



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Evaluación de la actividad probiótica de aislados de bacterias ácido lácticas de
trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

TESIS

Que para obtener el título de Maestra en Ciencias Agropecuarias y Recursos
Naturales

PRESENTA:

IAI. Diana Priscila Rodríguez Villegas

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, junio 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Evaluación de la actividad probiótica de aislados de bacterias ácido lácticas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

TESIS

Que para obtener el título de Maestra en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

PRESENTA:

IAI. Diana Priscila Rodríguez Villegas

ÁREA DE INVESTIGACIÓN: Biotecnología

COMITÉ TUTORAL:

Dra. en CARN. Esvieta Tenorio Borroto

Dra. en C. Celene Salgado Miranda

Dr. en C. Alberto Barbabosa Pliego

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, junio 2021



ÍNDICE

DEDICATORIA	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABSTRACT.....	V
RESUMEN.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades de la Acuicultura en México	3
2.2 Generalidades de la especie <i>Oncorhynchus mykiss</i>	3
2.3 Bacterias patógenas que afectan el cultivo de trucha arcoíris	5
2.4 Manejo para la prevención y control de enfermedades en la acuicultura	6
2.5 Probióticos	7
2.6 Selección de microorganismos con potencial probiótico	8
2.7 Microorganismos de potencial probiótico en trucha arcoíris	10
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo General:	16
5.2 Objetivos específicos:	16
6. MATERIALES Y METODOS.....	17
6.1 Selección de las truchas arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	17
6.2 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas.....	17

6.3 Identificación fenotípica y bioquímica de los aislados	18
6.3.1 Caracterización morfológica de las colonias	18
6.3.2 Identificación bioquímica.....	18
6.4 Caracterización genotípica de los aislados por PCR.....	19
6.4.1 Extracción de ADN	19
6.4.2 Primers y protocolos utilizados en el ensayo de PCR	20
6.5 Ensayo de actividad antagonista <i>in vitro</i> de bacterias ácido-lácticas contra <i>Aeromonas</i>	21
6.6 Susceptibilidad a antibióticos de los aislados de bacterias ácido-lácticas ...	22
6.7 Identificación genotípica de (los) aislado(s) líder(es).....	23
6.7.1 Análisis de secuencias.....	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1 ARTÍCULO ENVIADO.....	25
8. DISCUSIÓN	37
9. CONCLUSIONES.....	42
10. BIBLIOGRAFÍA	44
11. ANEXOS	51
ANEXO 1. Ficha técnica medio de cultivo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS). ...	51
ANEXO 2. Protocolo para Tinción diferencial de bacterias.	52
ANEXO 3. Protocolo de extracción de ADN. GeneJET Genomic DNA Purification Kit.	53
ANEXO 4. Protocolo de determinación de susceptibilidad a antibióticos. Multibac I.D.....	54
ANEXO 5. Protocolo de purificación de ADN producto de PCR. GeneJET Genomic DNA Purification Kit.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Participación porcentual de la producción de Trucha en las principales entidades. Fuente: Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA, 2018).....	4
Figura 2 Diagrama para la selección, evaluación de la actividad biológica y seguridad de los probióticos como agentes de biocontrol en la acuicultura.....	10

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características favorables para seleccionar microorganismos probióticos potenciales.....	9
Tabla 2 . Resumen de aplicaciones probióticas potenciales para <i>Oncorhynchus mykiss</i>	11
Tabla 3 Primers para la identificación de <i>Lactobacillus</i>	21

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislados de <i>Aeromonas</i> usados en el ensayo de actividad antagonista	21
Cuadro 2. Patrón de comparación de halos de sensibilidad a lo antibióticos en mm (NCCLS).	23

ABSTRACT

Aquaculture worldwide is a growing sector, as in the State of Mexico, where the most widely produced aquaculture species is rainbow trout, whose culture continues to develop, however, as various sweet aquaculture crops are not exempt from the incidence of pathogenic outbreaks, being some of the most common in this state bacteria belonging to the genus *Aeromonas*.

In this study, microorganisms of the genus *Lactobacillus* were isolated from the intestine of rainbow trout. 14 of these isolates were evaluated for sensitivity to antibiotics, where 9 isolates were susceptible to: ampicillin (AMP), cephalothin (CEF), cefotaxime (CTX), ciprofloxacin (CIP), clindamycin (CLI), dicloxacillin (DCX), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), penicillin (PEN) and tetracycline (TET), Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and Vancomycin (VAN). The isolates were evaluated according to the antagonistic capacity against pathogens of the genus *Aeromonas* isolated from trout, where some of these isolates had a high in vitro antagonistic capacity against pathogens. The intergenic region of the 16S-23S gene was sequenced in 50% (7) of the isolates that had better sensitivity to antibiotics and antagonistic capacity. The sequence analysis coincided with 100% similarity with the *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* strains, and only 97% similarity with *Lactobacillus casei* with respect to sequences reported in GenBank. In this work, a proposal is presented as an alternative to the control of pathogens in rainbow trout culture, the use of bacteria of the genus *Lactobacillus* with sensitivity to antibiotics and high antagonistic capacity of pathogens, as possible probiotics.

