivo o inmersión 13

2.8 Principales microorganismos probióticos utilizados en la acuicultura 13

2.8.1 Bacterias Gram positivas 13

2.8.2 Bacterias Gram negativas 14

2.8.3 Levaduras 15

2.9 Actinomicetos. Características generales 15

2.10 Metabolitos producidos por actinomicetos marinos 16

3. Materiales y Métodos 18

3.1 Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. RL8 18

3.2 Obtención y eclosión de quistes de Artemia franciscana 19

3.3 Cepas probiótica y patógena utilizadas en el estudio 19

3.4 Diseño experimental de la investigación 20

3.4.1 Bioensayo de bioencapsulación de RL8 en *Artemia franciscana* 20

3.4.2 Evaluación microbiológica de la cepa RL8 20

3.4.3 Reto de *Artemia franciscana* con *Vibrio parahaemolyticus* 21

3.4.4 Análisis estadístico 21

4. Resultados y discusión 22

5. Conclusiones 32

6. Recomendaciones 33

7. Referencias bibliográficas 34

Introducción

1. Introducción

El producto conocido genéricamente como “Artemia” es un microcrustáceo ampliamente utilizado a nivel mundial como alimento natural, vivo o procesado, en el cultivo de camarones y peces. Se utiliza biomasa fresca o congelada, pero también organismos vivos, incluyendo nauplios y otros estadios iniciales de su desarrollo, al igual que juveniles y adultos. Debido a su reducido tamaño, los nauplios son adecuados para la alimentación de larvas de peces y camarones, además de que tienen un alto valor nutritivo y son fácilmente digeribles. Algunas especies como Artemia *salina y A. franciscana* tienen como característica que son organismos filtradores no selectivos, que consumen prácticamente cualquier material particulado que entra en su boca (Mohebbi *et al.,* 2015). Este hecho permite que el microcrustáceo pueda ser alimentado o bien cubierto con una gran variedad de compuestos de enriquecimiento, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de calamar, vitaminas, levaduras u otros productos comerciales, incluidos los probióticos y los prebióticos, antes de utilizarlo como alimento (Akbar *et al*., 2014).

Diversos estudios han demostrado que el enriquecimiento de la *Artemia* con varios compuestos evaluados y seleccionados *a priori*, podrían mejorar significativamente su composición y valor nutricional, de modo que cuando se utilice como alimento natural vivo o congelado para camarones y larvas de peces, pueda soportar un buen crecimiento y una tasa elevada de supervivencia de la especie cultivada que reciba esta dieta enriquecida (Widiastuti *et al.,* 2012; Herawati *et al.,* 2014).

La aplicación de un probiótico en camarón mediante el enriquecimiento de *Artemia* como su fuente de alimento, es una alternativa que se puede utilizar para producir postrlarvas de camarón de alta calidad con una alta supervivencia, tasa de crecimiento y resistencia contra varias enfermedades, debido que el probiótico “bioencapsulado” en la artemia puede incrementar la resistencia específica del camarón a diversos patógenos. Si esto se hace durante la producción de postlarvas en laboratorio, o durante su preengorde o maternización, es altamente probable que cuando esas postlarvas o juveniles se siembren para su cultivo (engorde) en estanques de producción comercial,

tengan un buen desempeño con respecto a indicadores zootécnicos como crecimiento, supervivencia y un sistema inmune fortalecido que incrementa su resistencia al ataque de los patógenos (Nimrat *et al.,* 2012; Zokaeifar *et al.,* 2012; Widanarni *et al.,* 2015).

Los actinomicetos son microorganismos Gram positivos, recientemente reconocidos por su potencial probiótico (Das *et al.,* 2008; García-Bernal *et al.*, 2015, 2017a, b). Entre las características distintivas que los hacen ideales para este fin, destaca su condición de saprófitos, ya que contribuyen al reciclaje de biopolímeros complejos, a la mineralización y al reciclaje de nutrientes en la acuicultura. Adicionalmente, los actinomicetos no son patógenos para animales, plantas o peces; producen una gran variedad de exoenzimas que pueden mejorar la digestibilidad y el aprovechamiento de los alimentos en peces, camarones y moluscos, además de metabolitos secundarios, ya que incluso son productores por excelencia de antibióticos y pueden inhibir el crecimiento de patógenos en la acuicultura (Das *et al.,* 2010; Augustine *et al.,* 2016; García-Bernal, 2016).

Por todo lo antes expuesto, se plantea el siguiente ***problema científico*** a resolver durante la presente investigación:

¿Es posible utilizar la cepa de *Streptomyces* sp. RL8, aislada de sedimentos marinos de Cuba como agente probiótico bioencapsulado en un estadio inicial del desarrollo de *Artemia franciscana* para incrementar el valor nutricional del microcrustáceo?

En función de lo anterior, ***la hipótesis*** en que se sustenta la presente investigación es la siguiente:

La cepa de *Streptomyces* sp RL8., aislada de sedimentos marinos de Cuba, una vez bioencapsulada en nauplios II de *Artemia franciscana*, se mantiene viva en su tracto intestinal y conserva sus propiedades probióticas, por lo que esta podría utilizarse como alimento vivo en el cultivo de larvas de peces y camarones.

Para aceptar o refutar esta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Evaluar al microcrustáceo *Artemia franciscana* como agente bioencapsulador de la cepa probiótica de *Streptomyces sp*. RL8.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad *in vitro* de la cepa RL8 frente a cepas patógenas de *Vibrio* spp., y seleccionar aquella frente a la cual, tiene un mejor desempeño.
2. Estudiar el enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana* con diferentes concentraciones de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) como procedimiento para bioencapsular la cepa probiótica en el microcrustáceo.
3. Evaluar la eficiencia de la bioencapsulación de RL8 en nauplios de *Artemia franciscana*, mediante reto ante el Vibrio patógeno previamente seleccionado.

Revisión bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica

2.1 *Artemia* spp. Descripción general

La *Artemia* es un pequeño crustáceo filtrador, propio de hábitats acuáticos de elevada salinidad, que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo. La salinidad es el factor principal que determina la distribución natural de las poblaciones de *Artemia;* que pueden desarrollarse adecuadamente en lugares hipersalinos y escapar así de sus depredadores porque éstos no pueden sobrevivir en esas condiciones (Castro *et al.,* 2006). Estos animales poseen el sistema osmorregulatorio más eficiente conocido en todo el reino animal; son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos respiratorios (hemoglobina) y hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existe en los ambientes hipersalinos; y adicionalmente tienen la capacidad de producir quistes en que se mantienen viables en fase de latencia cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie (Salgado, 2001).

En la actualidad, *Artemia* sp. es el microcrustáceo más empleado como alimento vivo para larvas de muchos peces y crustáceos marinos en cultivo, desde nauplio hasta la etapa adulta (Persoone *et al.,* 1980); es un filtrador no selectivo y se alimenta tanto de materia orgánica particulada (detritos biológicos procedentes de aguas de manglar) como de organismos vivos de tamaño pequeño como microalgas y bacterias (Salgado, 2001).

El primer estado larvario tiene una longitud que oscila entre 400 y 500 µm de longitud, tras aproximadamente 24 horas, el animal muda al segundo estado larvario. La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de quince procesos secuenciales de muda (Figura 1). Posteriormente, van apareciendo de manera secuencial algunos apéndices lobulares pares en la región torácica que se diferenciarán posteriormente en toracópodos, se desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Desde el estadio X en adelante, se producen importantes cambios morfológicos y funcionales. Las antenas pierden

su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual; los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales. Cuando los toracópodos están ya completamente formados presentan tres partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con acciones locomotoras y filtradoras y los exopoditos que actúan como branquias. Los adultos de Artemia miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas (Salgado, 2001). El rápido desarrollo y la capacidad de sus huevos o quistes, para soportar largos periodos en condiciones desfavorables, hacen de la artemia un modelo invaluable en investigaciones biológicas.

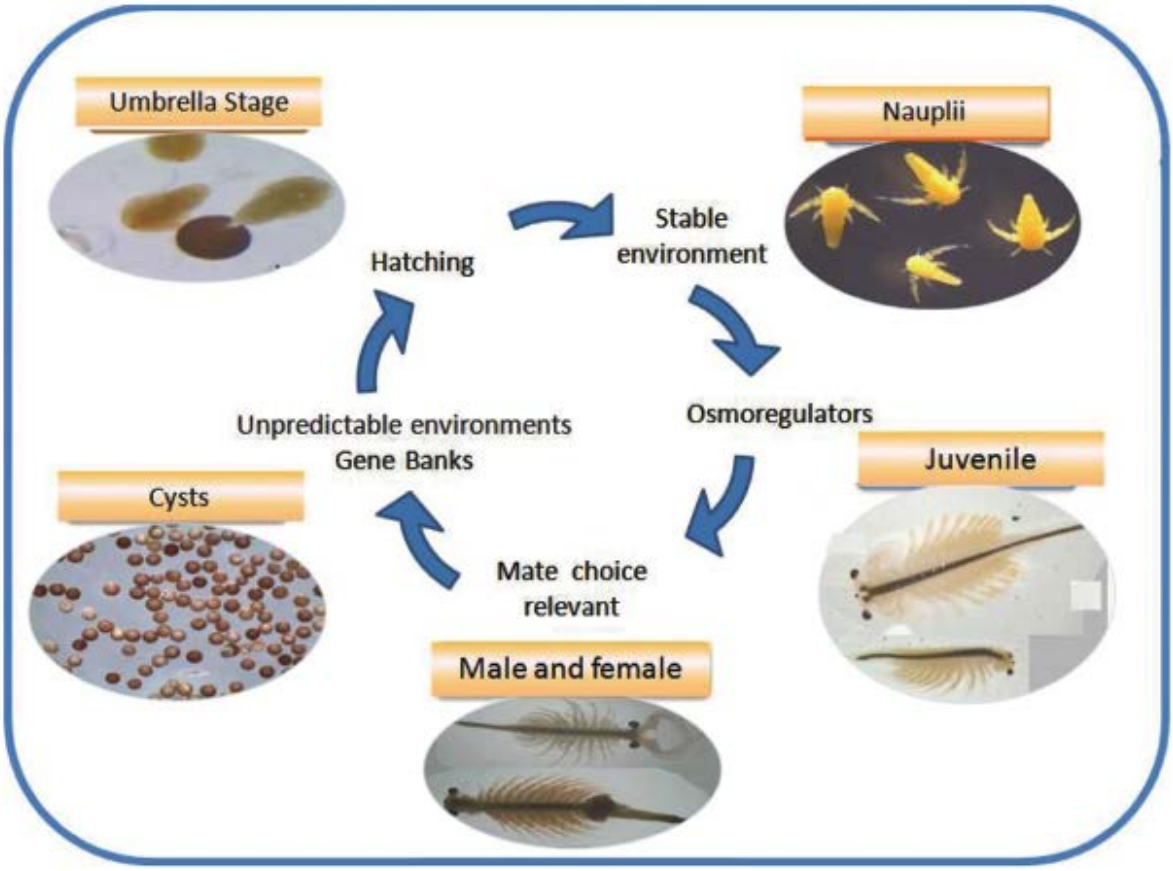


Figura 1. Ciclo de vida de *Artemia* (Gajardo y Beardmore, 2012).

2.2 Sistemática y taxonomía del género *Artemia*

La descripción taxonómica del género *Artemia* es la siguiente (Asem *et al*., 2010):

Phylum: Artrópoda

Clase: Crustácea

Subclase: Braquiópoda

Orden: Anostraca

Familia: Artemidae

Género: Artemia Leach, 1819.

Especies:

- *Artemia salina*: Área del Mediterráneo
- *Artemia tunisiana*: Europa
- *Artemia franciscana*: América (Norte, Centro y Sur)
- *Artemia persimilis*: Argentina
- *Artemia urmiana*: Irán
- *Artemia monica*: Mono Lake, California-US

2.3 Importancia de *Artemia* sp. en la producción acuícola

Los nauplios de *Artemia* se utilizan ampliamente en todo el mundo como alimento vivo para las etapas larvarias de especies de agua dulce y marinas comercialmente importantes, debido a su disponibilidad en el mercado, relativo bajo costo, facilidad de cultivo y composición bioquímica que los convierte en una dieta viva de excelente calidad nutricional (Sorgeloos *et al.,* 1998 y Smith *et al.,* 2004). Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar alimentos artificiales larvarios o poslarvarios, pero los organismos vivos como los nauplios de artemia son preferidos en los criaderos acuícolas. Estos microcrustáceos no son selectivos en su alimentación, por lo que se pueden enriquecer con suplementos alimenticios diversos, que pemiten mejorar su valor nutricional, e inclusive como vía de

administración de medicamentos *ad-hoc*, para proporcionar sus beneficios de salud a los animales a los que se los alimenta (Rodríguez *et al.,* 2011).

La producción tecnificada de larvas de peces y camarones ha sido mejorada progresivamente a través del desarrollo de nuevos sistemas de crianza basados en un mayor conocimiento de los requerimientos nutricionales y de manejo de las especies objetivo. Sin embargo, las producciones estables están lejos de mantenerse en su nivel óptimo, ya que están limitadas por el brote de infecciones y enfermedades asociadas a diversos microorganismos patogénicos de elevada virulencia, como algunas cepas bacterianas y virales que son altamente perjudiciales, principalmente durante las primeras etapas de la vida de peces, camarones y moluscos marinos (Roiha *et al*., 2011 y García-Bernal, 2016). Las infecciones bacterianas pueden causar hasta el 100% de mortalidad, lo que en las unidades de producción acuícola puede resultar en grandes pérdidas económicas. Una forma fácil y directa de enfrentar las enfermedades bacterianas es proporcionar los agentes quimioterapéuticos adecuados a las larvas de camarones y peces a través de la cadena alimentaria mediante la incorporación de un agente o principio activo adecuado en un organismo portador, lo cual se reconoce como un procedimiento de bioencapsulación (Touraki *et al.,* 1996). Este concepto biotecnológico se define como el proceso mediante el cual, los organismos vivos utilizados como alimento se enriquecen con nutrientes específicos o con moléculas de fármacos y una vez enriquecidos se proporcionan como alimento vivo a los organismos objetivo (Aruvalsu *et al.,* 2012). Algunos de los fármacos que se han administrado con éxito usando esta técnica son la oxitetraciclina (Langdon*,* 2003), el ácido oxolínico (Touraki y Niopas, 2012) el florfenicol (Roiha *et al.,* 2011) y el metronidazol (Rodríguez *et al.,* 2011).

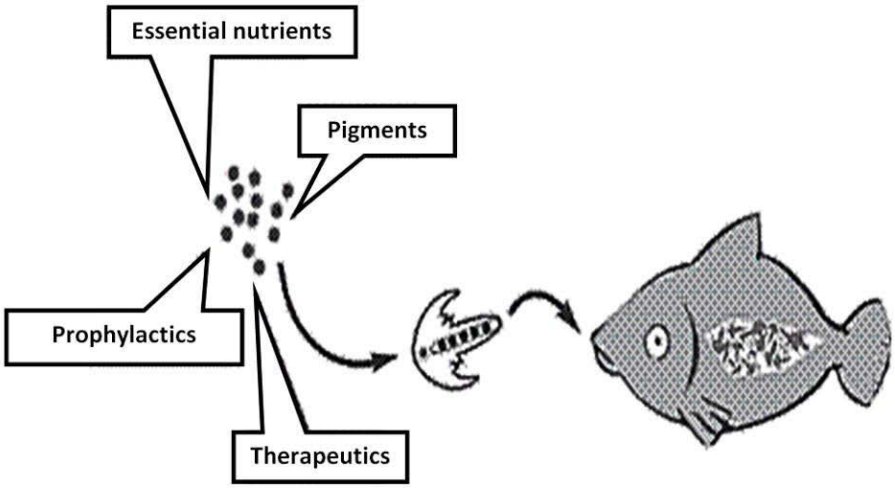


Figura 2. Suministro de nutrientes esenciales, metabolitos, pigmentos, etc. a larvas de peces utilizando nauplios de *Artemia* a través de la técnica de bioencapsulación. (http://images.engormix.com/e_articles/European_finfish05.gif).

2.4 Enfermedades bacterianas en la acuicultura

Las infecciones son un problema muy común en la acuicultura marina y la mayoría son causadas por bacterias y virus. Entre las bacterias Gram negativas asociadas a enfermedades y epizootias acuícolas se destacan las pertenecientes a los géneros *Vibrio, Aeromonas, Pseudomonas, Tenacibaculum* y *Photobacterium.* Dentro de las Gram positivas, el género *Streptococcus* es el de mayor interés y entre los virus, el que mayor daño produce es el asociado al síndrome de la mancha blanca o WSSV, por sus siglas en inglés (Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1998). La mayoría de estos agentes patógenos se encuentran en el medio marino y únicamente ocasionan daño, cuando por ciertas circunstancias se reproducen en exceso y pueden además sobrepasar las barreras defensivas de los organismos sometidos a condiciones primarias de estrés, inmuno-depresión, deficiencias nutricionales, heridas y/o un grave deterioro o contaminación del medio acuático circundante (Romalde *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015).

Las vibriosis son infecciones producidas por diferentes especies del género *Vibrio,* que afectan a peces, moluscos y crustáceos del medio marino, dulce o salobre y se caracterizan por un cuadro de curso agudo, con una sintomatología típica de septicemia hemorrágica. Aunque los vibrios forman parte de la biota normal del

camarón, son patógenos oportunistas y pueden ser aislados de hemolinfa o tejido muscular en larvas, postlarvas y juveniles, cuando se encuentran en grandes cantidades en el individuo (Romalde *et al.,* 2013 y Wang *et al.,* 2015).

2.5 Uso de probióticos en la acuicultura

La definición de los probióticos ha evolucionado en el tiempo, pero de manera generalizada, se acepta que son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio al hospedero (FAO/WHO, 2001). El uso de probióticos o bacterias benéficas es visto de forma interesante como una alternativa al tratamiento con antibióticos, porque ayudan a controlar a los patógenos. El uso de agentes probióticos en la nutrición de humanos y animales está bien estudiado (Fuller, 1989) y su aplicación en la acuicultura ha sido investigada por muchos autores porque representa una alternativa más ecológica y natural para la prevención y control de diversas enfermedades, logrando efectos beneficiosos en materia de salud y bioseguridad para una acuicultura sostenible (Cruz *et al.,* 2012; Lakshmi *et al.,* 2013 y Newaj-Fyzul *et al.,* 2014).

2.6 Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos generalmente modulan el crecimiento de la microbiota intestinal, suprimiendo mediante mecanismos de competencia por espacio y nutrientes, o por antibiosis y exclusión, a las bacterias potencialmente perjudiciales y reforzando los mecanismos de defensa naturales del hospedero (Giraffa *et al.,* 2010), mejorando así su resistencia contra las enfermedades infecciosas (Gildberg *et al.,* 1997). Los mecanismos de acción de las bacterias utilizadas como probióticos se enumeran a continuación (Figura 3):

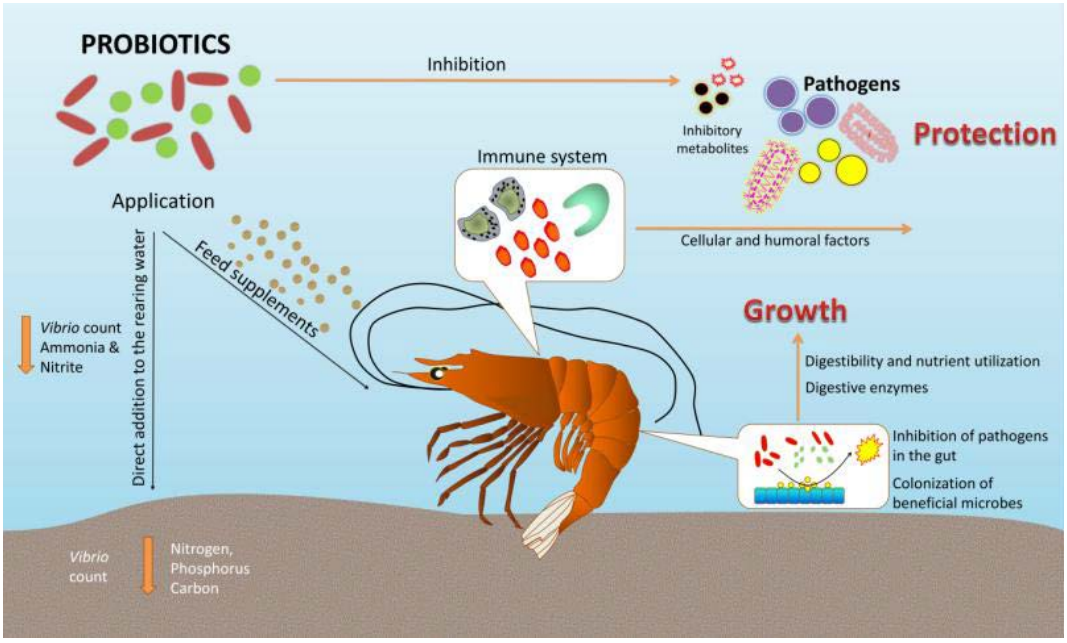


Figura 3. Mecanismo de acción desplegado por las bacterias probióticas (Lazado *et al.,* 2015).

2.6.1 Producción de compuestos inhibitorios

Los probióticos compiten con los patógenos o los desplazan mediante la producción de ciertos compuestos inhibitorios que actúan antagónicamente contra ellos y por lo tanto, evitan su proliferación en el hospedero (Tinh *et al.,* 2007). La actividad de un probiótico contra diversos agentes patógenos puede ser debida a la producción de antibióticos (Williams y Vickers, 1986), bacteriocinas (Panigrahi y Azad, 2007; Tinh *et al.,* 2007;), y sustancias activas como sideróforos, lisozimas, proteasas y peróxido de hidrógeno.

2.6.2 Competencia por sitios de adhesión o exclusión competitiva

La competencia por sitios de adhesión sobre el mucus del tracto gastrointestinal y otras superficies de tejidos, es uno de los mecanismos que tienen los probióticos para prevenir su colonización por patógenos. La adhesión bacteriana a la superficie de un tejido determinado, es una etapa importante para la infección patógena, y por lo tanto, para que un probiótico ejerza su acción benéfica, debe competir con los patógenos por los sitios de adhesión, ejerciendo así un efecto de exclusión competitiva (Verschuere *et al.,* 2000).