RESUMEN

La acuicultura a nivel mundial es un sector en crecimiento, al igual que en el Estado de México, donde la especie acuícola que más se produce es la trucha arcoíris, cuyo cultivo sigue en constante desarrollo, sin embargo, como diversos cultivos dulce acuícolas no está exento de la incidencia de brotes patógenos, siendo algunos de los más comunes en este estado las bacterias pertenecientes al género *Aeromonas*. En este estudio se aislaron 30 microorganismos del género *Lactobacillus* del intestino de trucha arcoíris, identificados mediante morfología y pruebas bioquímicas. A 14 de estos aislados se les evaluó la sensibilidad a los antibióticos empleando la prueba de Kirby-Bauer, todos los aislados mostraron mayor susceptibilidad a los 9 antibióticos analizados: ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), clindamicina (CLM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), penicilina (PE) y tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetropim (STX), Vancomicina (VA). En este trabajo se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* contra cuatro especies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas popoffi*, *Aeromonas bestiarum* y *Aeromonas sobria* aisladas de trucha mexicana y que han mostrado alta patogenicidad en la acuicultura del Estado de México. La capacidad antagonista contra estos patógenos fue altamente significativa ya el 50% de los *Lactobacillus sp.* mostraron actividad antagónica contra todas las especies ensayadas. Finalmente se secuenció la región intergénica 16S-23S de 50% (7) de los 14 aislados que contaron con mejor sensibilidad a los antibióticos y mayor capacidad antagonista contra *Aeromonas*. Para el análisis taxonómico el análisis de secuencias se realizó, empleando el BLAST y coincidió en un 100% de similitud con las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*, y solo el 97% de similitud con *Lactobacillus casei* con respecto a secuencias reportadas en GenBank. En este trabajo se presenta una alternativa al control de patógenos para el cultivo de trucha arcoíris. A partir del diseño de un probiótico de bacterias del género *Lactobacillus* con significativa sensibilidad a antibiótico y alta capacidad antagonista contra diferentes géneros de *Aeromonas*, que sea amigable con la microbiota y seguro para el consumo.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en México se ha convertido en una actividad de rápido crecimiento, debido a su aportación a la producción pesquera, al incremento en la demanda de los productos acuícolas y por el cambio de hábitos alimenticios (Beltrán-Meza, 2017).

El Estado de México se ha posicionado en el primer lugar entre las 15 entidades sin litoral en la producción de trucha y carpa. El 85 de los 125 municipios generan 25 por ciento de la producción acuícola de la entidad. La producción acuícola mundial de animales acuáticos cultivados creció, en promedio, un 5.3% anual en el período 2001-2018, mientras que el crecimiento fue solo del 4% en 2017 y del 32% en 2018

El cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), es una de las actividades más importantes para las familias mexiquenses y del país, con una producción al año de 119,118 toneladas con un valor mayor de 876 millones de pesos. El crecimiento de la actividad trutícola, se ha asociado principalmente a regiones donde las condiciones climáticas y de los ecosistemas contribuyen al desarrollo del sector. De la producción total por pesca y acuicultura del país, el 15.83% proviene de la acuicultura y el 2.49% del total proviene de entidades sin litoral, entre las que destaca el Estado de México como uno de los Estados de mayor producción acuícola a nivel nacional, el primero en producción de trucha de los estados sin litoral así como el número 16 en volumen de producción y 13 en valor de producción (Dionicio Mendoza, 2019).

Los índices de producción de esta industria se han visto disminuidos por la mortalidad y morbilidad ocasionada por varios microorganismos y parásitos que afectan a las especies de cultivo acuícola (Patil *et al.*, 2001). Varias especies del género *Aeromonas* pueden provocar brotes de septicemia hemorrágica provocada por el agente etiológico *Aeromona hydrophila*. Dentro de las principales evidencias de la patología provocada por este microorganismo se encuentran oscurecimiento de la piel, exoftalmia unilateral y el patrón de comportamiento alterado, la morbilidad se estima de un 80% y la mortalidad del 51.2%. Por su parte la histopatología muestra lesiones en intestino anterior, con hiperplasia en el epitelio de las

vellosidades, en encéfalo (cerebro medio), congestión leptomenígea moderada difusa y en ojos se apreciaron focos de trombosis y reacción inflamatoria constituida por monocitos en la región periesclerótica y epitelio corneal. El control de enfermedades en la acuicultura, tanto profiláctico como terapéutico, se basó en el uso de antimicrobianos y de vacunas (Cabello *et al.*, 2013). Sin embargo, esta práctica no ha logrado buenos resultados debido a ineficiencia de algunas vacunas y a la resistencia de estos agentes a los antibióticos (Dixon, 2000). Esto ha llevado a la búsqueda de enfoques alternativos que, protejan al ambiente, prevengan y controlen las enfermedades que afectan a las distintas especies acuícolas y eleven los indicadores productivos. Una de estas alternativas es el uso de probióticos con fines preventivos como las bacterias de ácido láctico (BAL) (García *et al.*, 2015). El género bacteriano *Lactobacillus* es el más prometedor como probióticos en acuicultura. Durante la década se realizan numerosas investigaciones sobre evaluación de propiedades probióticas de diferentes géneros y especies de BAL.

Los probióticos ejercen su efecto beneficioso mediante múltiples mecanismos, no sólo sobre el organismo de interés sino también sobre el ambiente que le rodea. Entre los principales mecanismos de acción descritos para probióticos que se emplean en la acuicultura se incluyen: la capacidad para colonizar y adherirse al tracto intestinal, la modulación del sistema inmune, la producción de compuestos benéficos, la producción de sustancias antagónicas contra patógenos y la mejora de la calidad del medio acuático.

En marzo 2018, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) propuso una guía que incluye algunas normas regulatorias para el uso de microorganismos como aditivos alimentarios; aunque se adolece de una ruta crítica validada y aceptada por agencias regulatorias internacionales, esta guía menciona las características de la información científica para demostrar la actividad probiótica y garantizar la seguridad de estos microorganismos en los alimentos para animales.

La trucha arcoíris es la especie acuícola más producida en Estado de México y no está exenta de la incidencia de patógenos. Por ello el objetivo de este proyecto es

evaluar el potencial probiótico de BAL aisladas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), siguiendo una ruta crítica, que permita comprobar no solo su capacidad como probiótico, sino que garantice su seguridad.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la Acuicultura en México

La acuicultura es el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de crianza de especies acuáticas. Estas especies se desarrollan en cultivos ya sea de agua salada o dulce, bajo condiciones totalmente controladas (INAES, 2018).

La acuicultura tiene el potencial de hacer una contribución significativa a la creciente demanda de alimentos acuáticos en la mayoría de las regiones del mundo; sin embargo, para lograr esto, el sector deberá afrontar retos significativos, incluyendo la intensificación de la producción, el control de enfermedades y la prevención del deterioro ambiental (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013).

En México, la acuicultura lleva en desarrollo varias décadas, se ha convertido en una actividad de rápido crecimiento, se han aprovechado los recursos hídricos del país para la cría y reproducción de animales, tanto de consumo humano como de ornato, siendo la más común producción para consumo humano (INAES, 2018).

El mayor reto al que se enfrenta el cultivo acuícola en México es la necesidad de controlar las enfermedades bacterianas y virales, ya que, esta industria se ve afectada con el incremento en los niveles de intensificación de los cultivos, debido a que se aumenta el riesgo de incidencia y dispersión de enfermedades, en las poblaciones acuáticas cultivadas.

2.2 Generalidades de la especie *Oncorhynchus mykiss*

En la actualidad hay un reconocimiento mundial de la acuicultura, la producción se está expandiendo a una amplia diversidad de peces cultivados y los salmónidos siguen siendo un importante contribuyente a la producción de pescado en muchos países. La trucha arcoíris es una especie popular de peces salmónidos y ha recibido gran atención en términos de importancia para la acuicultura, sigue siendo un núcleo de la producción pesquera continental en muchos países alrededor del mundo (Merrifield *et al.*, 2010).

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie de cultivo dulce acuícola que pertenece a la familia *Salmonidae*, es originaria de las costas del Pacífico de América del Norte y es considerada de fácil adaptación al cautiverio (Ragash, 2009).

Actualmente la trucha por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 18 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor lo encontramos en el lugar 8. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 5.99% (CONAPESCA, 2018) según el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca publicada en el 2018, la entidad federativa más productora de trucha es el Estado de México.

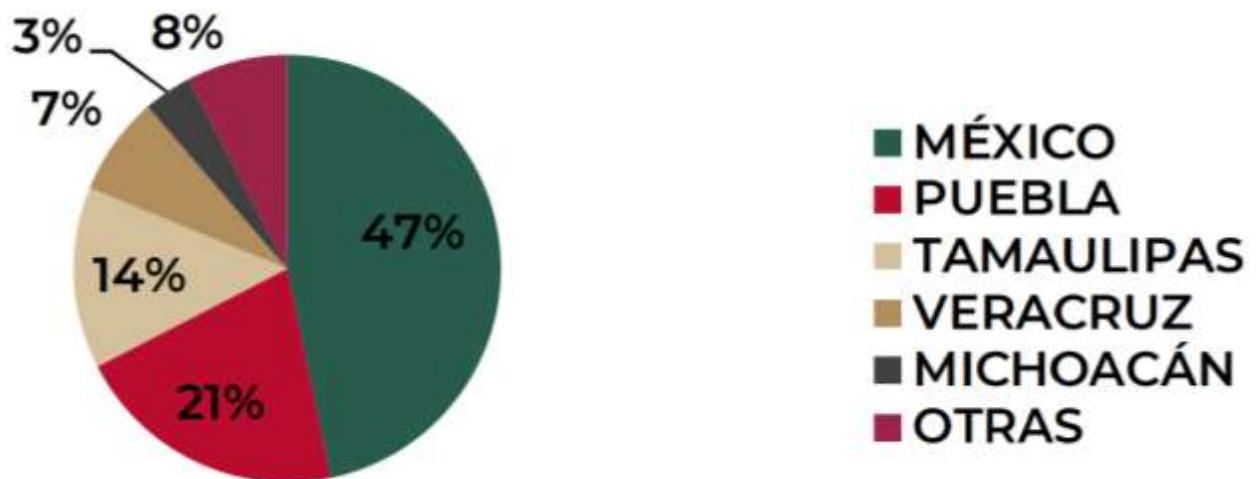


Figura 1 Participación porcentual de la producción de Trucha en las principales entidades. Fuente: Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA, 2018).