2.6.3 Competencia por nutrientes

Una vez suministrados, los probióticos más competentes se establecen de manera temporal o permanente en el tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero y constituyen según el caso, parte de su microbiota temporal o residente. La adhesión duradera o permanente de una cepa probiótica a la mucosa y células epiteliales del TGI y a otros tejidos, permite para mantener e incrementar sus efectos positivos en la salud, nutrición y bienestar del hospedero (Gatesoupe, 1999 y Farzanfar, 2006).

2.6.4 Modulación del sistema inmunológico

Las bacterias probióticas tienen una acción estimulante sobre el sistema inmunitario del hospedero, ya que actúan sobre las células implicadas tanto en la inmunidad natural o innata de los invertebrados como *A. franciscana*, como en la inmunidad adquirida y específica de los organismos superiores (vertebrados). La presencia en el organismo de microorganismos extraños desencadena diversas reacciones secuenciales de defensa y respuestas específicas como la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos, estimulando la respuesta defensiva ante virus, bacterias y parásitos que pudiesen provocar enfermedades al hospedero. Muchos probióticos han sido identificados por los mecanismos que activan con su acción inmunomoduladora, al mejorar la actividad fagocítica, el estallido respiratorio y la actividad superóxido dismutasa y peroxidasa, además de incrementar el número de leucocitos, linfocitos y eritrocitos en vertebrados. (Newaj-Fyzul *et al.,* 2014).

2.6.5 Mejoras en la calidad del agua

Las bacterias Gram positivas como *Bacillus* spp., estimulan el sistema inmune del hospedero y también actúan mejorando la calidad del agua mediante la conversión de materia orgánica en dióxido de carbono, mientras que las bacterias Gram negativas convierten una mayor proporción de materia orgánica en biomasa bacteriana o en limo (Nemutanzhela *et al.,* 2014).

2.7 Modos de administración de los probióticos

El modo más común para la administración de probióticos en acuicultura es mediante su incorporación a los piensos. Aunque existen otras formas de administración tales como su adición directa al agua de cultivo, el baño o inmersión del hospedero en un medio líquido que contenga a la cepa probiótica, la bioencapsulación en el alimento vivo (artemias y rotíferos), es uno de los métodos más utilizados en larvicultura, debido a que ofrece diversas ventajas y se emplea un menor volumen de agua de cultivo (Vine *et al*., 2006).

2.7.1 Bioencapsulación (*Artemia*)

Los sistemas intensivos empleados en la acuicultura marina para producir grandes cantidades de larvas de peces y crustáceos (larvicultura) son afectados frecuentemente por bacterias patógenas, dando lugar a altas tasas de mortalidad y originando grandes pérdidas económicas (Marques *et al*., 2006a). Las artemias (*A. franciscana* y *A. salina*) son consideradas como las principales presas vivas empleadas para el cultivo de larvas de muchas especies acuáticas (Lavens y Sorgeloos, 2000; Dhert *et al*., 2001). Sin embargo, varios autores han observado que estos organismos pueden transferir bacterias patógenas a las larvas, originando altos porcentajes de mortalidad durante esta etapa, de manera que es conveniente y recomendado su tratamiento previo (Vaseeharan y Ramasamy, 2003). A este respecto, *Artemia* spp. se puede incluso cultivar en condiciones gnotobióticas (axénicas) y utilizar como vector de probióticos en la especie diana (Marques *et al*., 2006a). Varias cepas de la especie *Aeromonas hydrophila* y diversas especies de los géneros *Vibrio*, *Moraxella*, *Kurthia*, *Cytophaga*, *Microbacterium* y *Exiguobacterium*, junto a levaduras, se han propuesto como probióticos con base en los resultados obtenidos en supervivencia y crecimiento de *A. franciscana* en presencia y ausencia de vibrios ictiopatógenos como *V. campbellii*, V. *proteolyticus* y V. *parahaemolyticus*, empleando cultivos gnotobióticos de artemia (Orozco-Medina *et al*., 2002; Marques *et al*., 2006b).

El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. con microalgas marinas, micropartículas y emulsiones ha sido empleado para mejorar su valor nutricional y aportar un mayor nivel de nutrientes a las larvas cultivadas (Dhert *et al*., 2001). El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. por medio de la bioencapsulación consiste en suministrarles como alimento una suspensión o emulsión de enriquecimiento, de manera que las células del probiótico se incorporen al TGI de la artemia (Dhert *et al*., 2001). De esta forma es como los microorganismos probióticos se pueden bioencapsular en artemias para su posterior administración como alimento vivo a las larvas de peces y crustáceos (Marques *et al*., 2006c).

2.7.2 Adición al agua de cultivo e inmersión

Los probióticos en acuicultura también se pueden adicionar directamente al agua de cultivo o sumergir a los organismos a tratar, en baños de suspensiones bacterianas durante un tiempo determinado (Verschuere *et al*., 2000). A este respecto, varios estudios han demostrado la eficacia de estas formas de administración para la aplicación de varios probióticos (Fjellheim *et al*., 2010 y García-Bernal *et al*., 2017a,b).

2.8 Principales microorganismos probióticos utilizados en acuicultura

Muchos microorganismos marinos, entre los que se incluyen bacterias, hongos y bacteriófagos (Park *et al.,* 2000) y levaduras (Tovar-Ramírez *et al*., 2017), son considerados como fuentes promisorias de sustancias bioactivas, de donde pueden derivarse sus propiedades probióticas. A continuación se describen los grupos más importantes y sus propiedades específicas.

2.8.1 Bacterias Gram positivas

De acuerdo a Villamil y Martínez-Silva (2009), la mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para ser utilizados en la acuicultura son bacterias ácido lácticas (BAL), de las cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Kongnum y Hongpattarakere (2012) aislaron *Lactobacillus plantarum*

del tracto digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei* y evaluaron su crecimiento y supervivencia posterior a una infección con *Vibrio harveyi*, concluyendo que *L. plantarum* mejoró la supervivencia de los camarones. Por su parte, Vieira *et al.,* (2007) demostraron que con la adición de dos cepas de bacterias ácido lácticas en un cultivo del camarón *L. vannamei* se mejoró la supervivencia luego de haber infectado experimentalmente a los camarones con *Vibrio harveyi*.

Diversas bacterias Gram positivas aerobias formadoras de esporas como *Bacillus* spp., han sido evaluadas para determinar su potencial probiótico y se ha determinado que tienen la capacidad para mejorar la calidad del agua, al influir en la composición general de las poblaciones microbianas y reducir el número de patógenos en el entorno de las especies cultivadas (Cha *et al.,* 2013). Zokaeifar *et al.,* (2014) evaluaron dos cepas de *Bacillus subtilis* en el agua de cultivo del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* comprobando que proporcionan efectos beneficiosos al mejorar la calidad del agua de cultivo, e incrementar la resistencia del camarón a las enfermedades, con mayores rendimientos en crecimiento, actividad de las enzimas digestivas y respuesta inmune del hospedero.

2.8.2 Bacterias Gram negativas

Entre las principales bacterias Gram negativas que han sido evaluadas y propuestas como probióticos para uso en la acuicultura, se incluyen especies de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Roseobacter* y *Vibrio* (Nayak, 2010 y Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). De acuerdo con (Chythanya *et al.,* 2002) la cepa *Pseudomonas* I-2 produce compuestos inhibitorios contra vibrios patógenos de camarones como *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*. La suplementación de la dieta con *Pseudomonas aeruginosa* mejoró la inmunidad innata y la resistencia a enfermedades provocadas por *Aeromonas hydrophila* en el pez ciprínido *Labeo rohita* (Giri *et al.,* 2012).

2.8.3 Levaduras

La principal especie de levadura propuesta para su uso como probiótico en la acuicultura es *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en los últimos años está teniendo un gran interés el estudio de la especie *Debaromyces hansenii,* para su empleo en peces (Tovar-Ramírez *et al*., 2017).

Los principales efectos beneficiosos que se reportan con el uso de *S. cerevisiae* son una mejora en el crecimiento y la supervivencia, al igual que la estimulación del sistema inmune de los peces. La levadura *S. cerevisiae* posee efectos benéficos al aumentar el crecimiento, mejorar la utilización del alimento e incrementar la resistencia del pez payaso, *Amphiprion percula,* a enfermedades causadas por *Streptococcus* sp. (Gunasundari *et al.,* 2013).

2.9 Actinomicetos. Características generales

Los actinomicetos son microorganismos abundantes en el suelo, sin embargo se encuentran también en ambientes acuáticos, tanto dulces como marinos (Leiva *et al.,* 2004). Se caracterizan por presentar una actividad metabólica alta, y producir terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares que les confieren una gran capacidad para degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal. Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los *Actinomycetales* comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 al 60% de la población microbiana total del suelo (Ezziyyani *et al.,* 2004).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a las siguientes razones: (1) su pared celular está compuesta por péptidoglicanos, (2) el diámetro de sus hifas (0,5 a 2,0 µm) es inferior al de los hongos, (3) son sensibles a los antimicrobianos, pero (4) presentan resistencia a los antifúngicos y (5) la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia *et al.,* 2005). Se caracterizan por presentar un alto contenido de

guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 a 78% G+C. Estas bacterias son generalmente aerobias pero algunas son anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples o complejas, y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos (Leveau y Bouix, 2000).

2.10 Metabolitos producidos por actinomicetos marinos

Los productos naturales constituyen la fuente más propicia de obtención de antibióticos (Bull y Stach, 2007; Reen *et al.,* 2015). Hay aproximadamente 32 500 productos naturales obtenidos a partir de fuentes microbianas, incluyendo alrededor de 1 000 metabolitos derivados de microorganismos marinos (Singh y Pelaez, 2008; Romano *et al.,* 2016).

Los actinomicetos marinos son productores de varios antibióticos (Baltz, 2008) y se ha determinado que éstos son más efectivos en el tratamiento de las infecciones microbianas porque las bacterias terrestres no han desarrollado resistencia contra ellos (Donia y Hamman, 2003). Debido a la necesidad de buscar nuevos agentes antibacterianos, las actinobacterias constituyen una fuente por demás importante para la obtención de compuestos antimicrobianos con estructuras novedosas. Entre las actinobacterias, las especies del género *Streptomyces* producen alrededor de 7 600 compuestos bioactivos, aproximadamente el 80% del total de antibióticos disponibles actualmente en el mercado (Valli *et al.,* 2012). Hasta la fecha existen pocos estudios sobre la aplicación de actinomicetos como probióticos en la acuicultura (Das *et al.,* 2006; Kumar *et al.,* 2006; Lakshmi y Rosamma, 2008). La mayoría de los probióticos propuestos como agentes de control biológico en la acuicultura son bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, etc.), *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Verschuere *et al.,* 2000). Dhevendaran y Annie, (1999) realizaron un trabajo para evaluar especies marinas del género *Streptomyces* y demostraron que pueden producir antibióticos *in vitro*, que inhiben el crecimiento de *Vibrio* spp. en peces y crustáceos. You *et al.,* (2007)

recomendaron el uso de actinomicetos para prevenir las infecciones causadas por *Vibrio* spp.

Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

La cepa RL8 de *Streptomyces* sp. fue seleccionada a partir de estudios previos *in vitro* e *in vivo* (García-Bernal *et al.,* 2015, 2017a,b).

3.1 Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. RL8

Se determinó la actividad antagónica de la cepa RL8 frente a cuatro especies de *Vibrio*: *V. alginolyticus* CAIM 7, *V. parahaemolyticus* CAIM 170, *V. harveyi* CAIM 1792, *V. campbellii* CAIM 395 aplicando el método de difusión en agar (González *et al.,* 2005). Las cepas CAIM fueron obtenidas de la colección de Microorganismos de Importancia Acuática (C.A.I.M., siglas en inglés) pertenecientes al Centro de Investigación para la Nutrición y Desarrollo, Unidad Mazatlán para Acuicultura y Manejo Ambiental de México. Los microorganismos fueron cultivados en TSB (Caldo Tripticasa Soya) con 3% (p/v) de NaCl e incubadas a 30 ºC por 24 horas. El cultivo se centrifugó a 5 000 x *g* durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución de NaCl al 3% (p/v). Se determinó la densidad óptica a 600 nm, la cual se ajustó a 1,0 para obtener una concentración de $1x10^9$ UFC mL^{-1}. A partir de la muestra con densidad de 1,0 se hicieron las diluciones requeridas para las pruebas de antagonismo. *Streptomyces* sp. RL8 se sembró en placas de (Agar Caseína Almidón) ACA y se incubó a 30 °C durante siete días. Las cepas de *Vibrio* spp*.* se sembraron en toda la superficie de las placas Petri con TSA (Agar Tripticasa Soya), suplementadas con cloruro de sodio al 3% (p/v), estableciendo una carga microbiana de $1x10^8$ UFC mL^{-1}. Seguidamente, se extrajeron muestras circulares en forma de disco (*plugs*) de 6 mm de las placas con actinomiceto y se colocaron en la superficie de las placas sembradas con vibrios, utilizando como control, *plugs* sin actinomicetos. La actividad antimicrobiana se evaluó y se expresó tomando como referencia el diámetro del halo de inhibición (mm), alrededor de cada *plug*, el cual se midió a las 48 horas de incubación a 35 ºC.

3.2 Obtención y eclosión de los quistes de *Artemia franciscana*

Se utilizaron quistes de *Artemia franciscana* libres de bacterias (Gran Lago Salado, INVE Aquaculture Artemia Systems, Baasrode, Bélgica). Para obtener quistes estériles y posteriormente nauplios estériles, los quistes de *Artemia* se hidrataron y decapsularon siguiendo la metodología descrita por Baruah *et al.,* 2010. En primer lugar, se hidrataron 60 mg de quistes de eclosión de alta calidad de *Artemia* en 9 mL de agua destilada durante 1 h con aireación. Posteriormente se adicionó 330 µL de NaOH (30%, v/v) y 5 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl; 14%, v/v) a la suspensión de quistes hidratados, durante la reacción, se proporcionó aireación filtrada de 0,22 µm. La des-encapsulación se detuvo después de 2 minutos añadiendo 5 mL de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$, 10 g L^{-1}), y los quistes des-encapsulados se lavaron con agua de mar artificial estéril (AMA) (según MacLeod, 1968: NaCl 400 mM, KCl 20 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 100 mM, y $CaCl_2.2H_2O$ 20 mM, previamente disueltos en este orden y mezclados, se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1 M). Finalmente, los quistes se re-suspendieron en un tubo falcon de 50 mL que contenía 30 mL de AMA y se incubaron a 28 °C durante 28 h con aireación e iluminación constante (2000 lux aproximadamente) para permitir que los nauplios emergidos alcanzaran la etapa II en la que ya pueden ingerir alimento.

3.3 Cepas probiótica y patógena utilizadas en el estudio

La cepa RL8 se cultivó en Caldo Triptona Soya (TSB) con 3% (p/v) de NaCl, y se incubó con agitación a 30 °C durante siete días. Después del tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 4 696 x *g* a 4 °C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con agua de mar estéril. Luego se re-suspendió en agua de mar estéril y se midió la densidad óptica equivalente a 600 nm (Gopalakrishnan *et al.,* 2013). La concentración utilizada en los ensayos fue de 1 x 10^6 y 1 x 10^8 UFC mL^{-1}; las mismas fueron seleccionadas según estudios realizados con este microorganismo por en ostiones y camarones (García-Bernal *et al*., 2017a,b). Se utilizó la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170, que fue cultivada en TSB a 35 °C por 24-48 horas. El cultivo se centrifugó a 4 696 x *g* a

4 °C durante 10 minutos; el *pellet* fue re-suspendido en solución salina al 3% (p/v) y la densidad bacteriana se ajustó a 1,0 para obtener una densidad final de 1 x 10^9 UFC mL^{-1}

3.4 Diseño experimental de la investigación

3.4.1 Bioensayo de bioencapsulación de RL8 en *Artemia franciscana*

Para el bioensayo se utilizaron nauplios de *A. franciscana* en estado larvario II a razón de 30 nauplios en tubos de 50 mL, con un volumen operativo de 30 mL de AME con aireación filtrada constante. Se estableció un diseño experimental con tres tratamientos y tres réplicas cada uno: Tratamiento T1, RL8 (*Streptomyces* sp. RL8, con una concentración de 1 x 10^6 UFC mL^{-1}); Tratamiento T2, RL8 (*Streptomyces* sp. RL8, con una concentración de 1 x 10^8 UFC mL^{-1}); Tratamiento T3, grupo Control (sin bacteria añadida, alimentado con extracto de levadura 0.2 g L^{-1}). El alimento de enriquecimiento se administró en una dosis única. Se cuantificó la supervivencia de los nauplios II, a las 24 h.

3.4.2 Evaluación microbiológica de la cepa RL8

Se realizó el recuento de actinomicetos en los nauplios de *Artemia* a los 30 minutos, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la adición de la cepa RL8. Para ello se tomaron muestras de los nauplios de los grupos tratados (T1, T2) y del grupo control (T3), los cuales fueron enjuagados con solución salina estéril y lavados con cloruro de benzalconio al 1% (Gatesoupe, 1999) y luego se enjuagaron nuevamente con solución salina estéril para asegurar que se eliminaran todas las actinobacterias ubicadas en el exterior del nauplio. Lo anterior con el propósito de conservar únicamente el probiótico ingerido y por lo tanto bioencapsulado por los nauplios, asumiendo la presencia temporal o permanente del actinomiceto RL8 en el tracto gastrointestinal (TGI) de los nauplios utilizados como vehículo para la bioencapsulación del probiótico. Las muestras se homogenizaron en 1 mL de solución salina fisiológica, se realizaron diluciones decimales, y finalmente se

extendieron 100 µL sobre placas de ACA y estas se incubaron a 30 °C durante 7 días.

3.4.3 Reto de *Artemia franciscana* con *Vibrio parahaemolyticus*

Después de la bioencapsulación del probiótico (*Streptomyces* sp. RL8) en los nauplios de *A. franciscana* (24 horas), se procedió a realizar el reto frente al patógeno. Para ello se aplicó al agua de cultivo, *V. parahaemolyticus* CAIM-170 a diferentes concentraciones ($1x10^5$ y $1x10^7$ UFC mL^{-1}) de acuerdo con Austin *et al.,* (1995). El reto de los nauplios, fue realizado en tubos falcon de 50 mL con 20 mL de AME y una densidad de 5 nauplios mL^{-1}, por triplicado y con aireación filtrada continua. La supervivencia se registró por muestreo de los nauplios a las 24 y a las 48 horas de desafío.

3.4.4 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado. Antes de aplicar el ANOVA se procedió a verificar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y para la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de Levene (Sokal y Rohlf, 1995). La transformación arcoseno √% se realizó para el porcentaje de supervivencia y log x para los resultados del conteo; antes de aplicar ANOVA. Para todos los análisis efectuados, el nivel de significación fue de $P<0,05$. Los análisis estadísticos se

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana de Streptomyces sp. RL8

La cepa RL8 mostró actividad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos del género *Vibrio* que afectan a organismos de interés acuícola comercial (tabla 1, figura 4). La vibriosis es una enfermedad importante que afecta la acuicultura del camarón, y como su nombre lo indica, es causada por diferentes especies de *Vibrio*, en particular *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Austin y Zhang, 2006). Existen algunas referencias sobre el uso de actinobacterias de sedimentos marinos para contrarrestar la acción nociva de patógenos de camarón, particularmente cepas de *Vibrio* spp. (You *et al*., 2005).

En nuestra investigación, la mejor actividad de la cepa RL8 se obtuvo frente a *V. parahaemolyticus* (Cepa CAIM 170 www.ciad.mx), mostrando un halo de inhibición con un diámetro de 14 mm. El género *Streptomyces* ha sido ampliamente reconocido debido a su potencial en la producción de metabolitos secundarios (Lee *et al*., 2014; Ser *et al*., 2015 y Tan *et al*., 2015) incluyendo antibióticos (Lee *et al*., 2014), agentes anticancerígenos, antiparasitarios y enzimas (Manivasang *et al*., 2013). Existe evidencia científica de que la actividad de la cepa RL8 puede estar asociada a la producción de dos nuevos compuestos con capacidad antibiótica, como Lunalipin A y Lunalipin B; dos xantonas hexacíclicas estrechamente relacionadas con lysolipin y xantholipin (García-Bernal, 2016). De acuerdo con esta autora, el compuesto Lunalipin B, mostró una fuerte actividad frente a diferentes especies patógenas de *Vibrio*, las cuales producen enfermedades en peces, moluscos y crustáceos.

Nuestros resultados coinciden con Ngo *et al.*, (2016), quienes demostraron que la cepa de *Streptomyces* sp. A8 aislada de sedimento de un estanque camaronícola, mostró una alta actividad contra la cepa V6 del patógeno *V. parahaemolyticus*. Estos autores demostraron también que esa cepa de actinobacteria (A8) produce compuestos inhibidores y tiene además la capacidad de degradar compuestos

orgánicos mediante la producción de enzimas extracelulares. Por otro lado, en un estudio realizado por Sahu *et al*., (2007), estos autores dieron a conocer que la cepa de actinomiceto marino MKS-24 fue muy activa contra tres cepas altamente patogénicas para el camarón, como *V. alginolytics*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. En otro estudio You *et al.*, (2005) demostraron que el 51.1% de las cepas de actinomicetos aisladas de sedimentos marinos de una granja camaronícola mostraron actividad antagónica contra *Vibrio* spp. Las referencias favorables a los actinomicetos confirman los resultados obtenidos durante el presente estudio, con la cepa RL8 aislada de sedimentos marinos de Cuba. Thirumurugan y Vijayakumar (2013) reportaron que de un total de 82 actinobacterias aisladas de suelo marino, solo el 26% presentaron actividad antibacteriana *in vitro* frente a *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* y *V. cholerae,* mostrando halos de inhibición con un diámetro máximo de 17 mm frente a *V. alginolyticus*.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de la cepa RL8 aislada de sedimentos marinos de Cuba, frente a cepas patogénicas de *Vibrio spp*. (Colección CAIM-CIAD-MX)

Cepa	***V. a.***			***V. p.***			***V. h.***			***V. c.***		
	M	DE	CV	M	DE	CV	M	DE	CV	M	DE	CV
RL8	8,33	0,57	6,9	14	0	0	12,33	0,57	4,6	9,66	0,57	5,9

Leyenda:

- M: media (mm), DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%).
- *V. a*.: *V. alginolyticus* CAIM 7, *V. p*.: *V. parahaemolyticus* CAIM 170, *V. h*.: V*. harveyi* CAIM 1792, *V. c*.: *V. campbellii* CAIM 395.