Esta actividad considerada como rentable, es afectada por diferentes enfermedades en los cultivos y en algunos casos por la falta de una buena calidad y volumen de agua. La actividad trutícola se realiza principalmente en zonas con climas de templado a frío y en sitios con altitud superior a los 1,200 m sobre el nivel del mar (SAGARPA, 2012).

2.3 Bacterias patógenas que afectan el cultivo de trucha arcoíris

La principal amenaza para el buen desarrollo del cultivo acuícola es la aparición de patógenos. Con la acuicultura intensiva las enfermedades infecciosas se han convertido en un factor limitante de desarrollo, debido a su rapidez de acción, de dispersión y el alto grado de afectación (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

La calidad del agua y el medio ambiente de cultivo de los peces determinan el nivel de contaminación por bacterias en el pescado. A su vez el contenido de bacterias patógenas depende de distintos factores como son: la temperatura y salinidad del agua, la proximidad de la granja acuícola a las áreas de asentamientos humanos, la cantidad y calidad del alimento consumido por los peces (SENASICA, 2003).

Dentro de las enfermedades bacterianas más comunes que afectan a peces destacan la forunculosis causada por *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida*, la septicemia hemorrágica que puede ser causada por *Aeromonas hydrophila* y otras *Aeromonas* sp., así como por *Pseudomonas* sp., la enfermedad bacteriana del riñón causada por *Renibacterium salmoninarum*, la septicemia entérica del bagre cuyo agente etiológico es *Edwardsiella ictaluri*, septicemias estreptocócicas en donde están involucradas diferentes bacterias del género *Streptococcus* así como otros géneros incluido *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* y *Weissella ceti* entre otros; la enfermedad entérica de la boca roja provocada por *Yersinia ruckeri* y distintas modalidades de Flavobacteriosis causadas por bacterias del género *Flavobacterium* (Mata López, 2017).

En un estudio realizado en granjas de trucha arcoíris de México para determinar la frecuencia de aislamientos bacterianos en truchas arcoíris cultivadas se identificaron aislamientos de los géneros *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Yersinia*, en dicho estudio se encontró que las bacterias del género *Aeromonas* fueron las bacterias más frecuentemente aisladas. La presencia de estos patógenos en las granjas acuícolas tiene implicaciones en cuestión económica y de salud pública (Salgado-Miranda *et al.*, 2010). En acuicultura, diversas especies de *Aeromonas* infectan especies de cultivo y producen pérdidas económicas significativas (Zepeda-Velázquez, 2015).

2.4 Manejo para la prevención y control de enfermedades en la acuicultura

En la acuicultura, la producción intensiva de organismos acuáticos enfrenta el riesgo de aparición de enfermedades infecciosas, que pueden ocasionar pérdidas económicas significativas por mortalidad.

El manejo sanitario es necesario en la industria acuícola, esto involucra ciertas actividades para prevenir las pérdidas por agentes infecciosos como son: buenas prácticas de manejo, condiciones higiénicas adecuadas, programas de vacunación, probióticos e inmunoestimulantes, todas las formas de actuar contra los invasores patógenos.

Los compuestos químicos, principalmente antibióticos, tienen poco control en la restricción de su uso, se han empleado ampliamente para prevenir y tratar enfermedades infecciosas en granjas acuáticas. Sin embargo, muchos de estos agentes pueden persistir inalterados en el sitio de aplicación junto con el medio ambiente circundante lo que puede generar bacterias resistentes a múltiples fármacos, los cuales pueden llegar a intercambiar su resistencia con patógenos animales y humanos a través de la transferencia de material genético (García *et al.*, 2015).

Por ello, se siguen buscando soluciones, como son, nuevos probióticos, prebióticos, su combinación, subproductos bacterianos o metabolitos secundarios que podrían ser alternativas potenciales al uso de antibióticos en acuicultura.

2.5 Probióticos

Durante los últimos años, se ha generado gran interés en el uso de inmunoestimulantes como una alternativa al uso de vacunas y antibióticos en la lucha contra las enfermedades infecciosas de los peces. Una de estas alternativas son los probióticos, que se consideran microorganismos administrados por vía oral y producen beneficios para la salud, se utilizan ampliamente en la acuicultura para el control de enfermedades, especialmente contra las enfermedades bacterianas (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Por ello, el uso de probióticos o bacterias beneficiosas, que controlan patógenos a través de una variedad de mecanismos, es cada vez más visto como una alternativa a los tratamientos con antibióticos (Balcazar *et al.*, 2006).

Los probióticos, se definen como adjuntos microbianos vivos que tienen un efecto beneficioso en el hospedero al: (1) modificar la comunidad microbiana asociada al hospedero o ambiente; (2) mejorar el uso de los alimentos o aumentar su valor nutricional; (3) mejorar la respuesta del hospedero hacia la enfermedad; y / o (4) mejorar el entorno. Hasta la fecha, la mayoría de los probióticos propuestos como biocontroladores y agentes de biorremediación para la acuicultura pertenece al grupo BAL (bacterias ácido lácticas, principalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*), a los géneros *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas* o a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013).

La explotación de los microorganismos probióticos aislados y caracterizados de especies específicas; mejoran sustantivamente la producción y conversión alimentaria del animal permitiendo una estrategia de reemplazo al uso

indiscriminado de antibióticos y promotores de crecimiento que se suministran a los animales para prevenir las enfermedades; provocando la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (Ng *et al.*, 2014).

2.6 Selección de microorganismos con potencial probiótico

Los probióticos se consideran microorganismos no patógenos, que son presuntamente seguros; para que podamos otorgarle este estatus, los microorganismos de interés deben cumplir con ciertas características que le dan el potencial uso probiótico.

Con diversos estudios se ha demostrado que los microorganismos empleados como probióticos no les confieren protección a todas las especies acuícolas contra todos los patógenos, la predicción del comportamiento *in vivo* del probiótico con respecto a los resultados de las pruebas *in vitro* puede no ser acertada, ya que, el microorganismo puede no adaptarse al hospedero. Para la selección de un microorganismo con potencial probiótico se deben considerar algunas características importantes como: supervivencia y colonización del aparato digestivo. Por lo anterior, es recomendable usar cepas aisladas del hospedero, que se prevé, tengan la habilidad de sobrevivir al tránsito gastrointestinal, resistir a las sales biliares y al pH bajo. Balcázar *et al.* (2006) sugirió que, para seleccionar probióticos, las cepas que se han aislado del hospedador son preferibles. Estudios adicionales han indicado que las bacterias aisladas de las especies de peces apropiadas puede ser un método eficiente para seleccionar probióticos efectivos (Kim & Austin, 2006; Balcázar *et al.*, 2008).

Otra característica de interés es la exclusión competitiva: el antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza, por lo tanto, las interacciones microbianas juegan un papel importante papel en el equilibrio entre un competidor beneficioso y microorganismos potencialmente patógenos. Por lo que, la manipulación microbiana constituye una herramienta viable para reducir o eliminar la incidencia

de patógenos oportunistas, el efecto antagónico de las bacterias probióticas hacia patógenos específicos puede ser un método de selección (Balcazar *et al.*, 2006).

Siguiendo documentos de revisiones anteriores (Merrifield *et al.*, 2010) propone una lista ampliada de características favorables para seleccionar microorganismos probióticos potenciales, algunos de los cuales son esenciales (E) y otros considerados meramente favorables (F). Cuantas más de estas características se cumplan por una especie probiótica candidata, más apropiada será la especie considerada y, por lo tanto, es más probable que sea un probiótico de peces efectivo.

Tabla 1 Características favorables para seleccionar microorganismos probióticos potenciales.

Características esenciales	Características favorables
No debe ser patógeno, no solo con respecto al hospedero, también con respecto a los animales acuáticos en general y humanos consumidores.	Debe poder colonizar la superficie epitelial intestinal.
Debe estar libre de genes de resistencia a antibióticos.	Debe mostrar características de crecimiento ventajosas (por ejemplo, corto tiempo de duplicación y/o crecimiento en la crianza del hospedero).
Debe ser resistente a las sales biliares y bajo pH.	Debe exhibir propiedades antagónicas hacia uno o más microorganismos patógenos.
Debe poder adherirse y/o crecer bien dentro de la mucosa intestinal.	Debe producir enzimas digestivas extracelulares relevantes.
	Debe ser autóctono al hospedero o al entorno de crianza.
	Debe ser viable en condiciones normales de almacenamiento y con capacidad para sobrevivir a procesos industriales.

Fuente: (Merrifield *et al.*, 2010)

Los métodos para seleccionar bacterias probióticas para uso en acuicultura incluyen: (I) recolección de información de fondo; (II) adquisición de probióticos potenciales; (III) evaluación de la capacidad de probióticos potenciales para superar a las cepas patógenas; (IV) evaluación de la patogenicidad del potencial probióticos; (V) evaluación del efecto del potencial probióticos en el hospedero; (VI) análisis costo/beneficio económico (Gomez-Gil et al., 2000) (Figura 2).