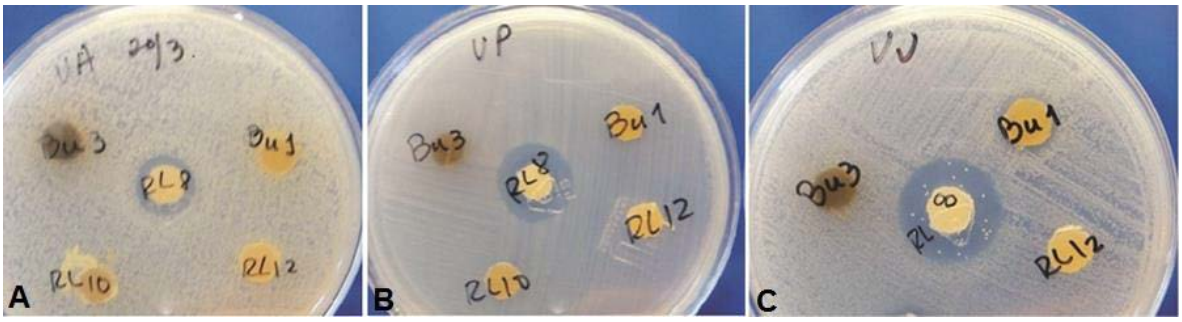


Figura 4. Actividad antagonista de la cepa *Streptomyces* sp. RL8. Halos de inhibición frente a cepas patogénicas de *Vibrio spp*. (Colección CAIM-CIAD-MX).

Bioencapsulación de RL8 en Artemia franciscana

La artemia puede ingerir partículas pequeñas con un tamaño que varía de 1 a 50 µm después de que la boca está abierta. Por lo tanto, es posible que las bacterias se puedan utilizar como fuente de alimentación directa en lugar de levadura, microalgas y productos de desecho de la industria alimentaria (Soltanian, 2007). Sin embargo, es esencial conocer los aspectos relativos a la bioseguridad de cada cepa potencialmente nutricional; o sea, asegurarse de que no sea patógena para el huésped y además, que tenga la capacidad para sobrevivir en su tracto gastro-intestinal (TGI), lo cual implica, por ejemplo, que sea resistente a las sales biliares, a los bajos niveles de pH y a las proteasas presentes en el TGI (Balcázar *et al*., 2006) Uno de los requisitos que debe cumplir una cepa probiótica es que no presente toxicidad para el huésped y para el medio ambiente (Kesarcodi-Watson *et al*., 2008; Tinh *et al*., 2008. García-Bernal *et al.*, (2018) demostraron que altas concentraciones de *Streptomyces* spp. RL8 no produjeron mortalidad en *A. salina* ni en postlarvas de *L. vannamei*, y concluyeron que este microorganismo es seguro para su aplicación como probiótico en camarones peneidos.

En el presente estudio, los nauplios de *A. franciscana* se enriquecieron con *Streptomyces* sp. RL8 a dos concentraciones diferentes (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) durante 24 h. El enriquecimiento de nauplios de *A. franciscana* con la cepa RL8 mostró su capacidad probiótica al propiciar un aumento en la supervivencia de las

artemias tratadas (enriquecidas), en comparación con las del cultivo control que no recibieron la cepa probiótica. A las 24 horas después de haber suministrado la biomasa correspondiente del probiótico (RL8), los grupos de *A. franciscana* enriquecidos a una concentración de 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1} mostraron una supervivencia significativamente superior (88.75% y 86.25%, respectivamente) con respecto al grupo control no enriquecido (57.5%). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de supervivencia en los grupos tratados con RL8 a 10^6 y 10^8 UFC/mL^{-1} (figura 5); o sea que la carga del microorganismo no influyó en la supervivencia final de la artemia tratada.

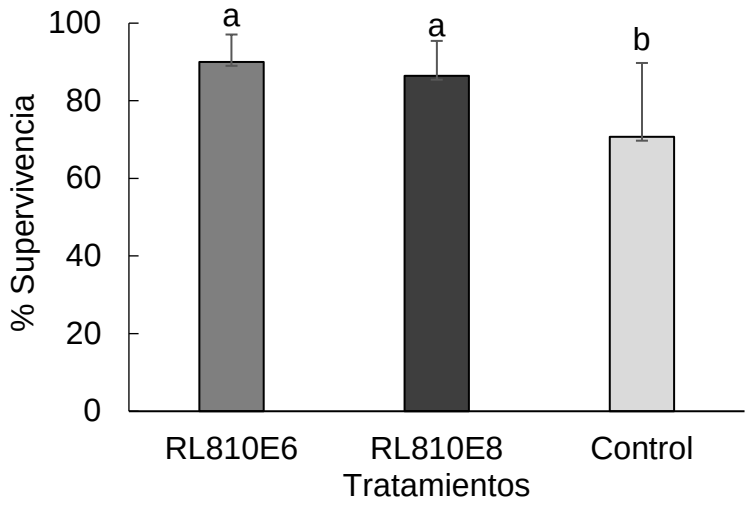


Figura 5. Supervivencia de nauplios de *Artemia,* 24 horas después de su enriquecimiento con la cepa *Streptomyces* sp. RL8 a diferentes concentraciones. [a,b] Columnas con letras diferentes difieren para (P<0,05) (Tukey, 1949).

Jasmin *et al*., (2016) comprobaron que la administración de probióticos en *Artemia* incrementó la supervivencia de estos organismos comparados con el grupo control sin probióticos. A diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación, estos autores demostraron que la supervivencia fue dependiente de la concentración de probiótico utilizada.

Muchos científicos (Makridis *et al*., 2000 y Roque *et al*., 2000) han sugerido que los nauplios de *A. franciscana* tienen una capacidad máxima para la bioencapsulación (ingestión) de células bacterianas y que ésta varía de 10^2 a 10^4 UFC nauplio^{-1}, y que esa capacidad es independiente de la densidad bacteriana a la que dichos nauplios hayan sido expuestos (10^6 a 10^8 UFC mL $^{-1}$). Sin embargo, esos mismos autores mencionan que dichos resultados varían en dependencia de la cepa bacteriana empleada, lo cual confirma el resultado obtenido en *A. franciscana*, específicamente con la cepa RL8.

En un estudio realizado por Das *et al*., (2010), demostraron que *Streptomyces* podría administrarse a organismos diana a través de su bioencapsulación en un agente intermedio o vector biológico como *Artemia* spp., y aprovechar de esta manera los beneficios probióticos de *Streptomyces* en algunas especies de interés para la acuicultura. Si se considera que el probiótico tiene también una acción favorable sobre el vector utilizado, es razonable asumir que la artemia enriquecida será más vigorosa y saludable, con lo cual se pueden incrementar los beneficios esperados en diversas especies acuícolas, que regularmente son alimentadas con nauplios enriquecidos de este microcrustáceo, durante sus primeros estadios de vida.

Un ejemplo de esto es la aplicación de probióticos como *Pseudoalteromonas* sp. en larvas de *Solea lalandi*, utilizando vectores vivos como microalgas, rotíferos y *Artemia* sp. La utilización de vectores parece ser una buena alternativa para introducir probióticos con el alimento vivo, ya que esto permite a la cepa probiótica desarrollar su actividad benéfica de manera más eficiente. En ese mismo contexto, otros autores han demostrado que la bioencapsulación de probióticos en alimento vivo (vector), como *Artemia* y rotíferos es efectiva en la administración de los probióticos al tracto digestivo de los organismos marinos (Gatesoupe, 2002 y Suzer *et al*., 2008).

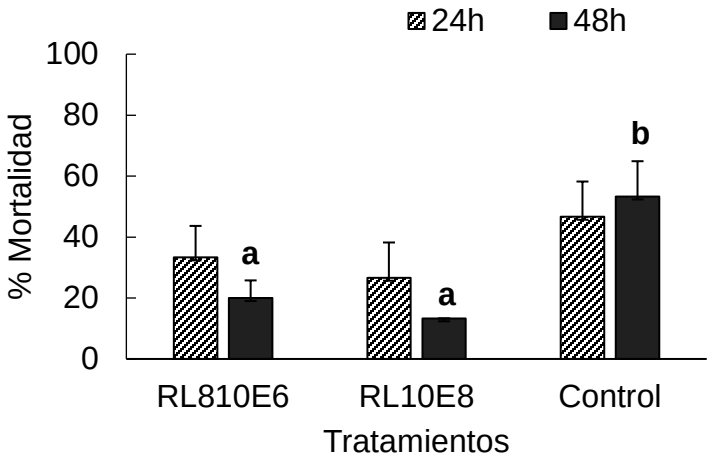
Reto de A. franciscana frente a Vibrio parahaemolyticus

Cuando los nauplios de *A. franciscana* fueron retados con *V. parahaemolyticus* a una concentración de 10^5 UFC mL^{-1}, se registró alta mortalidad en el grupo control (46,66% después de 24 horas y 53,33% después de 48 horas). Por el contrario, en los grupos tratados con RL8 a 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}, y retados con igual concentración del patógeno (10^5 UFC mL^{-1}), la mortalidad fue menor después de 24 horas (33,33% y 26,66%, respectivamente) y también fue menor a las 48 horas después del reto (20% y 13,33%, respectivamente). Cuando la carga de *Vibrio* aplicada durante el reto se incrementó a 10^7 UFC mL^{-1}, la mortalidad del grupo control a las 24 y 48 horas fue de 56,66% y 43,33%, respectivamente. Tal como se esperaba, la mortalidad fue menor en los grupos tratados con RL8 y retados con la misma concentración del patógeno (10^7 UFC mL^{-1}). A las 24 horas, la mortalidad fue de 33,33% y a las 48 horas en el grupo tratado con RL8 a 10^6 UFC mL^{-1}, mientras que la mortalidad fue de 26,66% y de 13,33% a las 24 y 48 horas respectivamente, en los grupos tratados con una concentración de 10^8 UFC mL^{-1} de RL8. En las figuras 6 A y B se muestran gráficamente estos resultados.

Estos resultados indican que la cepa de *Streptomyces* sp. RL8 fue capaz de conferir protección a los nauplios de *Artemia* durante el reto con *V. parahaemolyticus*. Este hallazgo puede ser explicado por la capacidad antagonista de la cepa RL8 para inhibir bacterias patógenas del género *Vibrio* (García-Bernal *et al.*, 2015). Quiróz-Gusmán *et al.*, (2018) probaron un consorcio bacteriano en quistes y larvas de *Artemia* y demostraron que su efecto fue dependiente de la concentración de estos microorganismos. Verschuere *et al.*, (2000) reportaron una tasa de supervivencia más alta en *Artemia* (aproximadamente 80%), cuando los mismos fueron retados con el patógeno *V. proteolyticus*, pero antes de eso se protegieron mediante una colonización preventiva con cepas probióticas (*Aeromonas* spp. y *Vibrio alginolyticus*), con respecto al grupo control sin probióticos cuya supervivencia fue menor. Marques *et al*., (2006b) reportaron una supervivencia del 95% en *Artemia* protegida con *Bacillus* sp. 72 horas después de haber sido retadas con *V. proteolyticus*. Patra y Mohamed (2003) encontraron un 91% de supervivencia

cuando los nauplios de *Artemia* fueron protegidos mediante tratamiento preventivo o enriquecimiento previo con la levadura *Saccharomyces boulardii* y luego retados con *V. harveyi*.

(A) *V. parahaemolyticus* 10^5 UFC mL^{-1}



(B) *V. parahaemolyticus* 10^7 UFC mL^{-1}

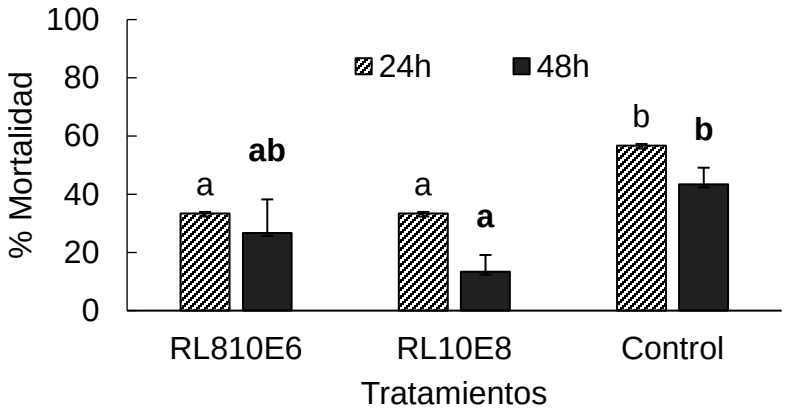


Figura 6. Mortalidad de nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con *Streptomyces* sp. RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) después del reto con *V. parahaemolyticus* (10^5 y 10^7 UFC mL^{-1}). [a,b] Columnas con letras diferentes difieren para ($P<0,05$) (Tukey, 1949).

La adhesión a las superficies de la mucosa del TGI se considera un requisito para la colonización intestinal del hospedero, no solo por cepas bacterianas probióticas sino también por los patógenos (Collado *et al*., 2007). Al respecto, en un estudio de metagenómica realizado por García-Bernal *et al*., (2017b) en ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*, estos autores comprobaron que la cepa de *Streptomyces* sp. RL8 fue capaz de adherirse y establecerse en el tracto gastrointestinal y/o en otros tejidos del molusco, pasando a formar parte de su microbiota residente, manteniendo al mismo tiempo, una elevada diversidad de actinobacterias. Con base en éste y en otros antecedentes, como la tesis doctoral de García-Bernal (2016), es posible asumir que las propiedades adhesivas de la cepa RL8 podrían haber contribuido a una rápida colonización en el TGI y en otros tejidos de los nauplios de *A. franciscana*. Esto explicaría los efectos protectores observados cuando los nauplios enriquecidos con RL8 se convirtieron en vectores bioencapsulantes del actinomiceto probiótico, y posterior a este proceso fueron retados con la cepa patógena CAIM 170 de *V. parahaemolyticus*.

Adicionalmente, se sabe que el género *Streptomyces* tiene la capacidad de formar esporas y que estas formas de resistencia a condiciones extremas, pueden ser una alternativa más práctica para producir, almacenar y administrar la cepa RL8 al vector bioencapsulante elegido, en este caso, la artemia *A. franciscana*. Procediendo de esta manera, los organismos diana pueden ingerir de manera indirecta, las esporas de RL8 bioencapsuladas en el TGI y/o en otros tejidos del vector *Artemia*. Se considera que la bioencapsulación de RL8 en nauplios de *Artemia* como un vector, es una buena estrategia para el uso de probióticos en la acuicultura.

<u>Evaluación microbiológica de la cepa RL8</u>

La colonización de *Artemia* por la cepa bacteriana se cuantificó a las 24 horas después de la inoculación de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) en el de agua de cultivo del microcrustáceo. Los resultados del conteo de actinomicetos son mostrados en la Tabla 2. La colonización bacteriana de *Artemia* puede ocurrir externamente a través de la unión a la superficie del cuerpo o internamente por ingestión de biomasa o esporas y la posterior adhesión y colonización del probiótico en el TGI del hospedero (Gomez-Gil *et al*., 1998). La cepa RL8 a 10^8 UFC mL-1 ofreció una mayor protección a los nauplios de Artemia y además mostró una mayor capacidad de colonización (3,4 UFC $nauplio^{-1}$). En este estudio se ha demostrado que la colonización preventiva del TGI con la cepa RL8, podría incluso evitar la proliferación de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de nauplios de *Artemia*. Al hacer esto, es totalmente razonable asumir que la artemia enriquecida con RL8 será más vigorosa y más saludable, con lo cual se habrá convertido en un alimento de mayor calidad nutricional para diversas especies acuícolas, además de ser portadora de un agente bacteriano para el control biológico de las infecciones.

Tabla 2. Bioencapsulación de *Streptomyces* sp. RL8 en nauplios de *A. franciscana*, a las 24 horas de exposición.

Cepa (UFC mL^{-1})	**UFC $nauplio^{-1}$**
RL8 10^6	1,2
RL8 10^8	3,4

Como los nauplios de A. *franciscana* son transparentes, la ingestión de la biomasa del probiótico (RL8) y su presencia en el intestino, se pudo detectar asociado a una coloración carmelita en el intestino de los nauplios, mediante su observación bajo el microscopio óptico con objetivo 10X (figuras 2 A, B y C).

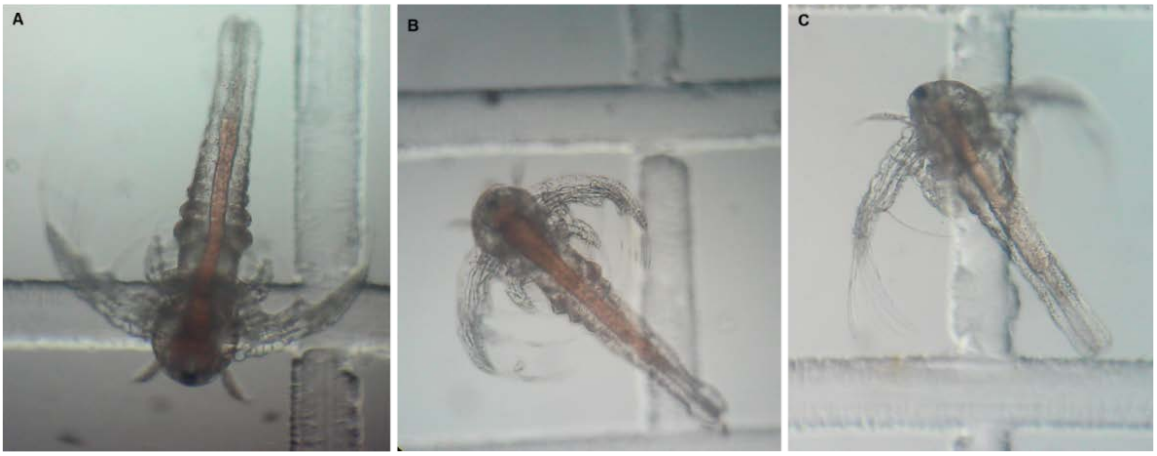


Figura 7. Imágenes de microscopía óptica de nauplios de *A. franciscana*. (A) Nauplio de *A. franciscana* 24 horas después del suministro de 10^6 UFC mL^{-1} de *Streptomyces* sp. RL8; (B) Nauplio de *A. franciscana* 24 horas después del suministro de 10^8 UFC mL^{-1} de *Streptomyces* sp. RL8; (C) Nauplio del grupo Control, sin suministro del probiótico RL8.

Como se puede observar en los nauplios del grupo control (figura 2C) el tracto digestivo estaba vacío y en los grupos alimentados con probiótico después de 24 horas (figuras 2A y B) el intestino comenzó a llenarse y a dejar de ser transparente. Vázquez-Silva *et al*., (2016) obtuvieron resultados similares en metanauplios de *Artemia* alimentados con *Lactobacillus johnsonii* y *Bifidobacterium animalis*, a una concentración de 2 x 10^3 UFC mL^{-1}.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. La cepa probiótica RL8 (*Streptomyces* sp.) presentó la mayor actividad *in vitro* frente a la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 170), y en menor grado, frente a la cepa patógena *V. harveyi* (CAIM 1792).
2. Es técnicamente posible la bioencapsulación de *Streptomyces* sp. RL8 en nauplios de *Artemia franciscana*.
3. La bioencapsulación de RL8 produjo un efecto protector en el agente vector utilizado (nauplios de *A. franciscana*), durante el reto ante el patógeno *V. parahaemolyticus* CAIM 170.
4. *A. franciscana* podría ser un vector bioencapsulante, adecuado para suministrar la cepa probiótica RL8 (*Streptomyces* sp.) a larvas de camarones y peces de interés acuícola comercial.

Recomendaciones

6. Recomendaciones

1. Estudiar, comprender y definir con mayor precisión y detalle, el modo de acción, la relación dosis-respuesta y la duración del efecto probiótico después de la ingesta del mismo, (**1-a**) por el agente vector bioencapsulante *A. franciscana* y (**1-b**) por larvas de camarones y/o de peces de interés acuícola comercial, alimentadas con la cepa probiótica RL8 bioencapsulada en nauplios de *A. franciscana*.
2. Definir el tiempo óptimo para el enriquecimiento de *A. franciscana* con la cepa RL8 de *Streptomyces* sp., determinando su viabilidad, a partir de que la artemia ha sido enriquecida, suministrada, ingerida, digerida y asimilada por larvas de camarones y/o de peces de interés acuícola comercial.

Referencias bibliográficas

7. Referencias bibliográficas

Akbar, I.; Radhakrishnan, D. K.; Venkatachalam, R.; Sathrajith, A. T. y Sureshkumar, S. (2014). Standardization of the bioencapsulation of probiotics and oil emulsion in Artemia parthenogenetica*. Int. J. Fish. Aquac*. 4(3): 122-125.

Aruvalsu C.; Shobana S.; Banu H.; Chandhirasekar D. y Prabhu D. (2012) Bioencapsulation of *Artemia nauplii* with herbal extract for promoting growth of fish fry *Poecilia sphenops* Val. *J. Modern Biotechnol* (1): 37-44.

Asem, A.; N. Rastegar-Pouyani, P.; De Los Rios, R.; Manaffar, F. y Mohebbi. (2010). Biometrical comparison of *Artemia urmiana* Günther, 1899 (Crustacea: Anostraca) cysts between rainy and drought years (1994-2003/4) from Urmia Lake, Iran. *Int. J. Biol. Sci.* 6(2):100-106.