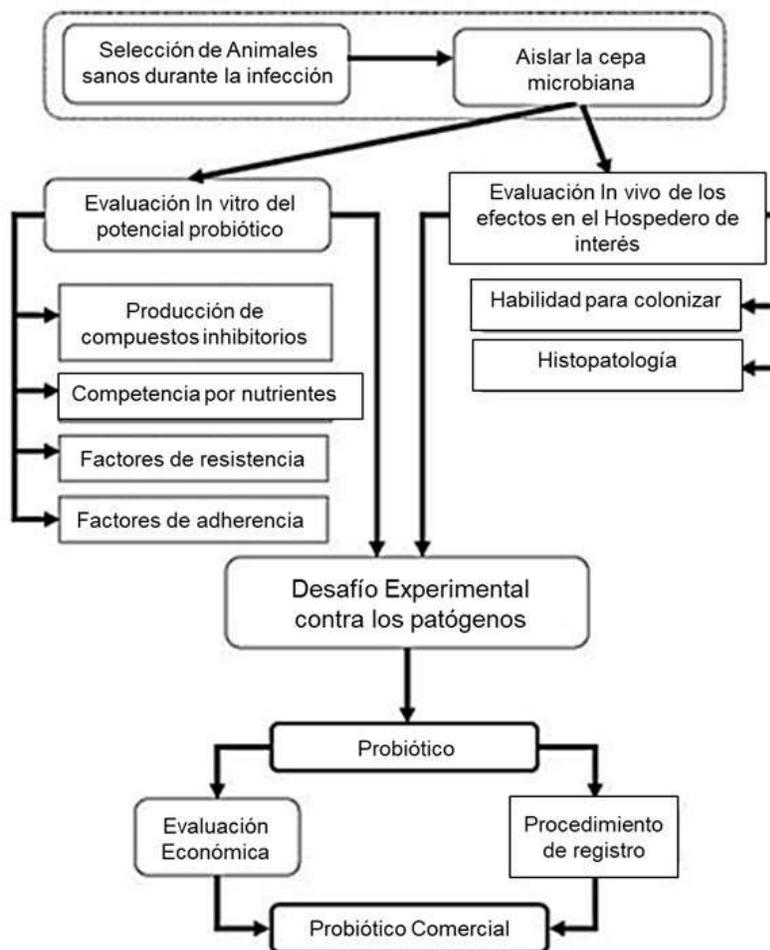


Figura 2. Diagrama para la selección, evaluación de la actividad biológica y seguridad de los probióticos como agentes de biocontrol en la acuicultura.

2.7 Microorganismos de potencial probiótico en trucha arcoiris

La mayoría de los probióticos propuestos como agentes de control biológico en la acuicultura pertenecen a las bacterias de ácido láctico, el género *Bacillus*, o los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* (García et al., 2015).

La trucha arcoíris es una especie popular de peces salmónidos y ha recibido gran atención en términos de importancia para la acuicultura, por ello, ha habido numerosas investigaciones para evaluar la viabilidad de complementar las dietas con una gama de bacterias potencialmente probióticas Merrifield (2010) planteó una revisión que evalúa literatura disponible sobre el uso de probióticos y prebióticos en trucha (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de aplicaciones probióticas potenciales para *Oncorhynchus mykiss*.

Microorganismo potencial	Parámetros investigados	Referencias
<i>La. lactis, Leu. Mesenteroides, L. sakei</i>	DR, IR, GM	Balcázar <i>et al.</i> (2007b) a
<i>Leu. mesenteroides, L. plantarum</i>	DR, GM, GP	Vendrell <i>et al.</i> (2008) a
<i>L. rhamnosus</i>	DR, GP	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001) a
<i>L. rhamnosus</i>	GM, IR	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2003) a
<i>L. rhamnosus</i>	GM, IR	Panigrahi <i>et al.</i> (2004) a
<i>L. rhamnosus</i>	GM, IR	Panigrahi <i>et al.</i> (2005) a
<i>L. rhamnosus, B. subtilis, E. faecium</i>	IR	Panigrahi <i>et al.</i> (2007) a, b
<i>E. faecalis</i>	BC, GP, IR, DR	Rodriguez-Estrada <i>et al.</i> (2009) a
<i>B. subtilis</i>	DR, GM, IR	Newaj-Fyzul <i>et al.</i> (2007)
<i>B. subtilis+B. licheniformis</i>	DR, IR	Raida <i>et al.</i> (2003) a
<i>B. subtilis+B. licheniformis</i>	BC, FU, GM, GP	Bagerhi <i>et al.</i> (2008) a
<i>B. subtilis+B. licheniformis, E. faecium</i>	BC, FU, GM, GP, IR	Merrifield <i>et al.</i> (2009ab) a
<i>B. subtilis+B. licheniformis, E. faecium, P. acidilactici</i>	GH, GM	Merrifield <i>et al.</i> (2010d) a
<i>Bacillus spp., A. sobria</i>	DR, IR	Brunt <i>et al.</i> (2007) a
<i>Bacillus spp., A. sobria</i>	IR	Brunt <i>et al.</i> (2008) a
<i>P. acidilactici</i>	BC, FU, GM, GP, IR	Merrifield <i>et al.</i> (2009c) a
<i>P. acidilactici, S. cerevisiae</i>	BC, FU, GM, GP, SM	Aubin <i>et al.</i> (2005ab) a
<i>P. acidilactici, S. cerevisiae</i>	DR, IR	Quentel <i>et al.</i> (2004) a
<i>C. divergens, C. maltaromaticum</i>	IR	Kim y Austin (2006a) a
<i>C. divergens, C. maltaromaticum</i>	IR	Kim y Austin (2006b) b
<i>C. inhibens</i>	DR, GM	Robertson <i>et al.</i> (2000) a
<i>A. sobria</i>	DR, IR	Brunt y Austin (2005) a, b
<i>A. sobria, Brochothrix thermosphacta</i>	DR, IR	Pieters <i>et al.</i> (2008) a
<i>A. sobria</i>	DR, IR	Arijo <i>et al.</i> (2008) a, b

<i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp., <i>C. inhibens</i> , <i>V. alginolyticus</i>	DR, IR, GM	Irianto y Austin (2002b) a
<i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp., and unidentified Gram-positive coccus	DR, IR	Irianto y Austin (2003) a
<i>Ps. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> strains, <i>Carnobacterium</i> strains	DR	Spanggaard <i>et al.</i> (2001) a, b
<i>Ps. fluorescens</i>	DR	Gram <i>et al.</i> (1999) a, b
<i>S. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>R. glutinis</i>	GM	Andlid <i>et al.</i> (1995) a
<i>S. cerevisiae</i>	BE, GM	Waché <i>et al.</i> (2006) a
<i>Kocuria</i> SM1	DR, IR	Sharifuzzaman y Austin (2009) a
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus mojavensis</i>	DR, IR	Capkin y Altinok (2009) a

a=Estudios *in vivo*. b=Experimentos *in vitro*. Fuente: Merrifield *et al.*, 2010.