Augustine, D.; Jacob, J. C. y Philip, R. (2016). Exclusion of *Vibrio* spp. by an antagonistic marine actinomycete *Streptomyces rubrolavendulae* M56. *Aquacult. Res.* 47(9): 2951-2960.

Austin B. y Zhang XH. Vibrio harveyi: a signifi cant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol* . (43): 119-124, 2006.

Austin, B.; Stuckey, L.; Robertson, P.; Effendi, I. y Griffith, D. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish. Dis*. (18): 93-96.

Balcázar, J. L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D. y Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol*. 114(3-4): 173-186.

Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol*. (8): 557-563.

Baruah, K.; Ranjan, J. K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2010). Efficacy of homologous and heterologous heat shock protein 70s as protective agents to gnotobiotic *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. *Fish. Shellfish. Immunol*. (29): 733–739.

Bull, A. T. & Stach, J. E. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol*. (15): 491-499.

Castro, J.; T. Castro, J.; Sánchez, G.; Castro, A.; Castro, J.; Zaragoza, R.; de Lara M. y Monroy. (2006). Cysts and nauplii biometry characteristics of seven *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) populations from Mexico*. Rev. biol. mar. oceanogr.* 41(2): 187-193.

Cha, J. H.; Rahimnejad, S.; Yang, S. Y.; Kim, K. W. y Lee, K. J. (2013). Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquacult.* (402): 50-57.

Chythanya, R.; Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquacult.* (208): 1-10.

Collado, M. C.; Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods*. 71(1): 71-74.

Cruz, P.; Ibañez, A.; Hermosillo, O. A. y Saad, H. C. R. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*. Vol. 2012.

Das, S.; Lyla, P. S. y Khan, S. A. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chin. J. Oceanol. Limnol*. (26): 166- 77.

Das, S.; Lyla, P. y Ajmal Khan, S. (2006). Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Israeli. J. Aquacult. – Bamid*. (58): 198-204.

Das, S.; Ward, L. R. y Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. For potential use as probiotics in aquaculture. *Aquacult.* (305): 32-41.

Dhert, P.H.; Rombaut, G.; Suantika, G. y Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquacult*. (200): 129–146.

Dhevendaran, K. y Annie, M. K. (1999). Antibiotic and L. asparaginase activity of *Streptomyces* sp. isolated from fish, shell fish and sediment of Veli estuarine Lake along the Kerala coast. *Indian. J. Mar. Sci*. (28): 335-337.

Donia, M. y Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis*. (3): 338-348.

Ezziyyani, M.; Sánchez, C. P.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces Rochei* -Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum L*.) causada por *Phytophthora capsici*. *An. Biol*. (26): 69-78.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria in food.

Cordoba, Argentina. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf [Citado 2018 Octubre 4]

Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol. *Med Microbiol*. (48): 149-158.

Fjellheim, A.J.; Klinkenberg, J.; Skjermo, I.M.; Aasen, G. y Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol*. (144): 153-159.

Fjellheim, A.J.; Klinkenberg, G.; Skjermo, J.; Aasen, I.M. y Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (Gadus morhua L.) larvae. *Vet. Microbiol*. (144): 153–159.

Fuller, R. (1989). A review: probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*. (66): 365-378.

Gajardo, G. M. y Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp Artemia: adapted to critical life conditions. *Front Physiol.* (*3)*: 185.

García-Bernal, M. (2016). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

García-Bernal, M.; Campa-Córdova, Á. I.; Saucedo, P. E.; González, M. C.; Marrero, R. M. y Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Vet World. 8*(2): 170.

García-Bernal, M.; Marrero, R. M.; Campa-Córdova, Á. I. y Mazón-Suástegui, J. M. (2017a). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with

Bacillus and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int. 25*(2): 927-939.

García-Bernal, M.; Medina-Marrero, R.; Rodríguez-Jaramillo, C.; Marrero-Chang, O.; Campa-Córdova, Á. I.; Medina-García, R. y Mazón-Suástegui, J. M. (2018). Probiotic effect of *Streptomyces* spp. on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquac Nutr.* 24(2): 865-871.

García-Bernal, M.; Trabal Fernández, N.; Saucedo Lastra, P. E.; Medina Marrero, R., y Mazón-Suástegui, J. M. (2017b). *Streptomyces* effect on the bacterial microbiota associated to *Crassostrea sikamea* oyster. *J. Appl. Microbiol. 122*(3): 601-614.

Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquacult.* (180):147–165.

Gatesoupe, F. J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, Pollachius pollachius. *Aquacult.* (212): 347–360.

Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker, E. y Ringo, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, *352*(1-3), 279-285.: 279-285.

Giraffa, G.; Chanishvili, N. y Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol*. (161): 480-487.

Giri, S. S.; Sen, S. S. y Sukumaran, V. (2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, Labeo rohita. Fish Shellfish. *Immun*. (32): 1135-1140.

Gomez-Gil, B.; Herrera-Vega, M.; Abreu-Grobois, F. y Roque, A. (1998). Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol*. 64 (6): 2318–2322.

Gomez-Gil, B.; S. Soto-Rodríguez, A.; García-Gasca, A.; Roque, R.; Vázquez-Juárez, F.; Thompson, L. y Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. (150): 1769–1777.

González, I.; Ayuso-Sacido, A.; Anderson, A. y Genilloud, O. (2005). *Actinomycetes* isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol*. (54): 401-415.

Gopalakrishnan, S.; Ranga Rao, G.; Ratna Kumari, B.; Vijayabharathi, R.; Srinivas, V. y Gowda, C. (2013). Development of broad-spectrum *Actinomycetes* for biocontrol and plant growth promotion of food crops. Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) For Sustainable Agriculture. In: Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials Manila, Philippines.

Gunasundari, V.; Kumar, T. A.; Ghosh, S. y Kumaresan, S. (2013). An *ex vivo* loom to evaluate the brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in clownfish aquaculture with special reference to *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* (13): 389-395.

Herawati V. E.; Hutabarat J. y Radjasa O. K. (2014) Nutritional content of *Artemia* sp*.* Fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*. *Hayati* 21(4): 166-172. Disponible en : http://images.engormix.com/e_articles/European_finfish05.gif [citado 2018 Enero 23].

Jasmin, M. Y.; Wagaman, H.; Yin, T. A.; Ina-Salwany, M. Y.; Daud, H. M. y Karim, M. (2016). Screening and evaluation of local bacteria isolated from shellfish as potential probiotics against pathogenic *Vibrios*. *J. Environ. Biol.* 37(4 Spec No): 801-809.

Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M. J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquacult*. (274): 1–14.

Kongnum, K. y Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immun*. (32): 170-177.

Kumar, S. S.; Philip, R. y Achuthankutty, C. (2006). Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Current Science.* (91): 807-811.

Lakshmi, B.; Viswanath, B. y Sai Gopal, D. V. (2013). Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J. Pathog*: 123 - 424.

Lakshmi, N. y Rosamma, P. (2008). Marine Actinomycetes as source of antiviral agents and as probionts for Penaeus monodon culture systems. Thesis Cochin University of Science and Technology.

Langdon, C. (2003). Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquacult*. (227): 259-275.

Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquacult*. (181): 397–403.

Lazado, C. C.; Lacsamana, J. I. y Caipang, Ch. M. A. (2015). Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines. *Ed. Research Signpost, Kerala:* 89-114.

Lee, L. H.; Zainal, N.; Azman, A. S.; Eng, S. K.; Ab Mutalib, N. S.; Yin, W. F. y Chan, K. G. (2014). *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 64(9): 3297-3306.

Leiva, S.; Yáñez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H. y García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetos aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. Med. Chile.* (132): 151-159.

Leveau, J. y Bouix, M. (2000). Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. *Ed. Acribia. S. A., Zaragoza*: 525.

Lightner, D. y Redman, R. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquacult*. (164): 201-220.

Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The World Aquaculture Society. Batoa. Rouge, Lousiana.

MacLeod, R. A. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Advances in Microbiology of the Sea*. Droop, M. R. y Jannasch, J., 1968; pp 95-126. ISBN 978-0-12-003001-9.

Makridis, P.; Fjellheim, A. J.; Skjermo, J. y Vadstein, O. (2000). Control of the bacterial flora of *Brachionis plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquacult*. (185): 207–218.

Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K. y Kim, S. K. (2013). Production, characterization and antioxidant potential of protease from *Streptomyces* sp. MAB18 using poultry wastes. BioMed research international.

Marques, A. F.; Ollevier, W.; Verstraete, P.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006a). Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *J. Appl. Microbiol*. (100): 903–918.

Marques, A. T.; Thanh, H.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006c). Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquacult*. (258): 116–126.

Marques, A.; Huynh, T.; Thanh, W.; Verstraete, J.; Dhont, P.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006b). Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (334): 20–30.

Mohebbi F.; Azari A. M.; Ahmadi R.; Seidgar M.; Mostafazadeh B.; Ganji S. (2015). The effects of *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis oculata* as food on the growth, survival and reproductive characteristics of *Artemia urmiana*. Environmental Resources Research. 3(2): 111-120.

Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish. Immun.* (29): 2-14.

Nemutanzhela, M. E.; Roets, Y.; Gardiner, N. y Lallo, R. (2014). The use and benefits of *Bacillus* based biological agents in aquaculture. En: Hernandez-Vergara, M. (ed.) Sustainable aquaculture techniques. Murcia, Spain.

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

Ngo, T. T. C.; Le, T. H. T. y Nguyen, H. T. A. (2016). Characterization of Actinomycetes Antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Shrimp

Pond Sediment. Earth and Environmental Sciences. *VNU Journal of Science*. 32(1): 1-9.

Nimrat S.; Suksawat S.; Boonthai T. y Vuthiphandchai V. (2012) Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Vet. Microbiol*. 159(3-4): 443-450.

Orozco-Medina, C.; Maeda-Martínez, A. M. y López-Cortés, V. (2002). Effect of aerobic Grampositive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquacult*, (213): 15–29.

Panigrahi, A. y Azad, I. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario*. Fish Physiol. Biochem.* (33): 429-440.

Park, S. C.; Shimamura, I.; Fukunaga, M.; Mori, K. I. y Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida,* as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol*. (66): 1416-1422.

Patra, S. K. y Mohamed, K. S. (2003). Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquac. Int*. 11(5): 505-514.

Pérez-Sánchez, T.; Ruiz-Zarzuela, I.; Blas, I. y Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev. Aquacult*. (6): 133-146.

Persoone, G. y Sorgeloos, P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O. y Jaspers, E. The brine shrimp *Artemia*. (Eds.) *Universa Press. Wetteren. Belgium*: 3-21.

Quiroz-Guzmán, E.; Vázquez-Juárez, R.; Luna-González, A.; Balcázar, J. L.; Barajas-Sandoval, D. R. y Martínez-Díaz, S. F. (2018). Administration of Probiotics Improves the Brine Shrimp Production and Prevents Detrimental Effects of Pathogenic Vibrio Species. *Mar. Biotechnol.* 1-8.

Reen, J. F.; Gutiérrez-Barranquero, J. A.; Dobson, A. D.; Adams, C. y O'Gara, F. (2015). Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology. *Mar. Drugs.* (13): 2924-2954.

Rodríguez, L.; Livengood, E. J.; Miles, R. D.; Chapman, F. A. (2011). Uptake of metronidazole in *Artemia* at different developmental life stages. *J. Aquat. Anim. Health.* (23): 100-102.

Roiha, I. S.; Otterlei, E. y Samuelsen O. B. (2011). Evaluating bioencapsulation of florfenicol in rotifers (Brachionus plicatilis). *Aquacult*. (42): 1110-1116.

Romalde, J. L.; Diéguez, A. L.; Lasa, A. y Balboa, S. (2013). New Vibrio species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol*. (4): 131-141.

Romano, G.; Costantini, M.; Sansone, C.; Lauritano, C.; Ruocco, N. y Ianora, A. (2016). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res*: 1-12.

Roque A.; Mazari A.; Gomez-Gil, B. (2000). Oral challenge of postlarvae of *Litopenaeus vannamei* through bioencapsulation of *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana*. *Cienc Mar*. (26): 65 –77.

Sahu, M. K.; Murugan, M.; Sivakumar, K.; Thangaradjou, T. y Kannan, L. (2007). Occurrence and distribution of actinomycetes in marine environs and their antagonistic activity against bacteria that is pathogenic to Shrimps. *Isr. J. Aquacult – Bamid.* (59): 155-161.

Salgado, I. (2001). La *Artemia* y su cultivo en el Perú. Universidad Nacional de Piura, Perú: 103.

Ser, H. L.; Zainal, N.; Palanisamy, U. D.; Goh, B. H.; Yin, W. F.; Chan, K. G. y Lee, L. H. (2015). *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(6): 1369-1378.

Singh, S. B. y Pelaez, F. (2008). Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. *Prog. Drug Res*. (65): 141-174.

Smith, G. G.; Ritar, A. J. y Brown, M. R. (2004). Uptake and metabolism of a particulate form of ascorbic acid by *Artemia nauplii* and juveniles. *Aquac Nutr.* (10): 1-8.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. (1995). Biometry (3d edn). New York: WH Feeman and Company: 98.

Soltanian, S. (2007). Protection of gnotobiotic artemia against *Vibrio campbellii* using baker's yeast strains and extracts (Doctoral dissertation, Ghent University).

Sorgeloos, P.; Coutteau, P.; Dhert, P.; Merchie, G. y Lavens; P. (1998). Use of brine shrimp Artemia sp. in larval crustacean nutrition: a review. *Fish Sci*. (6): 55-68.

Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H. O.; Saka, S.; Firat, K. y Otgucuoglu, Ö. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquacult*. (280): 140–145.

Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. y Zuberer, D. A. (2005). Principles and applications of soil microbiology. 2nd Ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Tan, L. T. H.; Ser, H. L.; Yin, W. F.; Chan, K. G.; Lee, L. H. y Goh, B. H. (2015). Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from Malaysia mangrove soil. *Front Microbiol*. (6): 1316.

Thirumurugan, D. y Vijayakumar, R. (2013). Antifungal activity of marine actinobacteria East Coast Regions (ECR) of Tamilnadu, South India. *Wide Spect. Res. J*. 1(9): 37-49.

Tinh, N. T. N.; Dierckens, K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* (10): 1–12.

Tinh, N. T. N.; Linh, N. D.; Wood, T. K.; Dierckens, K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. Appl. Microbiol*. (103): 194-203.

Touraki, M. y Niopas, I. (2012). Bioencapsulation and pharmacokinetic study of oxolinic acid in rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. *Aquacult*. (44): 701-712.

Touraki, M.; Mourelatos, S.; Karamanlidou, G.; Kalaitzopoulou, S.; Kastritsis, C. (1996). Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry. *Aquacult. Eng*. (15): 133- 147.

Tovar-Ramírez, D.; Cruz-Suárez, L. E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Nieto-López, M. G.; Villarreal Cavazos, D. A.; Gamboa-Delgado, J.; López Acuña, L. M. y Galaviz-Espinoza, M. (2017). Enfoques transcriptómicos en el jurel *Seriola Rivoliana*. Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. pp: 389-406.

Tovar-Ramírez, D.; Teles, A.; Salas-Leiva, J. S.; Hernández-Contreras, A.; Asencio-Alcudia, G. G.; Le Du, J.; Burgoin-Cota, M.; Alvarez-González, C. A.; Llera-Herrera, R.; Gisbert, E.; Fernández, I.; Pérez-Urbiola, J. C.; Ibarra-Castro, L.; Mazón-Suástegui, J. M.; Núñez-Vázquez, E. J.; Guzmán-Villanueva, L. T. y Reyes-Becerril, M. (2017). Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. pp: 389-406.

Tukey, J. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*. 5: 99-114.

Valli, S.; Suvathi, S. S.; Aysha, O.; Nirmala, P.; Vinoth, K. P. y Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Med*. (2): 469-473.

Vaseeharan, B. y Ramasamy P. (2003). Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol. Res.* (158): 299–308.

Vázquez-Silva, G.; Castro-Mejía. J. J.; Sánchez de la Concha, B.; González-Vázquez, R.; Mayorga-Reyes, L. y Azaola-Espinosa, A. (2016). Bioencapsulation of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus johnsonii* in *Artemia franciscana* as feed for charal (*Chirostoma jordani*) larvae. *Rev. Mex. Ing. Quím*. 15(3): 809-818.

Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., (64): 655–671.

Vieira, F. D. N.; Pedrotti, F. S.; Buglione Neto, C. C.; Mouriño, J. L. P.; Beltrame, E.; Martins, M. L.; Ramirez, C. y Arana, L. A. V. (2007). Lactic-acid bacteria

increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz. J. Oceanogr*. (55): 251-255.

Villamil, L. y Mártínez-Silva, M. A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Bol. Invest. Mar. Cost*. (38): 165-187.

Vine, N. G.; Leukes, W. D. y Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* (30): 404–427.

Wang, L.; Chen, Y.; Huang, H.; Huang, Z.; Chen, H. y Shao, Z. (2015). Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res*. (46): 395-404.

Widanarni, Y.; Nababan, I. y Yuhana, M. (2015). Growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae fed prebiotic and probiotic through *Artemia*. *Pak. J. Biotechnol*. 12(2):99 -104.

Widiastuti, R.; Hutabarat, J. y Herawati, V. E. (2012). Effect of different natural feeding (*Skeletonema costatum* dan *Chaetoceros gracilis*) on absolute biomass growth and nutritional content of local *Artemia* sp. *J. A. M. Tech.* 1(1):236-248.

Williams, S. y Vickers, J. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.* (12): 43-52.

You, J. L.; Cao, L. X.; Liu, G. F.; Zhou, S. N.; Tan, H. M. y Lin, Y. C. (2005). Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21(5): 679-682.

You, J.; Xue, X.; Cao, L.; Lu, X.; Wang, J.; Zhang, L. y Zhou, S. (2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (76): 1137-1144.

Zokaeifar, H.; Balcazar, J. L.; Saad, C. R.; Kamarudin, M. S.; Sijam, K.; Arshad, A. y Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. (33): 683–689.

Zokaeifar, H.; Babaei, N.; Saad, C. R.; Kamarudin, M. S.; Sijam, K. y Balcázar, J. L. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* (36): 68-74.

Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Trabajo de Diploma para aspirar al título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Título:

"Bioencapsulación de Streptomyces sp. RL8 en nauplios de Artemia franciscana y estudio de su resistencia contra Vibrio patógeno"

Autor: Pável Adrián Ossorio Alvarez.
Tutores: Dr. C Milagro García Bernal.
Dr. C José Manuel Mazón-Suástegui.

Santa Clara
2017-2018

Exergo

El futuro de nuestra patria tiene que ser necesariamente un futuro de hombres de ciencia (…)

Fidel Castro Ruz, 1965.

Dedicatoria

A *mi madre*, por sus incontables noches de desvelo, por no perder nunca de vista mi trayectoria de estudio, por su amor y apoyo infinito.

A *mi abuela Ramonita*, por inculcarme los valores esenciales que han forjado mi personalidad, a ella, donde quiera que esté le agradezco, por dedicar parte de su vida a mí.

A mi abuela Ana, porque sé que anhela tanto este título como yo.

Agradecimientos

Durante el breve, pero intenso período de tiempo, en el que se desarrolló esta investigación, tengo que agradecer a muchas personas, que en mayor o menor cuantía, han aportado su granito de arena para la realización de la misma.

Primero que todo agradecer infinitamente a Yeny Alvarez Ponce, por ser entre otras cosas: madre, padre, amiga y mi mejor consejera, siempre estaré en deuda con ella.

A mi tutora Milagro por confiar en mí, por su trabajo incansable, por hacer que en tiempo record este estudio quedara con buena calidad y por enseñarme parte de su sabiduría.

A Marlén, la técnico, que además de ayudarnos con el trabajo de laboratorio nos aportó un toque humorístico con su forma de ser.

A todas aquellas personas que colaboraron, como fueron: mi padre, mi abuela Ana, mi prima Mey, mis tías y mi familia en general. A mi novia y a toda su familia por acogerme como un miembro más.

En fin, a todo el personal del Centro de Bioactivos Químicos.

Resumen

Se llevó a cabo la bioencapsulación del actinomiceto probiótico *Streptomyces* sp. (Cepa RL8) en nauplios (estadio II) de *Artemia franciscana*, buscando su potencial aplicación como vehículo para el suministro del probiótico a juveniles de peces y camarones en cultivo. Se aplicaron dos tratamientos con diferente concentración de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) para el enriquecimiento experimental de nauplios y un tratamiento control, c/u con tres réplicas. Después de 24 h, todos los grupos fueron retados con la cepa patogénica CAIM-170 de *Vibrio parahaemolyticus* a dos diferentes concentraciones (10^5 y 10^7 UFC mL^{-1}) y se registró la supervivencia a las 24 y 48 h posteriores. La supervivencia de los nauplios fue significativamente superior (88.75% y 86.25%) en los grupos enriquecidos con 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1} de RL8, con respecto al grupo control no enriquecido (57.5%). Estos resultados confirman las propiedades probióticas de la cepa RL8; demuestran que incrementa la resistencia de los nauplios enriquecidos de *A. franciscana* ante la cepa CAIM-170 del patógeno *V. parahaemolyticus* y adicionalmente sugieren que ese microcrustáceo tiene potencial como vehículo bioencapsulante para el suministro del probiótico RL8 a larvas de peces y camarones en cultivo.

Palabras claves: probiótico**,** enriquecimiento**,** supervivencia**,** microcrustáceo**.**

Abstract

It was carried out the bioencapsulation of the actinomycete *Steptomyces* sp. (Strain RL8) in nauplii (stage II) of *Artemia franciscana*, seeking its potential application as a vehicle for the supply of probiotic to juveniles of fish and shirimp in culture. Two treatments with different concentrations of RL8 (10^6 and 10^8 CFU mL^{-1}) were applied for the experimental enrichment of nauplii and a control treatment, each with three replications. After 24 h, all groups were challenged whit the pathogenic strain CAIM-170 of *Vibrio parahaemolyticus* at two different concentrations (10^5 and 10^7 UFC mL^{-1}) and survival was recorded at 24 and 48 h later. The survival of the nauplii was significantly higher (88.75% y 86.25%) in the groups enriched whit 10^6 and 10^8 CFU mL^{-1} of RL8 whit respect to the non-enriched control group (57.5%). These results confirm the probiotics properties of the RL8 strain; show that it increases the resistance of enriched *A. franciscana* nauplii in front of strain CAIM-170 of the pathogen *V. parahaemolyticus* and further suggests that this microcrustacean has potential as a bioencapsulating vehicle for the supply of probiotic RL8 to fish and shrimp larvae in aquaculture.

Key words: probiotic, enrichment, survival, microcrustacean.

Índice Pág

1. Introducción 1

2. Revisión bibliográfica 4

2.1 *Artemia* spp. Descripción general 4

2.2 Sistemática y taxonomía del género *Artemia* 6

2.3 Importancia de *Artemia* en la producción acuícola 6

2.4 Enfermedades bacterianas en la acuicultura 8

2.5 Uso de probióticos en la acuicultura 9

2.6 Mecanismos de acción de los probióticos 9

2.6.1 Producción de compuestos inhibitorios 10

2.6.2 Competencia por sitios de adhesión o exclusión competitiva 10

2.6.3 Competencia por nutrientes 11

2.6.4 Modulación del sistema inmunológico 11

2.6.5 Mejoras en la calidad del agua 11

2.7 Modos de administración de los probióticos 12

2.7.1 Bioencapsulación (Artemia) 12

2.7.2 Adición al agua de cultivo o inmersión 13

2.8 Principales microorganismos probióticos utilizados en la acuicultura 13

2.8.1 Bacterias Gram positivas 13

2.8.2 Bacterias Gram negativas 14

2.8.3 Levaduras 15

2.9 Actinomicetos. Características generales 15

2.10 Metabolitos producidos por actinomicetos marinos 16

3. Materiales y Métodos 18

3.1 Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. RL8 18

3.2 Obtención y eclosión de quistes de Artemia franciscana 19

3.3 Cepas probiótica y patógena utilizadas en el estudio 19

3.4 Diseño experimental de la investigación 20

3.4.1 Bioensayo de bioencapsulación de RL8 en *Artemia franciscana* 20

3.4.2 Evaluación microbiológica de la cepa RL8 20

3.4.3 Reto de *Artemia franciscana* con *Vibrio parahaemolyticus* 21

3.4.4 Análisis estadístico 21

4. Resultados y discusión 22

5. Conclusiones 32

6. Recomendaciones 33

7. Referencias bibliográficas 34

Introducción

1. Introducción

El producto conocido genéricamente como “Artemia” es un microcrustáceo ampliamente utilizado a nivel mundial como alimento natural, vivo o procesado, en el cultivo de camarones y peces. Se utiliza biomasa fresca o congelada, pero también organismos vivos, incluyendo nauplios y otros estadios iniciales de su desarrollo, al igual que juveniles y adultos. Debido a su reducido tamaño, los nauplios son adecuados para la alimentación de larvas de peces y camarones, además de que tienen un alto valor nutritivo y son fácilmente digeribles. Algunas especies como Artemia *salina y A. franciscana* tienen como característica que son organismos filtradores no selectivos, que consumen prácticamente cualquier material particulado que entra en su boca (Mohebbi *et al.,* 2015). Este hecho permite que el microcrustáceo pueda ser alimentado o bien cubierto con una gran variedad de compuestos de enriquecimiento, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de calamar, vitaminas, levaduras u otros productos comerciales, incluidos los probióticos y los prebióticos, antes de utilizarlo como alimento (Akbar *et al*., 2014).

Diversos estudios han demostrado que el enriquecimiento de la *Artemia* con varios compuestos evaluados y seleccionados *a priori*, podrían mejorar significativamente su composición y valor nutricional, de modo que cuando se utilice como alimento natural vivo o congelado para camarones y larvas de peces, pueda soportar un buen crecimiento y una tasa elevada de supervivencia de la especie cultivada que reciba esta dieta enriquecida (Widiastuti *et al.,* 2012; Herawati *et al.,* 2014).

La aplicación de un probiótico en camarón mediante el enriquecimiento de *Artemia* como su fuente de alimento, es una alternativa que se puede utilizar para producir postrlarvas de camarón de alta calidad con una alta supervivencia, tasa de crecimiento y resistencia contra varias enfermedades, debido que el probiótico “bioencapsulado” en la artemia puede incrementar la resistencia específica del camarón a diversos patógenos. Si esto se hace durante la producción de postlarvas en laboratorio, o durante su preengorde o maternización, es altamente probable que cuando esas postlarvas o juveniles se siembren para su cultivo (engorde) en estanques de producción comercial,

tengan un buen desempeño con respecto a indicadores zootécnicos como crecimiento, supervivencia y un sistema inmune fortalecido que incrementa su resistencia al ataque de los patógenos (Nimrat *et al.,* 2012; Zokaeifar *et al.,* 2012; Widanarni *et al.,* 2015).

Los actinomicetos son microorganismos Gram positivos, recientemente reconocidos por su potencial probiótico (Das *et al.,* 2008; García-Bernal *et al.*, 2015, 2017a, b). Entre las características distintivas que los hacen ideales para este fin, destaca su condición de saprófitos, ya que contribuyen al reciclaje de biopolímeros complejos, a la mineralización y al reciclaje de nutrientes en la acuicultura. Adicionalmente, los actinomicetos no son patógenos para animales, plantas o peces; producen una gran variedad de exoenzimas que pueden mejorar la digestibilidad y el aprovechamiento de los alimentos en peces, camarones y moluscos, además de metabolitos secundarios, ya que incluso son productores por excelencia de antibióticos y pueden inhibir el crecimiento de patógenos en la acuicultura (Das *et al.,* 2010; Augustine *et al.,* 2016; García-Bernal, 2016).

Por todo lo antes expuesto, se plantea el siguiente ***problema científico*** a resolver durante la presente investigación:

¿Es posible utilizar la cepa de *Streptomyces* sp. RL8, aislada de sedimentos marinos de Cuba como agente probiótico bioencapsulado en un estadio inicial del desarrollo de *Artemia franciscana* para incrementar el valor nutricional del microcrustáceo?

En función de lo anterior, ***la hipótesis*** en que se sustenta la presente investigación es la siguiente:

La cepa de *Streptomyces* sp RL8., aislada de sedimentos marinos de Cuba, una vez bioencapsulada en nauplios II de *Artemia franciscana*, se mantiene viva en su tracto intestinal y conserva sus propiedades probióticas, por lo que esta podría utilizarse como alimento vivo en el cultivo de larvas de peces y camarones.

Para aceptar o refutar esta hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Evaluar al microcrustáceo *Artemia franciscana* como agente bioencapsulador de la cepa probiótica de *Streptomyces sp*. RL8.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad *in vitro* de la cepa RL8 frente a cepas patógenas de *Vibrio* spp., y seleccionar aquella frente a la cual, tiene un mejor desempeño.
2. Estudiar el enriquecimiento de nauplios de *Artemia franciscana* con diferentes concentraciones de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) como procedimiento para bioencapsular la cepa probiótica en el microcrustáceo.
3. Evaluar la eficiencia de la bioencapsulación de RL8 en nauplios de *Artemia franciscana*, mediante reto ante el Vibrio patógeno previamente seleccionado.

Revisión bibliográfica

2. Revisión Bibliográfica

2.1 *Artemia* spp. Descripción general

La *Artemia* es un pequeño crustáceo filtrador, propio de hábitats acuáticos de elevada salinidad, que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo. La salinidad es el factor principal que determina la distribución natural de las poblaciones de *Artemia;* que pueden desarrollarse adecuadamente en lugares hipersalinos y escapar así de sus depredadores porque éstos no pueden sobrevivir en esas condiciones (Castro *et al.,* 2006). Estos animales poseen el sistema osmorregulatorio más eficiente conocido en todo el reino animal; son capaces de sintetizar eficazmente pigmentos respiratorios (hemoglobina) y hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto que existe en los ambientes hipersalinos; y adicionalmente tienen la capacidad de producir quistes en que se mantienen viables en fase de latencia cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie (Salgado, 2001).

En la actualidad, *Artemia* sp. es el microcrustáceo más empleado como alimento vivo para larvas de muchos peces y crustáceos marinos en cultivo, desde nauplio hasta la etapa adulta (Persoone *et al.,* 1980); es un filtrador no selectivo y se alimenta tanto de materia orgánica particulada (detritos biológicos procedentes de aguas de manglar) como de organismos vivos de tamaño pequeño como microalgas y bacterias (Salgado, 2001).

El primer estado larvario tiene una longitud que oscila entre 400 y 500 µm de longitud, tras aproximadamente 24 horas, el animal muda al segundo estado larvario. La larva continúa su crecimiento apareciendo diferenciaciones a lo largo de quince procesos secuenciales de muda (Figura 1). Posteriormente, van apareciendo de manera secuencial algunos apéndices lobulares pares en la región torácica que se diferenciarán posteriormente en toracópodos, se desarrollan ojos complejos laterales a ambos lados del ojo naupliar. Desde el estadio X en adelante, se producen importantes cambios morfológicos y funcionales. Las antenas pierden

su función locomotriz y se transforman en elementos de diferenciación sexual; los futuros machos desarrollan unos apéndices curvados y prensiles mientras que las antenas de las hembras degeneran en apéndices sensoriales. Cuando los toracópodos están ya completamente formados presentan tres partes funcionales: los telopoditos y endopoditos con acciones locomotoras y filtradoras y los exopoditos que actúan como branquias. Los adultos de Artemia miden hasta 10 mm de longitud en las poblaciones bisexuales y hasta 20 mm en las poblaciones partenogenéticas (Salgado, 2001). El rápido desarrollo y la capacidad de sus huevos o quistes, para soportar largos periodos en condiciones desfavorables, hacen de la artemia un modelo invaluable en investigaciones biológicas.

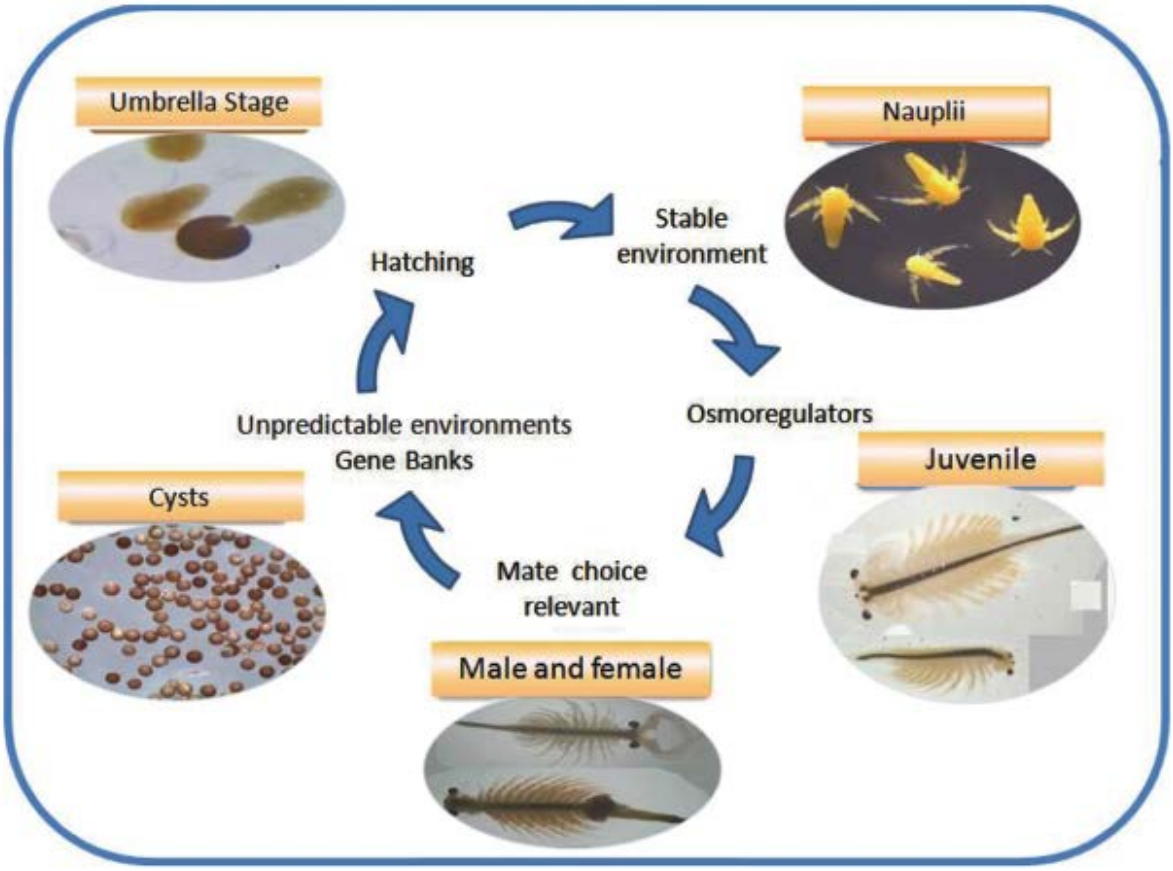


Figura 1. Ciclo de vida de *Artemia* (Gajardo y Beardmore, 2012).

2.2 Sistemática y taxonomía del género *Artemia*

La descripción taxonómica del género *Artemia* es la siguiente (Asem *et al*., 2010):

Phylum: Artrópoda

Clase: Crustácea

Subclase: Braquiópoda

Orden: Anostraca

Familia: Artemidae

Género: Artemia Leach, 1819.

Especies:

- *Artemia salina*: Área del Mediterráneo
- *Artemia tunisiana*: Europa
- *Artemia franciscana*: América (Norte, Centro y Sur)
- *Artemia persimilis*: Argentina
- *Artemia urmiana*: Irán
- *Artemia monica*: Mono Lake, California-US

2.3 Importancia de *Artemia* sp. en la producción acuícola

Los nauplios de *Artemia* se utilizan ampliamente en todo el mundo como alimento vivo para las etapas larvarias de especies de agua dulce y marinas comercialmente importantes, debido a su disponibilidad en el mercado, relativo bajo costo, facilidad de cultivo y composición bioquímica que los convierte en una dieta viva de excelente calidad nutricional (Sorgeloos *et al.,* 1998 y Smith *et al.,* 2004). Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar alimentos artificiales larvarios o poslarvarios, pero los organismos vivos como los nauplios de artemia son preferidos en los criaderos acuícolas. Estos microcrustáceos no son selectivos en su alimentación, por lo que se pueden enriquecer con suplementos alimenticios diversos, que pemiten mejorar su valor nutricional, e inclusive como vía de

administración de medicamentos *ad-hoc*, para proporcionar sus beneficios de salud a los animales a los que se los alimenta (Rodríguez *et al.,* 2011).

La producción tecnificada de larvas de peces y camarones ha sido mejorada progresivamente a través del desarrollo de nuevos sistemas de crianza basados en un mayor conocimiento de los requerimientos nutricionales y de manejo de las especies objetivo. Sin embargo, las producciones estables están lejos de mantenerse en su nivel óptimo, ya que están limitadas por el brote de infecciones y enfermedades asociadas a diversos microorganismos patogénicos de elevada virulencia, como algunas cepas bacterianas y virales que son altamente perjudiciales, principalmente durante las primeras etapas de la vida de peces, camarones y moluscos marinos (Roiha *et al*., 2011 y García-Bernal, 2016). Las infecciones bacterianas pueden causar hasta el 100% de mortalidad, lo que en las unidades de producción acuícola puede resultar en grandes pérdidas económicas. Una forma fácil y directa de enfrentar las enfermedades bacterianas es proporcionar los agentes quimioterapéuticos adecuados a las larvas de camarones y peces a través de la cadena alimentaria mediante la incorporación de un agente o principio activo adecuado en un organismo portador, lo cual se reconoce como un procedimiento de bioencapsulación (Touraki *et al.,* 1996). Este concepto biotecnológico se define como el proceso mediante el cual, los organismos vivos utilizados como alimento se enriquecen con nutrientes específicos o con moléculas de fármacos y una vez enriquecidos se proporcionan como alimento vivo a los organismos objetivo (Aruvalsu *et al.,* 2012). Algunos de los fármacos que se han administrado con éxito usando esta técnica son la oxitetraciclina (Langdon*,* 2003), el ácido oxolínico (Touraki y Niopas, 2012) el florfenicol (Roiha *et al.,* 2011) y el metronidazol (Rodríguez *et al.,* 2011).

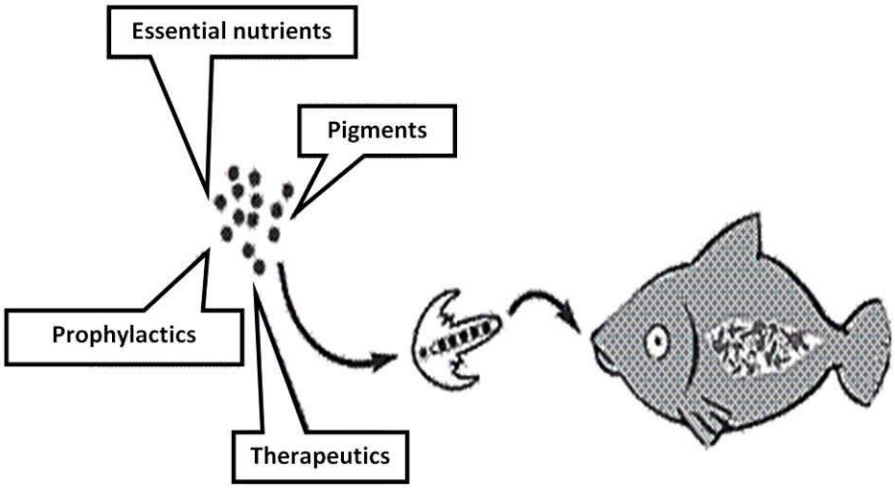


Figura 2. Suministro de nutrientes esenciales, metabolitos, pigmentos, etc. a larvas de peces utilizando nauplios de *Artemia* a través de la técnica de bioencapsulación. (http://images.engormix.com/e_articles/European_finfish05.gif).

2.4 Enfermedades bacterianas en la acuicultura

Las infecciones son un problema muy común en la acuicultura marina y la mayoría son causadas por bacterias y virus. Entre las bacterias Gram negativas asociadas a enfermedades y epizootias acuícolas se destacan las pertenecientes a los géneros *Vibrio, Aeromonas, Pseudomonas, Tenacibaculum* y *Photobacterium.* Dentro de las Gram positivas, el género *Streptococcus* es el de mayor interés y entre los virus, el que mayor daño produce es el asociado al síndrome de la mancha blanca o WSSV, por sus siglas en inglés (Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1998). La mayoría de estos agentes patógenos se encuentran en el medio marino y únicamente ocasionan daño, cuando por ciertas circunstancias se reproducen en exceso y pueden además sobrepasar las barreras defensivas de los organismos sometidos a condiciones primarias de estrés, inmuno-depresión, deficiencias nutricionales, heridas y/o un grave deterioro o contaminación del medio acuático circundante (Romalde *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015).

Las vibriosis son infecciones producidas por diferentes especies del género *Vibrio,* que afectan a peces, moluscos y crustáceos del medio marino, dulce o salobre y se caracterizan por un cuadro de curso agudo, con una sintomatología típica de septicemia hemorrágica. Aunque los vibrios forman parte de la biota normal del

camarón, son patógenos oportunistas y pueden ser aislados de hemolinfa o tejido muscular en larvas, postlarvas y juveniles, cuando se encuentran en grandes cantidades en el individuo (Romalde *et al.,* 2013 y Wang *et al.,* 2015).

2.5 Uso de probióticos en la acuicultura

La definición de los probióticos ha evolucionado en el tiempo, pero de manera generalizada, se acepta que son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio al hospedero (FAO/WHO, 2001). El uso de probióticos o bacterias benéficas es visto de forma interesante como una alternativa al tratamiento con antibióticos, porque ayudan a controlar a los patógenos. El uso de agentes probióticos en la nutrición de humanos y animales está bien estudiado (Fuller, 1989) y su aplicación en la acuicultura ha sido investigada por muchos autores porque representa una alternativa más ecológica y natural para la prevención y control de diversas enfermedades, logrando efectos beneficiosos en materia de salud y bioseguridad para una acuicultura sostenible (Cruz *et al.,* 2012; Lakshmi *et al.,* 2013 y Newaj-Fyzul *et al.,* 2014).

2.6 Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos generalmente modulan el crecimiento de la microbiota intestinal, suprimiendo mediante mecanismos de competencia por espacio y nutrientes, o por antibiosis y exclusión, a las bacterias potencialmente perjudiciales y reforzando los mecanismos de defensa naturales del hospedero (Giraffa *et al.,* 2010), mejorando así su resistencia contra las enfermedades infecciosas (Gildberg *et al.,* 1997). Los mecanismos de acción de las bacterias utilizadas como probióticos se enumeran a continuación (Figura 3):

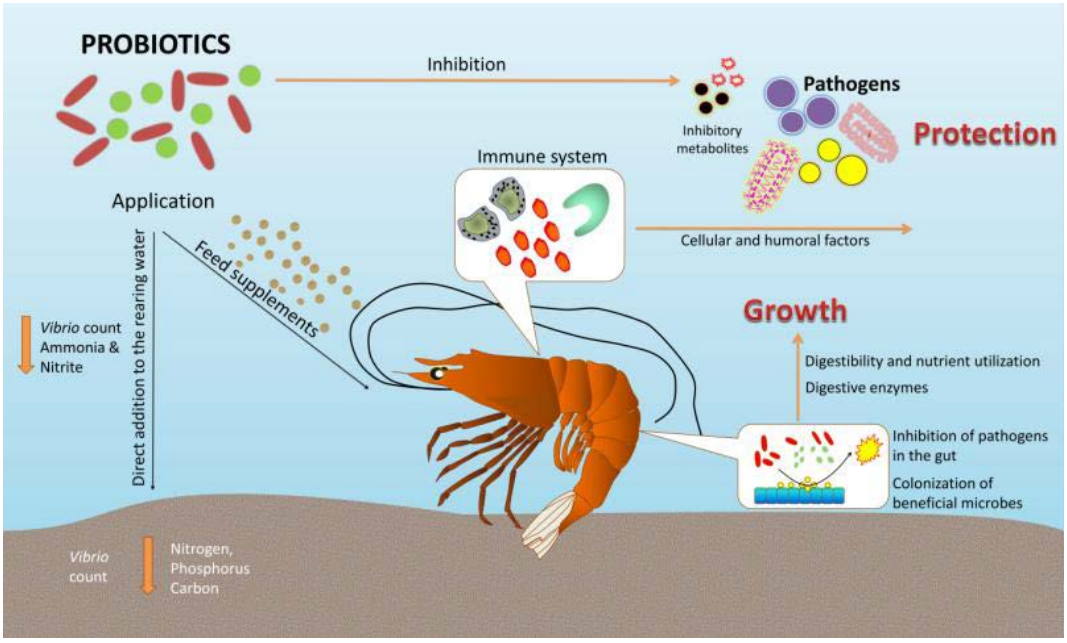


Figura 3. Mecanismo de acción desplegado por las bacterias probióticas (Lazado *et al.,* 2015).