Según la FAO/OMS, el desarrollo de probióticos comerciales requiere su identificación taxonómica inequívoca, así como su caracterización funcional y evaluación de seguridad *in vitro* e *in vivo*. En Europa, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) propuso un sistema para una evaluación de seguridad previa a la comercialización de grupos seleccionados de microorganismos utilizados en alimentos / piensos y la producción de aditivos para alimentos / piensos que conduzcan a un estado de presunción de seguridad (QPS) calificada (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013).

Las pruebas *in vitro* no son siempre un buen indicador del efecto probiótico *in vivo*, sin embargo en algunos casos la evaluación *in vitro* previa es un buen indicador de la función probiótica en control de la enfermedad en el ensayo *in vivo* (Burbank *et al.*, 2012). Por ejemplo: en una evaluación *in vitro* de un probiótico efectivo en el control de furunculosis en trucha arcoíris previa a las pruebas *in vivo* fue un buen Indicador de su funcionalidad (Irianto & Austin, 2002). Adicionalmente, una prueba *in vitro* del efecto probiótico de bacterias aisladas de intestino para controlar la lactococosis y estreptococosis en trucha arco iris fue buen indicativo del efecto *in vivo* (Brunt & Austin, 2005).

La EFSA propuso en marzo de 2018, una guía titulada “Orientación sobre la caracterización de microorganismos utilizados como aditivos para piensos o como organismos de producción”, la cual, contiene una propuesta con las pruebas que deben realizarse para la caracterización de cepas microbianas que pretenden usarse como aditivos para alimentos de animales. De acuerdo con esta guía, la información científica obtenida *in vitro* que se requiere sobre los microorganismos con potencial uso probiótico es la siguiente:

- Identificación de la cepa: Se debe proporcionar información taxonómica del microorganismo: género, especie y nombre o código de la cepa. Este debe identificarse sin ambigüedad a nivel de especie en base a conocimiento y metodologías actualizadas.
- Actividad antimicrobiana: La manera más común de determinarla es mediante las pruebas de antagonismo *in vitro*, en el cual los patógenos son expuestos al probiótico o a sus productos extracelulares.
- Susceptibilidad a antibióticos: Es necesario realizar pruebas fenotípicas basadas en la determinación de una concentración inhibitoria mínima (CIM) para un grupo seleccionado de antimicrobianos.
- Toxicidad y patogenicidad: Se debe proporcionar información relacionada con la toxigenicidad y virulencia para los seres humanos y las especies acuícolas objetivo, para los agentes activos y las cepas de producción, es necesaria una evaluación de la seguridad de los aditivos alimentarios para las especies objetivo.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de trucha se ha convertido en una importante actividad económica en muchos países como es el caso de México. Sin embargo, estos ejemplares están expuestos a condiciones estresantes, donde la presencia de enfermedades ocasionada por brotes de patógenos que suelen diseminarse y el deterioro de las condiciones ambientales causan alta mortalidad en esta especie y generan pérdidas económicas significativas.

A pesar de que la vacunación ofrece la mejor prevención contra enfermedades específicas, aún no se desarrollan vacunas efectivas contra un gran número de patógenos bacterianos y virales que afectan a esta especie, a pequeña y mediana escala. La mayoría de las vacunas no son efectivas o tienen muy bajos porcentos de efectividad y su costo es elevado, por lo que su relación costo-beneficio es insatisfactorio. Aunado a esto, la creciente resistencia a los antibióticos que, además de ser un problema biológico, es sin lugar a dudas un problema médico, social, económico y ético, debido a que las infecciones producidas por estas bacterias resistentes tienen mayor morbilidad y mortalidad.

Debido a la persistencia de las enfermedades infecciosas en las especies de cultivo acuícola, incluyendo la trucha, la escasa eficacia de las vacunas y la resistencia provocada por la aplicación de antibióticos, se buscan alternativas para la prevención de enfermedades en el cultivo trutícola. Una de las alternativas para la prevención segura de las patologías es el uso de probióticos. Sin embargo, para seleccionar una cepa como posible probiótico y emplearlos en animales se requiere de una ruta crítica establecida por las agencias regulatorias. Primero aislar e identificar el microorganismo, comprobar *in vitro* su actividad probiótica y su seguridad y posteriormente diseñar estudios *in vivo* apropiados para establecer su eficacia. Este proyecto propone el diseño de un probiótico basado en bacterias ácido lácticas extraídas de intestino de trucha, comprobando el antagonismo *in vitro* contra *Aeromonas* y baja resistencia a antimicrobianos.

4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Los aislados de bacterias obtenidas del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), poseen actividad probiótica y son seguros para el consumo de esta especie.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Evaluar *in vitro* la actividad probiótica de *Lactobacillus* aislados del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

5.2 Objetivos específicos:

- Identificar los aislados de bacterias ácido lácticas con actividad probiótica del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Seleccionar los aislados de *Lactobacillus* con mayor actividad antagonista *in vitro* contra las *Aeromonas* aisladas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de los aislados de *Lactobacillus* seleccionados.
- Realizar la identificación genotípica de los *Lactobacillus* líderes.