2.6.1 Producción de compuestos inhibitorios

Los probióticos compiten con los patógenos o los desplazan mediante la producción de ciertos compuestos inhibitorios que actúan antagónicamente contra ellos y por lo tanto, evitan su proliferación en el hospedero (Tinh *et al.,* 2007). La actividad de un probiótico contra diversos agentes patógenos puede ser debida a la producción de antibióticos (Williams y Vickers, 1986), bacteriocinas (Panigrahi y Azad, 2007; Tinh *et al.,* 2007;), y sustancias activas como sideróforos, lisozimas, proteasas y peróxido de hidrógeno.

2.6.2 Competencia por sitios de adhesión o exclusión competitiva

La competencia por sitios de adhesión sobre el mucus del tracto gastrointestinal y otras superficies de tejidos, es uno de los mecanismos que tienen los probióticos para prevenir su colonización por patógenos. La adhesión bacteriana a la superficie de un tejido determinado, es una etapa importante para la infección patógena, y por lo tanto, para que un probiótico ejerza su acción benéfica, debe competir con los patógenos por los sitios de adhesión, ejerciendo así un efecto de exclusión competitiva (Verschuere *et al.,* 2000).

2.6.3 Competencia por nutrientes

Una vez suministrados, los probióticos más competentes se establecen de manera temporal o permanente en el tracto gastrointestinal (TGI) del hospedero y constituyen según el caso, parte de su microbiota temporal o residente. La adhesión duradera o permanente de una cepa probiótica a la mucosa y células epiteliales del TGI y a otros tejidos, permite para mantener e incrementar sus efectos positivos en la salud, nutrición y bienestar del hospedero (Gatesoupe, 1999 y Farzanfar, 2006).

2.6.4 Modulación del sistema inmunológico

Las bacterias probióticas tienen una acción estimulante sobre el sistema inmunitario del hospedero, ya que actúan sobre las células implicadas tanto en la inmunidad natural o innata de los invertebrados como *A. franciscana*, como en la inmunidad adquirida y específica de los organismos superiores (vertebrados). La presencia en el organismo de microorganismos extraños desencadena diversas reacciones secuenciales de defensa y respuestas específicas como la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos, estimulando la respuesta defensiva ante virus, bacterias y parásitos que pudiesen provocar enfermedades al hospedero. Muchos probióticos han sido identificados por los mecanismos que activan con su acción inmunomoduladora, al mejorar la actividad fagocítica, el estallido respiratorio y la actividad superóxido dismutasa y peroxidasa, además de incrementar el número de leucocitos, linfocitos y eritrocitos en vertebrados. (Newaj-Fyzul *et al.,* 2014).

2.6.5 Mejoras en la calidad del agua

Las bacterias Gram positivas como *Bacillus* spp., estimulan el sistema inmune del hospedero y también actúan mejorando la calidad del agua mediante la conversión de materia orgánica en dióxido de carbono, mientras que las bacterias Gram negativas convierten una mayor proporción de materia orgánica en biomasa bacteriana o en limo (Nemutanzhela *et al.,* 2014).

2.7 Modos de administración de los probióticos

El modo más común para la administración de probióticos en acuicultura es mediante su incorporación a los piensos. Aunque existen otras formas de administración tales como su adición directa al agua de cultivo, el baño o inmersión del hospedero en un medio líquido que contenga a la cepa probiótica, la bioencapsulación en el alimento vivo (artemias y rotíferos), es uno de los métodos más utilizados en larvicultura, debido a que ofrece diversas ventajas y se emplea un menor volumen de agua de cultivo (Vine *et al*., 2006).

2.7.1 Bioencapsulación (*Artemia*)

Los sistemas intensivos empleados en la acuicultura marina para producir grandes cantidades de larvas de peces y crustáceos (larvicultura) son afectados frecuentemente por bacterias patógenas, dando lugar a altas tasas de mortalidad y originando grandes pérdidas económicas (Marques *et al*., 2006a). Las artemias (*A. franciscana* y *A. salina*) son consideradas como las principales presas vivas empleadas para el cultivo de larvas de muchas especies acuáticas (Lavens y Sorgeloos, 2000; Dhert *et al*., 2001). Sin embargo, varios autores han observado que estos organismos pueden transferir bacterias patógenas a las larvas, originando altos porcentajes de mortalidad durante esta etapa, de manera que es conveniente y recomendado su tratamiento previo (Vaseeharan y Ramasamy, 2003). A este respecto, *Artemia* spp. se puede incluso cultivar en condiciones gnotobióticas (axénicas) y utilizar como vector de probióticos en la especie diana (Marques *et al*., 2006a). Varias cepas de la especie *Aeromonas hydrophila* y diversas especies de los géneros *Vibrio*, *Moraxella*, *Kurthia*, *Cytophaga*, *Microbacterium* y *Exiguobacterium*, junto a levaduras, se han propuesto como probióticos con base en los resultados obtenidos en supervivencia y crecimiento de *A. franciscana* en presencia y ausencia de vibrios ictiopatógenos como *V. campbellii*, V. *proteolyticus* y V. *parahaemolyticus*, empleando cultivos gnotobióticos de artemia (Orozco-Medina *et al*., 2002; Marques *et al*., 2006b).

El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. con microalgas marinas, micropartículas y emulsiones ha sido empleado para mejorar su valor nutricional y aportar un mayor nivel de nutrientes a las larvas cultivadas (Dhert *et al*., 2001). El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. por medio de la bioencapsulación consiste en suministrarles como alimento una suspensión o emulsión de enriquecimiento, de manera que las células del probiótico se incorporen al TGI de la artemia (Dhert *et al*., 2001). De esta forma es como los microorganismos probióticos se pueden bioencapsular en artemias para su posterior administración como alimento vivo a las larvas de peces y crustáceos (Marques *et al*., 2006c).

2.7.2 Adición al agua de cultivo e inmersión

Los probióticos en acuicultura también se pueden adicionar directamente al agua de cultivo o sumergir a los organismos a tratar, en baños de suspensiones bacterianas durante un tiempo determinado (Verschuere *et al*., 2000). A este respecto, varios estudios han demostrado la eficacia de estas formas de administración para la aplicación de varios probióticos (Fjellheim *et al*., 2010 y García-Bernal *et al*., 2017a,b).

2.8 Principales microorganismos probióticos utilizados en acuicultura

Muchos microorganismos marinos, entre los que se incluyen bacterias, hongos y bacteriófagos (Park *et al.,* 2000) y levaduras (Tovar-Ramírez *et al*., 2017), son considerados como fuentes promisorias de sustancias bioactivas, de donde pueden derivarse sus propiedades probióticas. A continuación se describen los grupos más importantes y sus propiedades específicas.

2.8.1 Bacterias Gram positivas

De acuerdo a Villamil y Martínez-Silva (2009), la mayoría de los microorganismos probióticos propuestos para ser utilizados en la acuicultura son bacterias ácido lácticas (BAL), de las cuales los géneros más utilizados son *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Kongnum y Hongpattarakere (2012) aislaron *Lactobacillus plantarum*

del tracto digestivo del camarón *Litopenaeus vannamei* y evaluaron su crecimiento y supervivencia posterior a una infección con *Vibrio harveyi*, concluyendo que *L. plantarum* mejoró la supervivencia de los camarones. Por su parte, Vieira *et al.,* (2007) demostraron que con la adición de dos cepas de bacterias ácido lácticas en un cultivo del camarón *L. vannamei* se mejoró la supervivencia luego de haber infectado experimentalmente a los camarones con *Vibrio harveyi*.

Diversas bacterias Gram positivas aerobias formadoras de esporas como *Bacillus* spp., han sido evaluadas para determinar su potencial probiótico y se ha determinado que tienen la capacidad para mejorar la calidad del agua, al influir en la composición general de las poblaciones microbianas y reducir el número de patógenos en el entorno de las especies cultivadas (Cha *et al.,* 2013). Zokaeifar *et al.,* (2014) evaluaron dos cepas de *Bacillus subtilis* en el agua de cultivo del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* comprobando que proporcionan efectos beneficiosos al mejorar la calidad del agua de cultivo, e incrementar la resistencia del camarón a las enfermedades, con mayores rendimientos en crecimiento, actividad de las enzimas digestivas y respuesta inmune del hospedero.

2.8.2 Bacterias Gram negativas

Entre las principales bacterias Gram negativas que han sido evaluadas y propuestas como probióticos para uso en la acuicultura, se incluyen especies de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Roseobacter* y *Vibrio* (Nayak, 2010 y Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). De acuerdo con (Chythanya *et al.,* 2002) la cepa *Pseudomonas* I-2 produce compuestos inhibitorios contra vibrios patógenos de camarones como *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*. La suplementación de la dieta con *Pseudomonas aeruginosa* mejoró la inmunidad innata y la resistencia a enfermedades provocadas por *Aeromonas hydrophila* en el pez ciprínido *Labeo rohita* (Giri *et al.,* 2012).

2.8.3 Levaduras

La principal especie de levadura propuesta para su uso como probiótico en la acuicultura es *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en los últimos años está teniendo un gran interés el estudio de la especie *Debaromyces hansenii,* para su empleo en peces (Tovar-Ramírez *et al*., 2017).

Los principales efectos beneficiosos que se reportan con el uso de *S. cerevisiae* son una mejora en el crecimiento y la supervivencia, al igual que la estimulación del sistema inmune de los peces. La levadura *S. cerevisiae* posee efectos benéficos al aumentar el crecimiento, mejorar la utilización del alimento e incrementar la resistencia del pez payaso, *Amphiprion percula,* a enfermedades causadas por *Streptococcus* sp. (Gunasundari *et al.,* 2013).

2.9 Actinomicetos. Características generales

Los actinomicetos son microorganismos abundantes en el suelo, sin embargo se encuentran también en ambientes acuáticos, tanto dulces como marinos (Leiva *et al.,* 2004). Se caracterizan por presentar una actividad metabólica alta, y producir terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares que les confieren una gran capacidad para degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal. Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos; son bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados. El orden de los *Actinomycetales* comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20 al 60% de la población microbiana total del suelo (Ezziyyani *et al.,* 2004).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a las siguientes razones: (1) su pared celular está compuesta por péptidoglicanos, (2) el diámetro de sus hifas (0,5 a 2,0 µm) es inferior al de los hongos, (3) son sensibles a los antimicrobianos, pero (4) presentan resistencia a los antifúngicos y (5) la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia *et al.,* 2005). Se caracterizan por presentar un alto contenido de

guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 a 78% G+C. Estas bacterias son generalmente aerobias pero algunas son anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples o complejas, y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos (Leveau y Bouix, 2000).

2.10 Metabolitos producidos por actinomicetos marinos

Los productos naturales constituyen la fuente más propicia de obtención de antibióticos (Bull y Stach, 2007; Reen *et al.,* 2015). Hay aproximadamente 32 500 productos naturales obtenidos a partir de fuentes microbianas, incluyendo alrededor de 1 000 metabolitos derivados de microorganismos marinos (Singh y Pelaez, 2008; Romano *et al.,* 2016).

Los actinomicetos marinos son productores de varios antibióticos (Baltz, 2008) y se ha determinado que éstos son más efectivos en el tratamiento de las infecciones microbianas porque las bacterias terrestres no han desarrollado resistencia contra ellos (Donia y Hamman, 2003). Debido a la necesidad de buscar nuevos agentes antibacterianos, las actinobacterias constituyen una fuente por demás importante para la obtención de compuestos antimicrobianos con estructuras novedosas. Entre las actinobacterias, las especies del género *Streptomyces* producen alrededor de 7 600 compuestos bioactivos, aproximadamente el 80% del total de antibióticos disponibles actualmente en el mercado (Valli *et al.,* 2012). Hasta la fecha existen pocos estudios sobre la aplicación de actinomicetos como probióticos en la acuicultura (Das *et al.,* 2006; Kumar *et al.,* 2006; Lakshmi y Rosamma, 2008). La mayoría de los probióticos propuestos como agentes de control biológico en la acuicultura son bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, etc.), *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Verschuere *et al.,* 2000). Dhevendaran y Annie, (1999) realizaron un trabajo para evaluar especies marinas del género *Streptomyces* y demostraron que pueden producir antibióticos *in vitro*, que inhiben el crecimiento de *Vibrio* spp. en peces y crustáceos. You *et al.,* (2007)

recomendaron el uso de actinomicetos para prevenir las infecciones causadas por *Vibrio* spp.

Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

La cepa RL8 de *Streptomyces* sp. fue seleccionada a partir de estudios previos *in vitro* e *in vivo* (García-Bernal *et al.,* 2015, 2017a,b).

3.1 Actividad antimicrobiana de *Streptomyces* sp. RL8

Se determinó la actividad antagónica de la cepa RL8 frente a cuatro especies de *Vibrio*: *V. alginolyticus* CAIM 7, *V. parahaemolyticus* CAIM 170, *V. harveyi* CAIM 1792, *V. campbellii* CAIM 395 aplicando el método de difusión en agar (González *et al.,* 2005). Las cepas CAIM fueron obtenidas de la colección de Microorganismos de Importancia Acuática (C.A.I.M., siglas en inglés) pertenecientes al Centro de Investigación para la Nutrición y Desarrollo, Unidad Mazatlán para Acuicultura y Manejo Ambiental de México. Los microorganismos fueron cultivados en TSB (Caldo Tripticasa Soya) con 3% (p/v) de NaCl e incubadas a 30 ºC por 24 horas. El cultivo se centrifugó a 5 000 x *g* durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en una solución de NaCl al 3% (p/v). Se determinó la densidad óptica a 600 nm, la cual se ajustó a 1,0 para obtener una concentración de $1x10^9$ UFC mL^{-1}. A partir de la muestra con densidad de 1,0 se hicieron las diluciones requeridas para las pruebas de antagonismo. *Streptomyces* sp. RL8 se sembró en placas de (Agar Caseína Almidón) ACA y se incubó a 30 °C durante siete días. Las cepas de *Vibrio* spp*.* se sembraron en toda la superficie de las placas Petri con TSA (Agar Tripticasa Soya), suplementadas con cloruro de sodio al 3% (p/v), estableciendo una carga microbiana de $1x10^8$ UFC mL^{-1}. Seguidamente, se extrajeron muestras circulares en forma de disco (*plugs*) de 6 mm de las placas con actinomiceto y se colocaron en la superficie de las placas sembradas con vibrios, utilizando como control, *plugs* sin actinomicetos. La actividad antimicrobiana se evaluó y se expresó tomando como referencia el diámetro del halo de inhibición (mm), alrededor de cada *plug*, el cual se midió a las 48 horas de incubación a 35 ºC.

3.2 Obtención y eclosión de los quistes de *Artemia franciscana*

Se utilizaron quistes de *Artemia franciscana* libres de bacterias (Gran Lago Salado, INVE Aquaculture Artemia Systems, Baasrode, Bélgica). Para obtener quistes estériles y posteriormente nauplios estériles, los quistes de *Artemia* se hidrataron y decapsularon siguiendo la metodología descrita por Baruah *et al.,* 2010. En primer lugar, se hidrataron 60 mg de quistes de eclosión de alta calidad de *Artemia* en 9 mL de agua destilada durante 1 h con aireación. Posteriormente se adicionó 330 µL de NaOH (30%, v/v) y 5 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl; 14%, v/v) a la suspensión de quistes hidratados, durante la reacción, se proporcionó aireación filtrada de 0,22 µm. La des-encapsulación se detuvo después de 2 minutos añadiendo 5 mL de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$, 10 g L^{-1}), y los quistes des-encapsulados se lavaron con agua de mar artificial estéril (AMA) (según MacLeod, 1968: NaCl 400 mM, KCl 20 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 100 mM, y $CaCl_2.2H_2O$ 20 mM, previamente disueltos en este orden y mezclados, se ajustó el pH a 7.8 con HCl 1 M). Finalmente, los quistes se re-suspendieron en un tubo falcon de 50 mL que contenía 30 mL de AMA y se incubaron a 28 °C durante 28 h con aireación e iluminación constante (2000 lux aproximadamente) para permitir que los nauplios emergidos alcanzaran la etapa II en la que ya pueden ingerir alimento.

3.3 Cepas probiótica y patógena utilizadas en el estudio

La cepa RL8 se cultivó en Caldo Triptona Soya (TSB) con 3% (p/v) de NaCl, y se incubó con agitación a 30 °C durante siete días. Después del tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 4 696 x *g* a 4 °C durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con agua de mar estéril. Luego se re-suspendió en agua de mar estéril y se midió la densidad óptica equivalente a 600 nm (Gopalakrishnan *et al.,* 2013). La concentración utilizada en los ensayos fue de 1 x 10^6 y 1 x 10^8 UFC mL^{-1}; las mismas fueron seleccionadas según estudios realizados con este microorganismo por en ostiones y camarones (García-Bernal *et al*., 2017a,b). Se utilizó la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170, que fue cultivada en TSB a 35 °C por 24-48 horas. El cultivo se centrifugó a 4 696 x *g* a

4 °C durante 10 minutos; el *pellet* fue re-suspendido en solución salina al 3% (p/v) y la densidad bacteriana se ajustó a 1,0 para obtener una densidad final de 1 x 10^9 UFC mL^{-1}

3.4 Diseño experimental de la investigación

3.4.1 Bioensayo de bioencapsulación de RL8 en *Artemia franciscana*

Para el bioensayo se utilizaron nauplios de *A. franciscana* en estado larvario II a razón de 30 nauplios en tubos de 50 mL, con un volumen operativo de 30 mL de AME con aireación filtrada constante. Se estableció un diseño experimental con tres tratamientos y tres réplicas cada uno: Tratamiento T1, RL8 (*Streptomyces* sp. RL8, con una concentración de 1 x 10^6 UFC mL^{-1}); Tratamiento T2, RL8 (*Streptomyces* sp. RL8, con una concentración de 1 x 10^8 UFC mL^{-1}); Tratamiento T3, grupo Control (sin bacteria añadida, alimentado con extracto de levadura 0.2 g L^{-1}). El alimento de enriquecimiento se administró en una dosis única. Se cuantificó la supervivencia de los nauplios II, a las 24 h.

3.4.2 Evaluación microbiológica de la cepa RL8

Se realizó el recuento de actinomicetos en los nauplios de *Artemia* a los 30 minutos, 2, 4, 6, 8 y 24 horas después de la adición de la cepa RL8. Para ello se tomaron muestras de los nauplios de los grupos tratados (T1, T2) y del grupo control (T3), los cuales fueron enjuagados con solución salina estéril y lavados con cloruro de benzalconio al 1% (Gatesoupe, 1999) y luego se enjuagaron nuevamente con solución salina estéril para asegurar que se eliminaran todas las actinobacterias ubicadas en el exterior del nauplio. Lo anterior con el propósito de conservar únicamente el probiótico ingerido y por lo tanto bioencapsulado por los nauplios, asumiendo la presencia temporal o permanente del actinomiceto RL8 en el tracto gastrointestinal (TGI) de los nauplios utilizados como vehículo para la bioencapsulación del probiótico. Las muestras se homogenizaron en 1 mL de solución salina fisiológica, se realizaron diluciones decimales, y finalmente se

extendieron 100 µL sobre placas de ACA y estas se incubaron a 30 °C durante 7 días.

3.4.3 Reto de *Artemia franciscana* con *Vibrio parahaemolyticus*

Después de la bioencapsulación del probiótico (*Streptomyces* sp. RL8) en los nauplios de *A. franciscana* (24 horas), se procedió a realizar el reto frente al patógeno. Para ello se aplicó al agua de cultivo, *V. parahaemolyticus* CAIM-170 a diferentes concentraciones ($1x10^5$ y $1x10^7$ UFC mL^{-1}) de acuerdo con Austin *et al.,* (1995). El reto de los nauplios, fue realizado en tubos falcon de 50 mL con 20 mL de AME y una densidad de 5 nauplios mL^{-1}, por triplicado y con aireación filtrada continua. La supervivencia se registró por muestreo de los nauplios a las 24 y a las 48 horas de desafío.

3.4.4 Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado. Antes de aplicar el ANOVA se procedió a verificar la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y para la homogeneidad de la varianza se utilizó la prueba de Levene (Sokal y Rohlf, 1995). La transformación arcoseno √% se realizó para el porcentaje de supervivencia y log x para los resultados del conteo; antes de aplicar ANOVA. Para todos los análisis efectuados, el nivel de significación fue de $P<0,05$. Los análisis estadísticos se

Resultados y discusión

4. Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana de Streptomyces sp. RL8

La cepa RL8 mostró actividad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos del género *Vibrio* que afectan a organismos de interés acuícola comercial (tabla 1, figura 4). La vibriosis es una enfermedad importante que afecta la acuicultura del camarón, y como su nombre lo indica, es causada por diferentes especies de *Vibrio*, en particular *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Austin y Zhang, 2006). Existen algunas referencias sobre el uso de actinobacterias de sedimentos marinos para contrarrestar la acción nociva de patógenos de camarón, particularmente cepas de *Vibrio* spp. (You *et al*., 2005).

En nuestra investigación, la mejor actividad de la cepa RL8 se obtuvo frente a *V. parahaemolyticus* (Cepa CAIM 170 www.ciad.mx), mostrando un halo de inhibición con un diámetro de 14 mm. El género *Streptomyces* ha sido ampliamente reconocido debido a su potencial en la producción de metabolitos secundarios (Lee *et al*., 2014; Ser *et al*., 2015 y Tan *et al*., 2015) incluyendo antibióticos (Lee *et al*., 2014), agentes anticancerígenos, antiparasitarios y enzimas (Manivasang *et al*., 2013). Existe evidencia científica de que la actividad de la cepa RL8 puede estar asociada a la producción de dos nuevos compuestos con capacidad antibiótica, como Lunalipin A y Lunalipin B; dos xantonas hexacíclicas estrechamente relacionadas con lysolipin y xantholipin (García-Bernal, 2016). De acuerdo con esta autora, el compuesto Lunalipin B, mostró una fuerte actividad frente a diferentes especies patógenas de *Vibrio*, las cuales producen enfermedades en peces, moluscos y crustáceos.

Nuestros resultados coinciden con Ngo *et al.*, (2016), quienes demostraron que la cepa de *Streptomyces* sp. A8 aislada de sedimento de un estanque camaronícola, mostró una alta actividad contra la cepa V6 del patógeno *V. parahaemolyticus*. Estos autores demostraron también que esa cepa de actinobacteria (A8) produce compuestos inhibidores y tiene además la capacidad de degradar compuestos

orgánicos mediante la producción de enzimas extracelulares. Por otro lado, en un estudio realizado por Sahu *et al*., (2007), estos autores dieron a conocer que la cepa de actinomiceto marino MKS-24 fue muy activa contra tres cepas altamente patogénicas para el camarón, como *V. alginolytics*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. En otro estudio You *et al.*, (2005) demostraron que el 51.1% de las cepas de actinomicetos aisladas de sedimentos marinos de una granja camaronícola mostraron actividad antagónica contra *Vibrio* spp. Las referencias favorables a los actinomicetos confirman los resultados obtenidos durante el presente estudio, con la cepa RL8 aislada de sedimentos marinos de Cuba. Thirumurugan y Vijayakumar (2013) reportaron que de un total de 82 actinobacterias aisladas de suelo marino, solo el 26% presentaron actividad antibacteriana *in vitro* frente a *V. alginolyticus, V. parahaemolyticus* y *V. cholerae,* mostrando halos de inhibición con un diámetro máximo de 17 mm frente a *V. alginolyticus*.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de la cepa RL8 aislada de sedimentos marinos de Cuba, frente a cepas patogénicas de *Vibrio spp*. (Colección CAIM-CIAD-MX)

Cepa	***V. a.***			***V. p.***			***V. h.***			***V. c.***		
	M	DE	CV	M	DE	CV	M	DE	CV	M	DE	CV
RL8	8,33	0,57	6,9	14	0	0	12,33	0,57	4,6	9,66	0,57	5,9

Leyenda:

- M: media (mm), DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación (%).
- *V. a*.: *V. alginolyticus* CAIM 7, *V. p*.: *V. parahaemolyticus* CAIM 170, *V. h*.: V*. harveyi* CAIM 1792, *V. c*.: *V. campbellii* CAIM 395.

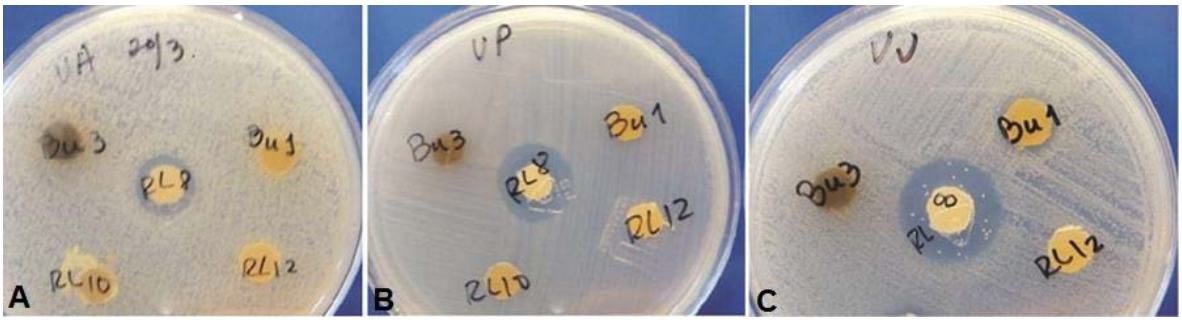


Figura 4. Actividad antagonista de la cepa *Streptomyces* sp. RL8. Halos de inhibición frente a cepas patogénicas de *Vibrio spp*. (Colección CAIM-CIAD-MX).

Bioencapsulación de RL8 en Artemia franciscana

La artemia puede ingerir partículas pequeñas con un tamaño que varía de 1 a 50 µm después de que la boca está abierta. Por lo tanto, es posible que las bacterias se puedan utilizar como fuente de alimentación directa en lugar de levadura, microalgas y productos de desecho de la industria alimentaria (Soltanian, 2007). Sin embargo, es esencial conocer los aspectos relativos a la bioseguridad de cada cepa potencialmente nutricional; o sea, asegurarse de que no sea patógena para el huésped y además, que tenga la capacidad para sobrevivir en su tracto gastro-intestinal (TGI), lo cual implica, por ejemplo, que sea resistente a las sales biliares, a los bajos niveles de pH y a las proteasas presentes en el TGI (Balcázar *et al*., 2006) Uno de los requisitos que debe cumplir una cepa probiótica es que no presente toxicidad para el huésped y para el medio ambiente (Kesarcodi-Watson *et al*., 2008; Tinh *et al*., 2008. García-Bernal *et al.*, (2018) demostraron que altas concentraciones de *Streptomyces* spp. RL8 no produjeron mortalidad en *A. salina* ni en postlarvas de *L. vannamei*, y concluyeron que este microorganismo es seguro para su aplicación como probiótico en camarones peneidos.

En el presente estudio, los nauplios de *A. franciscana* se enriquecieron con *Streptomyces* sp. RL8 a dos concentraciones diferentes (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) durante 24 h. El enriquecimiento de nauplios de *A. franciscana* con la cepa RL8 mostró su capacidad probiótica al propiciar un aumento en la supervivencia de las

artemias tratadas (enriquecidas), en comparación con las del cultivo control que no recibieron la cepa probiótica. A las 24 horas después de haber suministrado la biomasa correspondiente del probiótico (RL8), los grupos de *A. franciscana* enriquecidos a una concentración de 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1} mostraron una supervivencia significativamente superior (88.75% y 86.25%, respectivamente) con respecto al grupo control no enriquecido (57.5%). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en el porcentaje de supervivencia en los grupos tratados con RL8 a 10^6 y 10^8 UFC/mL^{-1} (figura 5); o sea que la carga del microorganismo no influyó en la supervivencia final de la artemia tratada.

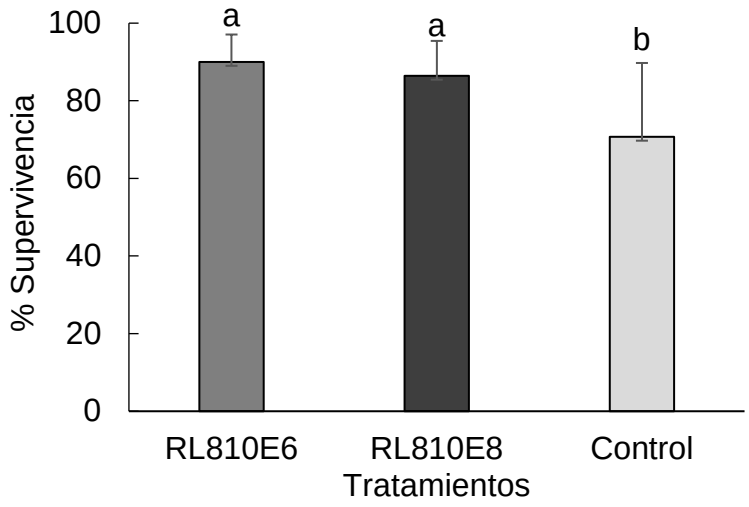


Figura 5. Supervivencia de nauplios de *Artemia,* 24 horas después de su enriquecimiento con la cepa *Streptomyces* sp. RL8 a diferentes concentraciones. [a,b] Columnas con letras diferentes difieren para (P<0,05) (Tukey, 1949).

Jasmin *et al*., (2016) comprobaron que la administración de probióticos en *Artemia* incrementó la supervivencia de estos organismos comparados con el grupo control sin probióticos. A diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación, estos autores demostraron que la supervivencia fue dependiente de la concentración de probiótico utilizada.

Muchos científicos (Makridis *et al*., 2000 y Roque *et al*., 2000) han sugerido que los nauplios de *A. franciscana* tienen una capacidad máxima para la bioencapsulación (ingestión) de células bacterianas y que ésta varía de 10^2 a 10^4 UFC nauplio^{-1}, y que esa capacidad es independiente de la densidad bacteriana a la que dichos nauplios hayan sido expuestos (10^6 a 10^8 UFC mL $^{-1}$). Sin embargo, esos mismos autores mencionan que dichos resultados varían en dependencia de la cepa bacteriana empleada, lo cual confirma el resultado obtenido en *A. franciscana*, específicamente con la cepa RL8.

En un estudio realizado por Das *et al*., (2010), demostraron que *Streptomyces* podría administrarse a organismos diana a través de su bioencapsulación en un agente intermedio o vector biológico como *Artemia* spp., y aprovechar de esta manera los beneficios probióticos de *Streptomyces* en algunas especies de interés para la acuicultura. Si se considera que el probiótico tiene también una acción favorable sobre el vector utilizado, es razonable asumir que la artemia enriquecida será más vigorosa y saludable, con lo cual se pueden incrementar los beneficios esperados en diversas especies acuícolas, que regularmente son alimentadas con nauplios enriquecidos de este microcrustáceo, durante sus primeros estadios de vida.

Un ejemplo de esto es la aplicación de probióticos como *Pseudoalteromonas* sp. en larvas de *Solea lalandi*, utilizando vectores vivos como microalgas, rotíferos y *Artemia* sp. La utilización de vectores parece ser una buena alternativa para introducir probióticos con el alimento vivo, ya que esto permite a la cepa probiótica desarrollar su actividad benéfica de manera más eficiente. En ese mismo contexto, otros autores han demostrado que la bioencapsulación de probióticos en alimento vivo (vector), como *Artemia* y rotíferos es efectiva en la administración de los probióticos al tracto digestivo de los organismos marinos (Gatesoupe, 2002 y Suzer *et al*., 2008).

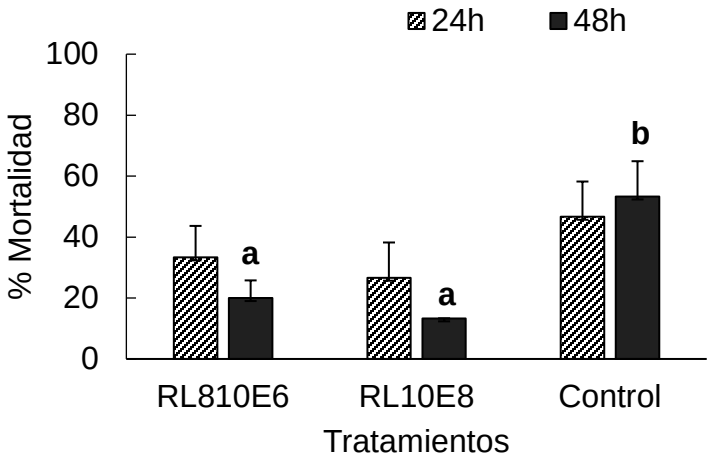
Reto de A. franciscana frente a Vibrio parahaemolyticus

Cuando los nauplios de *A. franciscana* fueron retados con *V. parahaemolyticus* a una concentración de 10^5 UFC mL^{-1}, se registró alta mortalidad en el grupo control (46,66% después de 24 horas y 53,33% después de 48 horas). Por el contrario, en los grupos tratados con RL8 a 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}, y retados con igual concentración del patógeno (10^5 UFC mL^{-1}), la mortalidad fue menor después de 24 horas (33,33% y 26,66%, respectivamente) y también fue menor a las 48 horas después del reto (20% y 13,33%, respectivamente). Cuando la carga de *Vibrio* aplicada durante el reto se incrementó a 10^7 UFC mL^{-1}, la mortalidad del grupo control a las 24 y 48 horas fue de 56,66% y 43,33%, respectivamente. Tal como se esperaba, la mortalidad fue menor en los grupos tratados con RL8 y retados con la misma concentración del patógeno (10^7 UFC mL^{-1}). A las 24 horas, la mortalidad fue de 33,33% y a las 48 horas en el grupo tratado con RL8 a 10^6 UFC mL^{-1}, mientras que la mortalidad fue de 26,66% y de 13,33% a las 24 y 48 horas respectivamente, en los grupos tratados con una concentración de 10^8 UFC mL^{-1} de RL8. En las figuras 6 A y B se muestran gráficamente estos resultados.

Estos resultados indican que la cepa de *Streptomyces* sp. RL8 fue capaz de conferir protección a los nauplios de *Artemia* durante el reto con *V. parahaemolyticus*. Este hallazgo puede ser explicado por la capacidad antagonista de la cepa RL8 para inhibir bacterias patógenas del género *Vibrio* (García-Bernal *et al.*, 2015). Quiróz-Gusmán *et al.*, (2018) probaron un consorcio bacteriano en quistes y larvas de *Artemia* y demostraron que su efecto fue dependiente de la concentración de estos microorganismos. Verschuere *et al.*, (2000) reportaron una tasa de supervivencia más alta en *Artemia* (aproximadamente 80%), cuando los mismos fueron retados con el patógeno *V. proteolyticus*, pero antes de eso se protegieron mediante una colonización preventiva con cepas probióticas (*Aeromonas* spp. y *Vibrio alginolyticus*), con respecto al grupo control sin probióticos cuya supervivencia fue menor. Marques *et al*., (2006b) reportaron una supervivencia del 95% en *Artemia* protegida con *Bacillus* sp. 72 horas después de haber sido retadas con *V. proteolyticus*. Patra y Mohamed (2003) encontraron un 91% de supervivencia

cuando los nauplios de *Artemia* fueron protegidos mediante tratamiento preventivo o enriquecimiento previo con la levadura *Saccharomyces boulardii* y luego retados con *V. harveyi*.

(A) *V. parahaemolyticus* 10^5 UFC mL^{-1}



(B) *V. parahaemolyticus* 10^7 UFC mL^{-1}

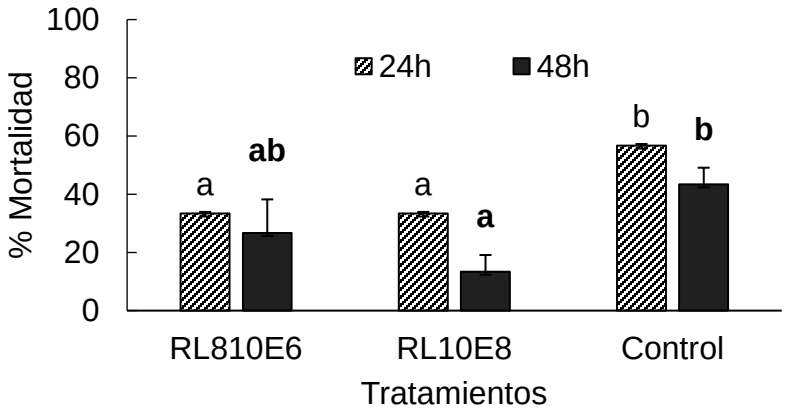


Figura 6. Mortalidad de nauplios de *A. franciscana* enriquecidos con *Streptomyces* sp. RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) después del reto con *V. parahaemolyticus* (10^5 y 10^7 UFC mL^{-1}). [a,b] Columnas con letras diferentes difieren para ($P<0,05$) (Tukey, 1949).

La adhesión a las superficies de la mucosa del TGI se considera un requisito para la colonización intestinal del hospedero, no solo por cepas bacterianas probióticas sino también por los patógenos (Collado *et al*., 2007). Al respecto, en un estudio de metagenómica realizado por García-Bernal *et al*., (2017b) en ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*, estos autores comprobaron que la cepa de *Streptomyces* sp. RL8 fue capaz de adherirse y establecerse en el tracto gastrointestinal y/o en otros tejidos del molusco, pasando a formar parte de su microbiota residente, manteniendo al mismo tiempo, una elevada diversidad de actinobacterias. Con base en éste y en otros antecedentes, como la tesis doctoral de García-Bernal (2016), es posible asumir que las propiedades adhesivas de la cepa RL8 podrían haber contribuido a una rápida colonización en el TGI y en otros tejidos de los nauplios de *A. franciscana*. Esto explicaría los efectos protectores observados cuando los nauplios enriquecidos con RL8 se convirtieron en vectores bioencapsulantes del actinomiceto probiótico, y posterior a este proceso fueron retados con la cepa patógena CAIM 170 de *V. parahaemolyticus*.

Adicionalmente, se sabe que el género *Streptomyces* tiene la capacidad de formar esporas y que estas formas de resistencia a condiciones extremas, pueden ser una alternativa más práctica para producir, almacenar y administrar la cepa RL8 al vector bioencapsulante elegido, en este caso, la artemia *A. franciscana*. Procediendo de esta manera, los organismos diana pueden ingerir de manera indirecta, las esporas de RL8 bioencapsuladas en el TGI y/o en otros tejidos del vector *Artemia*. Se considera que la bioencapsulación de RL8 en nauplios de *Artemia* como un vector, es una buena estrategia para el uso de probióticos en la acuicultura.

<u>Evaluación microbiológica de la cepa RL8</u>

La colonización de *Artemia* por la cepa bacteriana se cuantificó a las 24 horas después de la inoculación de RL8 (10^6 y 10^8 UFC mL^{-1}) en el de agua de cultivo del microcrustáceo. Los resultados del conteo de actinomicetos son mostrados en la Tabla 2. La colonización bacteriana de *Artemia* puede ocurrir externamente a través de la unión a la superficie del cuerpo o internamente por ingestión de biomasa o esporas y la posterior adhesión y colonización del probiótico en el TGI del hospedero (Gomez-Gil *et al*., 1998). La cepa RL8 a 10^8 UFC mL-1 ofreció una mayor protección a los nauplios de Artemia y además mostró una mayor capacidad de colonización (3,4 UFC $nauplio^{-1}$). En este estudio se ha demostrado que la colonización preventiva del TGI con la cepa RL8, podría incluso evitar la proliferación de *V. parahaemolyticus* en el cultivo de nauplios de *Artemia*. Al hacer esto, es totalmente razonable asumir que la artemia enriquecida con RL8 será más vigorosa y más saludable, con lo cual se habrá convertido en un alimento de mayor calidad nutricional para diversas especies acuícolas, además de ser portadora de un agente bacteriano para el control biológico de las infecciones.

Tabla 2. Bioencapsulación de *Streptomyces* sp. RL8 en nauplios de *A. franciscana*, a las 24 horas de exposición.

Cepa (UFC mL^{-1})	**UFC $nauplio^{-1}$**
RL8 10^6	1,2
RL8 10^8	3,4

Como los nauplios de A. *franciscana* son transparentes, la ingestión de la biomasa del probiótico (RL8) y su presencia en el intestino, se pudo detectar asociado a una coloración carmelita en el intestino de los nauplios, mediante su observación bajo el microscopio óptico con objetivo 10X (figuras 2 A, B y C).

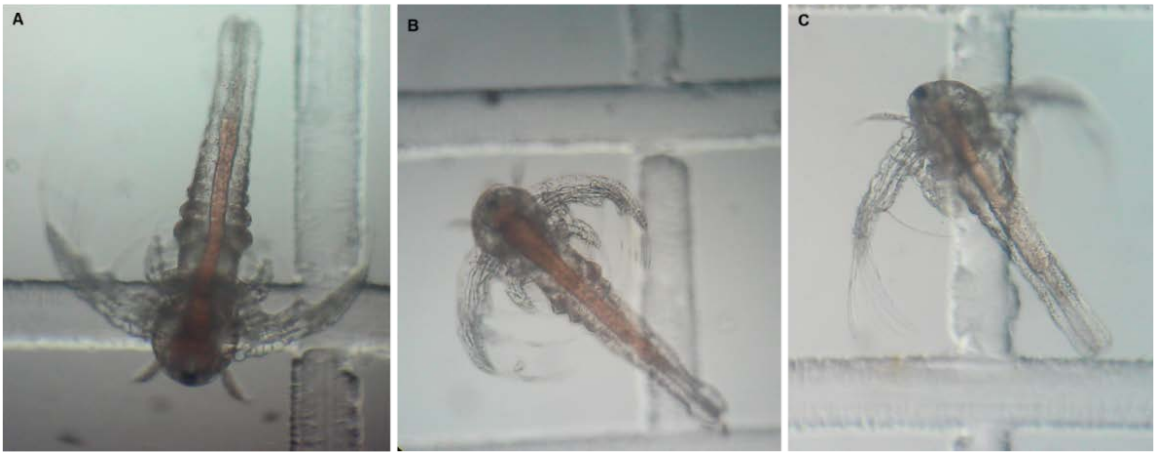


Figura 7. Imágenes de microscopía óptica de nauplios de *A. franciscana*. (A) Nauplio de *A. franciscana* 24 horas después del suministro de 10^6 UFC mL^{-1} de *Streptomyces* sp. RL8; (B) Nauplio de *A. franciscana* 24 horas después del suministro de 10^8 UFC mL^{-1} de *Streptomyces* sp. RL8; (C) Nauplio del grupo Control, sin suministro del probiótico RL8.

Como se puede observar en los nauplios del grupo control (figura 2C) el tracto digestivo estaba vacío y en los grupos alimentados con probiótico después de 24 horas (figuras 2A y B) el intestino comenzó a llenarse y a dejar de ser transparente. Vázquez-Silva *et al*., (2016) obtuvieron resultados similares en metanauplios de *Artemia* alimentados con *Lactobacillus johnsonii* y *Bifidobacterium animalis*, a una concentración de 2 x 10^3 UFC mL^{-1}.

Conclusiones

5. Conclusiones

1. La cepa probiótica RL8 (*Streptomyces* sp.) presentó la mayor actividad *in vitro* frente a la cepa patógena *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 170), y en menor grado, frente a la cepa patógena *V. harveyi* (CAIM 1792).
2. Es técnicamente posible la bioencapsulación de *Streptomyces* sp. RL8 en nauplios de *Artemia franciscana*.
3. La bioencapsulación de RL8 produjo un efecto protector en el agente vector utilizado (nauplios de *A. franciscana*), durante el reto ante el patógeno *V. parahaemolyticus* CAIM 170.
4. *A. franciscana* podría ser un vector bioencapsulante, adecuado para suministrar la cepa probiótica RL8 (*Streptomyces* sp.) a larvas de camarones y peces de interés acuícola comercial.

Recomendaciones

6. Recomendaciones

1. Estudiar, comprender y definir con mayor precisión y detalle, el modo de acción, la relación dosis-respuesta y la duración del efecto probiótico después de la ingesta del mismo, (**1-a**) por el agente vector bioencapsulante *A. franciscana* y (**1-b**) por larvas de camarones y/o de peces de interés acuícola comercial, alimentadas con la cepa probiótica RL8 bioencapsulada en nauplios de *A. franciscana*.
2. Definir el tiempo óptimo para el enriquecimiento de *A. franciscana* con la cepa RL8 de *Streptomyces* sp., determinando su viabilidad, a partir de que la artemia ha sido enriquecida, suministrada, ingerida, digerida y asimilada por larvas de camarones y/o de peces de interés acuícola comercial.

Referencias bibliográficas

7. Referencias bibliográficas

Akbar, I.; Radhakrishnan, D. K.; Venkatachalam, R.; Sathrajith, A. T. y Sureshkumar, S. (2014). Standardization of the bioencapsulation of probiotics and oil emulsion in Artemia parthenogenetica*. Int. J. Fish. Aquac*. 4(3): 122-125.

Aruvalsu C.; Shobana S.; Banu H.; Chandhirasekar D. y Prabhu D. (2012) Bioencapsulation of *Artemia nauplii* with herbal extract for promoting growth of fish fry *Poecilia sphenops* Val. *J. Modern Biotechnol* (1): 37-44.

Asem, A.; N. Rastegar-Pouyani, P.; De Los Rios, R.; Manaffar, F. y Mohebbi. (2010). Biometrical comparison of *Artemia urmiana* Günther, 1899 (Crustacea: Anostraca) cysts between rainy and drought years (1994-2003/4) from Urmia Lake, Iran. *Int. J. Biol. Sci.* 6(2):100-106.

Augustine, D.; Jacob, J. C. y Philip, R. (2016). Exclusion of *Vibrio* spp. by an antagonistic marine actinomycete *Streptomyces rubrolavendulae* M56. *Aquacult. Res.* 47(9): 2951-2960.

Austin B. y Zhang XH. Vibrio harveyi: a signifi cant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol* . (43): 119-124, 2006.

Austin, B.; Stuckey, L.; Robertson, P.; Effendi, I. y Griffith, D. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish. Dis*. (18): 93-96.

Balcázar, J. L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D. y Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol*. 114(3-4): 173-186.

Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol*. (8): 557-563.

Baruah, K.; Ranjan, J. K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2010). Efficacy of homologous and heterologous heat shock protein 70s as protective agents to gnotobiotic *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. *Fish. Shellfish. Immunol*. (29): 733–739.

Bull, A. T. & Stach, J. E. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol*. (15): 491-499.

Castro, J.; T. Castro, J.; Sánchez, G.; Castro, A.; Castro, J.; Zaragoza, R.; de Lara M. y Monroy. (2006). Cysts and nauplii biometry characteristics of seven *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) populations from Mexico*. Rev. biol. mar. oceanogr.* 41(2): 187-193.

Cha, J. H.; Rahimnejad, S.; Yang, S. Y.; Kim, K. W. y Lee, K. J. (2013). Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquacult.* (402): 50-57.

Chythanya, R.; Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2002). Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquacult.* (208): 1-10.

Collado, M. C.; Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods*. 71(1): 71-74.

Cruz, P.; Ibañez, A.; Hermosillo, O. A. y Saad, H. C. R. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol*. Vol. 2012.

Das, S.; Lyla, P. S. y Khan, S. A. (2008). Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chin. J. Oceanol. Limnol*. (26): 166- 77.

Das, S.; Lyla, P. y Ajmal Khan, S. (2006). Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Israeli. J. Aquacult. – Bamid*. (58): 198-204.

Das, S.; Ward, L. R. y Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. For potential use as probiotics in aquaculture. *Aquacult.* (305): 32-41.

Dhert, P.H.; Rombaut, G.; Suantika, G. y Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquacult*. (200): 129–146.

Dhevendaran, K. y Annie, M. K. (1999). Antibiotic and L. asparaginase activity of *Streptomyces* sp. isolated from fish, shell fish and sediment of Veli estuarine Lake along the Kerala coast. *Indian. J. Mar. Sci*. (28): 335-337.

Donia, M. y Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis*. (3): 338-348.

Ezziyyani, M.; Sánchez, C. P.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces Rochei* -Ziyani, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum L*.) causada por *Phytophthora capsici*. *An. Biol*. (26): 69-78.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria in food.

Cordoba, Argentina. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf [Citado 2018 Octubre 4]

Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol. *Med Microbiol*. (48): 149-158.

Fjellheim, A.J.; Klinkenberg, J.; Skjermo, I.M.; Aasen, G. y Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol*. (144): 153-159.

Fjellheim, A.J.; Klinkenberg, G.; Skjermo, J.; Aasen, I.M. y Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (Gadus morhua L.) larvae. *Vet. Microbiol*. (144): 153–159.

Fuller, R. (1989). A review: probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*. (66): 365-378.

Gajardo, G. M. y Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp Artemia: adapted to critical life conditions. *Front Physiol.* (*3)*: 185.

García-Bernal, M. (2016). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

García-Bernal, M.; Campa-Córdova, Á. I.; Saucedo, P. E.; González, M. C.; Marrero, R. M. y Mazón-Suástegui, J. M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Vet World. 8*(2): 170.

García-Bernal, M.; Marrero, R. M.; Campa-Córdova, Á. I. y Mazón-Suástegui, J. M. (2017a). Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with

Bacillus and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Int. 25*(2): 927-939.

García-Bernal, M.; Medina-Marrero, R.; Rodríguez-Jaramillo, C.; Marrero-Chang, O.; Campa-Córdova, Á. I.; Medina-García, R. y Mazón-Suástegui, J. M. (2018). Probiotic effect of *Streptomyces* spp. on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquac Nutr.* 24(2): 865-871.

García-Bernal, M.; Trabal Fernández, N.; Saucedo Lastra, P. E.; Medina Marrero, R., y Mazón-Suástegui, J. M. (2017b). *Streptomyces* effect on the bacterial microbiota associated to *Crassostrea sikamea* oyster. *J. Appl. Microbiol. 122*(3): 601-614.

Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquacult.* (180):147–165.

Gatesoupe, F. J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, Pollachius pollachius. *Aquacult.* (212): 347–360.

Gildberg, A.; Mikkelsen, H.; Sandaker, E. y Ringo, E. (1997). Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, *352*(1-3), 279-285.: 279-285.

Giraffa, G.; Chanishvili, N. y Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res. Microbiol*. (161): 480-487.

Giri, S. S.; Sen, S. S. y Sukumaran, V. (2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, Labeo rohita. Fish Shellfish. *Immun*. (32): 1135-1140.

Gomez-Gil, B.; Herrera-Vega, M.; Abreu-Grobois, F. y Roque, A. (1998). Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol*. 64 (6): 2318–2322.

Gomez-Gil, B.; S. Soto-Rodríguez, A.; García-Gasca, A.; Roque, R.; Vázquez-Juárez, F.; Thompson, L. y Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. (150): 1769–1777.

González, I.; Ayuso-Sacido, A.; Anderson, A. y Genilloud, O. (2005). *Actinomycetes* isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol*. (54): 401-415.

Gopalakrishnan, S.; Ranga Rao, G.; Ratna Kumari, B.; Vijayabharathi, R.; Srinivas, V. y Gowda, C. (2013). Development of broad-spectrum *Actinomycetes* for biocontrol and plant growth promotion of food crops. Recent Advances in Biofertilizers and Biofungicides (PGPR) For Sustainable Agriculture. In: Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials Manila, Philippines.

Gunasundari, V.; Kumar, T. A.; Ghosh, S. y Kumaresan, S. (2013). An *ex vivo* loom to evaluate the brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in clownfish aquaculture with special reference to *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* (13): 389-395.

Herawati V. E.; Hutabarat J. y Radjasa O. K. (2014) Nutritional content of *Artemia* sp*.* Fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*. *Hayati* 21(4): 166-172. Disponible en : http://images.engormix.com/e_articles/European_finfish05.gif [citado 2018 Enero 23].

Jasmin, M. Y.; Wagaman, H.; Yin, T. A.; Ina-Salwany, M. Y.; Daud, H. M. y Karim, M. (2016). Screening and evaluation of local bacteria isolated from shellfish as potential probiotics against pathogenic *Vibrios*. *J. Environ. Biol.* 37(4 Spec No): 801-809.

Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M. J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquacult*. (274): 1–14.

Kongnum, K. y Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immun*. (32): 170-177.

Kumar, S. S.; Philip, R. y Achuthankutty, C. (2006). Antiviral property of marine actinomycetes against white spot syndrome virus in penaeid shrimps. *Current Science.* (91): 807-811.

Lakshmi, B.; Viswanath, B. y Sai Gopal, D. V. (2013). Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *J. Pathog*: 123 - 424.

Lakshmi, N. y Rosamma, P. (2008). Marine Actinomycetes as source of antiviral agents and as probionts for Penaeus monodon culture systems. Thesis Cochin University of Science and Technology.

Langdon, C. (2003). Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquacult*. (227): 259-275.

Lavens, P. y Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquacult*. (181): 397–403.

Lazado, C. C.; Lacsamana, J. I. y Caipang, Ch. M. A. (2015). Mechanisms of probiotic actions in shrimp: Implications to tropical aquaculture. Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines. *Ed. Research Signpost, Kerala:* 89-114.

Lee, L. H.; Zainal, N.; Azman, A. S.; Eng, S. K.; Ab Mutalib, N. S.; Yin, W. F. y Chan, K. G. (2014). *Streptomyces pluripotens* sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 64(9): 3297-3306.

Leiva, S.; Yáñez, M.; Zaror, L.; Rodríguez, H. y García-Quintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetos aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. Med. Chile.* (132): 151-159.

Leveau, J. y Bouix, M. (2000). Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. *Ed. Acribia. S. A., Zaragoza*: 525.

Lightner, D. y Redman, R. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquacult*. (164): 201-220.

Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The World Aquaculture Society. Batoa. Rouge, Lousiana.

MacLeod, R. A. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. *Advances in Microbiology of the Sea*. Droop, M. R. y Jannasch, J., 1968; pp 95-126. ISBN 978-0-12-003001-9.

Makridis, P.; Fjellheim, A. J.; Skjermo, J. y Vadstein, O. (2000). Control of the bacterial flora of *Brachionis plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquacult*. (185): 207–218.

Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K. y Kim, S. K. (2013). Production, characterization and antioxidant potential of protease from *Streptomyces* sp. MAB18 using poultry wastes. BioMed research international.

Marques, A. F.; Ollevier, W.; Verstraete, P.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006a). Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *J. Appl. Microbiol*. (100): 903–918.

Marques, A. T.; Thanh, H.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006c). Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquacult*. (258): 116–126.

Marques, A.; Huynh, T.; Thanh, W.; Verstraete, J.; Dhont, P.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006b). Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (334): 20–30.

Mohebbi F.; Azari A. M.; Ahmadi R.; Seidgar M.; Mostafazadeh B.; Ganji S. (2015). The effects of *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis oculata* as food on the growth, survival and reproductive characteristics of *Artemia urmiana*. Environmental Resources Research. 3(2): 111-120.

Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish. Immun.* (29): 2-14.

Nemutanzhela, M. E.; Roets, Y.; Gardiner, N. y Lallo, R. (2014). The use and benefits of *Bacillus* based biological agents in aquaculture. En: Hernandez-Vergara, M. (ed.) Sustainable aquaculture techniques. Murcia, Spain.

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

Ngo, T. T. C.; Le, T. H. T. y Nguyen, H. T. A. (2016). Characterization of Actinomycetes Antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Shrimp

Pond Sediment. Earth and Environmental Sciences. *VNU Journal of Science*. 32(1): 1-9.

Nimrat S.; Suksawat S.; Boonthai T. y Vuthiphandchai V. (2012) Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Vet. Microbiol*. 159(3-4): 443-450.

Orozco-Medina, C.; Maeda-Martínez, A. M. y López-Cortés, V. (2002). Effect of aerobic Grampositive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquacult*, (213): 15–29.

Panigrahi, A. y Azad, I. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario*. Fish Physiol. Biochem.* (33): 429-440.

Park, S. C.; Shimamura, I.; Fukunaga, M.; Mori, K. I. y Nakai, T. (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida,* as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol*. (66): 1416-1422.

Patra, S. K. y Mohamed, K. S. (2003). Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquac. Int*. 11(5): 505-514.

Pérez-Sánchez, T.; Ruiz-Zarzuela, I.; Blas, I. y Balcázar, J. L. (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev. Aquacult*. (6): 133-146.

Persoone, G. y Sorgeloos, P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O. y Jaspers, E. The brine shrimp *Artemia*. (Eds.) *Universa Press. Wetteren. Belgium*: 3-21.

Quiroz-Guzmán, E.; Vázquez-Juárez, R.; Luna-González, A.; Balcázar, J. L.; Barajas-Sandoval, D. R. y Martínez-Díaz, S. F. (2018). Administration of Probiotics Improves the Brine Shrimp Production and Prevents Detrimental Effects of Pathogenic Vibrio Species. *Mar. Biotechnol.* 1-8.

Reen, J. F.; Gutiérrez-Barranquero, J. A.; Dobson, A. D.; Adams, C. y O'Gara, F. (2015). Emerging concepts promising new horizons for marine biodiscovery and synthetic biology. *Mar. Drugs.* (13): 2924-2954.

Rodríguez, L.; Livengood, E. J.; Miles, R. D.; Chapman, F. A. (2011). Uptake of metronidazole in *Artemia* at different developmental life stages. *J. Aquat. Anim. Health.* (23): 100-102.

Roiha, I. S.; Otterlei, E. y Samuelsen O. B. (2011). Evaluating bioencapsulation of florfenicol in rotifers (Brachionus plicatilis). *Aquacult*. (42): 1110-1116.

Romalde, J. L.; Diéguez, A. L.; Lasa, A. y Balboa, S. (2013). New Vibrio species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol*. (4): 131-141.

Romano, G.; Costantini, M.; Sansone, C.; Lauritano, C.; Ruocco, N. y Ianora, A. (2016). Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res*: 1-12.

Roque A.; Mazari A.; Gomez-Gil, B. (2000). Oral challenge of postlarvae of *Litopenaeus vannamei* through bioencapsulation of *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana*. *Cienc Mar*. (26): 65 –77.

Sahu, M. K.; Murugan, M.; Sivakumar, K.; Thangaradjou, T. y Kannan, L. (2007). Occurrence and distribution of actinomycetes in marine environs and their antagonistic activity against bacteria that is pathogenic to Shrimps. *Isr. J. Aquacult – Bamid.* (59): 155-161.

Salgado, I. (2001). La *Artemia* y su cultivo en el Perú. Universidad Nacional de Piura, Perú: 103.

Ser, H. L.; Zainal, N.; Palanisamy, U. D.; Goh, B. H.; Yin, W. F.; Chan, K. G. y Lee, L. H. (2015). *Streptomyces gilvigriseus* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from mangrove forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(6): 1369-1378.

Singh, S. B. y Pelaez, F. (2008). Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. *Prog. Drug Res*. (65): 141-174.

Smith, G. G.; Ritar, A. J. y Brown, M. R. (2004). Uptake and metabolism of a particulate form of ascorbic acid by *Artemia nauplii* and juveniles. *Aquac Nutr.* (10): 1-8.

Sokal, R. R. y Rohlf, F. (1995). Biometry (3d edn). New York: WH Feeman and Company: 98.

Soltanian, S. (2007). Protection of gnotobiotic artemia against *Vibrio campbellii* using baker's yeast strains and extracts (Doctoral dissertation, Ghent University).

Sorgeloos, P.; Coutteau, P.; Dhert, P.; Merchie, G. y Lavens; P. (1998). Use of brine shrimp Artemia sp. in larval crustacean nutrition: a review. *Fish Sci*. (6): 55-68.

Suzer, C.; Çoban, D.; Kamaci, H. O.; Saka, S.; Firat, K. y Otgucuoglu, Ö. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquacult*. (280): 140–145.

Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. y Zuberer, D. A. (2005). Principles and applications of soil microbiology. 2nd Ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Tan, L. T. H.; Ser, H. L.; Yin, W. F.; Chan, K. G.; Lee, L. H. y Goh, B. H. (2015). Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from Malaysia mangrove soil. *Front Microbiol*. (6): 1316.

Thirumurugan, D. y Vijayakumar, R. (2013). Antifungal activity of marine actinobacteria East Coast Regions (ECR) of Tamilnadu, South India. *Wide Spect. Res. J*. 1(9): 37-49.

Tinh, N. T. N.; Dierckens, K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2008). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* (10): 1–12.

Tinh, N. T. N.; Linh, N. D.; Wood, T. K.; Dierckens, K.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2007). Interference with the quorum sensing systems in a *Vibrio harveyi* strain alters the growth rate of gnotobiotically cultured rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. Appl. Microbiol*. (103): 194-203.

Touraki, M. y Niopas, I. (2012). Bioencapsulation and pharmacokinetic study of oxolinic acid in rotifers (*Brachionus plicatilis*), *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. *Aquacult*. (44): 701-712.

Touraki, M.; Mourelatos, S.; Karamanlidou, G.; Kalaitzopoulou, S.; Kastritsis, C. (1996). Bioencapsulation of chemotherapeutics in *Artemia* as a means of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry. *Aquacult. Eng*. (15): 133- 147.

Tovar-Ramírez, D.; Cruz-Suárez, L. E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Nieto-López, M. G.; Villarreal Cavazos, D. A.; Gamboa-Delgado, J.; López Acuña, L. M. y Galaviz-Espinoza, M. (2017). Enfoques transcriptómicos en el jurel *Seriola Rivoliana*. Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. pp: 389-406.

Tovar-Ramírez, D.; Teles, A.; Salas-Leiva, J. S.; Hernández-Contreras, A.; Asencio-Alcudia, G. G.; Le Du, J.; Burgoin-Cota, M.; Alvarez-González, C. A.; Llera-Herrera, R.; Gisbert, E.; Fernández, I.; Pérez-Urbiola, J. C.; Ibarra-Castro, L.; Mazón-Suástegui, J. M.; Núñez-Vázquez, E. J.; Guzmán-Villanueva, L. T. y Reyes-Becerril, M. (2017). Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. pp: 389-406.

Tukey, J. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*. 5: 99-114.

Valli, S.; Suvathi, S. S.; Aysha, O.; Nirmala, P.; Vinoth, K. P. y Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pac. J. Trop. Med*. (2): 469-473.

Vaseeharan, B. y Ramasamy P. (2003). Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol. Res.* (158): 299–308.

Vázquez-Silva, G.; Castro-Mejía. J. J.; Sánchez de la Concha, B.; González-Vázquez, R.; Mayorga-Reyes, L. y Azaola-Espinosa, A. (2016). Bioencapsulation of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus johnsonii* in *Artemia franciscana* as feed for charal (*Chirostoma jordani*) larvae. *Rev. Mex. Ing. Quím*. 15(3): 809-818.

Verschuere, L.; Rombaut, G.; Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*., (64): 655–671.

Vieira, F. D. N.; Pedrotti, F. S.; Buglione Neto, C. C.; Mouriño, J. L. P.; Beltrame, E.; Martins, M. L.; Ramirez, C. y Arana, L. A. V. (2007). Lactic-acid bacteria

increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz. J. Oceanogr*. (55): 251-255.

Villamil, L. y Mártínez-Silva, M. A. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. *Bol. Invest. Mar. Cost*. (38): 165-187.

Vine, N. G.; Leukes, W. D. y Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* (30): 404–427.

Wang, L.; Chen, Y.; Huang, H.; Huang, Z.; Chen, H. y Shao, Z. (2015). Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res*. (46): 395-404.

Widanarni, Y.; Nababan, I. y Yuhana, M. (2015). Growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae fed prebiotic and probiotic through *Artemia*. *Pak. J. Biotechnol*. 12(2):99 -104.

Widiastuti, R.; Hutabarat, J. y Herawati, V. E. (2012). Effect of different natural feeding (*Skeletonema costatum* dan *Chaetoceros gracilis*) on absolute biomass growth and nutritional content of local *Artemia* sp. *J. A. M. Tech.* 1(1):236-248.

Williams, S. y Vickers, J. 1986. The ecology of antibiotic production. *Microb. Ecol.* (12): 43-52.

You, J. L.; Cao, L. X.; Liu, G. F.; Zhou, S. N.; Tan, H. M. y Lin, Y. C. (2005). Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. from nearshore marine sediments. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21(5): 679-682.

You, J.; Xue, X.; Cao, L.; Lu, X.; Wang, J.; Zhang, L. y Zhou, S. (2007). Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (76): 1137-1144.

Zokaeifar, H.; Balcazar, J. L.; Saad, C. R.; Kamarudin, M. S.; Sijam, K.; Arshad, A. y Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. (33): 683–689.

Zokaeifar, H.; Babaei, N.; Saad, C. R.; Kamarudin, M. S.; Sijam, K. y Balcázar, J. L. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* (36): 68-74.