6. MATERIALES Y METODOS

La primera parte del proyecto se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, con el apoyo del Área de investigación en Biotecnología, esto consistió en el aislamiento, cultivo y conservación de la muestra, la bioquímica básica y el ensayo *in vitro* de antagonismo contra diferentes especies de *Aeromonas*. La segunda etapa referente a actividades de resistencia a antibióticos y caracterización genética se realizó en el Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco, Bilbao, España.

6.1 Selección de las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Para la investigación se emplearon peces de la especie trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidos de granjas acuícolas del Estado de México: Centro Acuícola El Zarco, Ocoyoacac, granja El Oyamel, Ocoyoacac y granja El Truchón, Ocoyoacac. El criterio de selección fue el siguiente: truchas sanas, sin signos clínicos, no alimentadas con suplementos probióticos y de diferentes edades; por lo que su peso varió entre 1 a 300 gramos y la talla entre 4 a 30 cm.

6.2 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas

El aislamiento de bacterias se realizó posterior a la eutanasia de los peces. La eutanasia se realizó por medio de inmersión con el anestésico metano sulfonato de triclaína, con base a las recomendaciones del American Veterinary Medical Association (AVMA, 2013). Para el aislamiento, se siguió la siguiente metodología: los peces fueron diseccionados asépticamente, la obtención de la muestra se realizó a partir del contenido del intestino posterior de los pescados. Cada muestra del contenido intestinal se homogeneizó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7.2. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas logarítmicas

decimales, a partir de la muestra colectada. Las muestras de cada dilución se difundieron en placas de medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, DIBICO, que contiene: acetato de sodio 5.0, fosfato disódico 2.0, agar 12.0, peptona proteosa no. 3 10.0, citrato de amonio 2.0, polisorbato (Tween 80) 1.0, dextrosa 20.0, sulfato de magnesio 0.1, extracto de carne 10.0, extracto de levadura 5.0, sulfato de manganeso 0.05 (formula en gramos por litro de agua destilada) con un pH 6.5 ± 0.2 (ANEXO 1) y se incubaron a 25 °C durante 48 a 72 horas (Didinen *et al.*, 2018) para aislar bacterias ácido lácticas.

6.3 Identificación fenotípica y bioquímica de los aislados

6.3.1 Caracterización morfológica de las colonias

Transcurridas las 24-72 horas de incubación se valoraron las colonias obtenidas a través de la observación directa de las placas de agar, observando las características macroscópicas, es decir, morfología, tamaño, elevación, forma del margen o borde, consistencia y color, adicionando el número relativo de cada tipo de colonia presente en el medio.

Las colonias se seleccionaron y se les realizó la tinción de Gram, para lo cual, se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, posteriormente se emulsionó con una colonia tomada del medio sólido, se extendió esta emulsión en el portaobjeto, dejándose secar a temperatura ambiente, para posteriormente fijarla con calor y proceder con la tinción, para esto, se utilizó el método de tinción de Gram, Equipo de colorantes para tinción diferencial de bacterias, HYCEL (ANEXO 2).

6.3.2 Identificación bioquímica

Se llevo a cabo las pruebas de bioquímica básica de catalasa y oxidasa para ubicar colonias de interés. Las bacterias ácido-lácticas (BAL) se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, catalasa negativas y anaerobio-facultativas (Settanni & Moschetti, 2010).

CATALASA: La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, esta descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Para realizar la prueba sobre un portaobjetos se colocó una gota de H₂O₂ de 10 volúmenes y sobre esta se suspendió una colonia con ayuda de un asa, inmediatamente se evaluó la reacción, observando si hay o no presencia de burbujas procedentes del oxígeno que indicarían que la prueba es positiva (Castillo Miranda, 2017).

OXIDASA: La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo este es reducido por el oxígeno molecular y produce agua o peróxido de hidrogeno según la especie bacteriana. Esta prueba se realizó utilizando un hisopo que fue impregnado con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, una vez teniendo el reactivo en el hisopo con este se tomó una colonia y se frotó en su totalidad esperando que transcurrido un minuto la zona impregnada virara aun color azul- violeta si fuera positivo (Castillo Miranda, 2017).

Posteriormente se seleccionaron los aislados catalasa y oxidasa negativos, se purificaron y conservaron.

Para la conservación de los aislados se inocularon 1×10^8 UFC/ml en 2 ml de caldo MRS con glicerol al 25% v/v y se colocaron a -80 °C estos servirían posteriormente, como stocks para cada uno de los ensayos de probióticos, antes de cada ensayo las cepas fueron incubadas en medio MRS a 37 °C por 24 h, para reconstituirlas.

6.4 Caracterización genotípica de los aislados por PCR

6.4.1 Extracción de ADN

Treinta cepas fueron categorizadas fenotípicamente como posibles *Lactobacillus*. El ADN se extrajo de cultivos puros de cada aislamiento utilizando el kit de purificación

de ADN genómico GeneJet (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ANEXO 3).

6.4.2 Primers y protocolos utilizados en el ensayo de PCR

En la amplificación, se utilizaron primers (OLIGO T4. Tabla 3) basados en una secuencia identificada específica del género *Lactobacillus* LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') y en la secuencia terminal flanqueante del gen 16S rRNA conservado entre varias bacterias, incluido el género *Lactobacillus* R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') para amplificar una región de aproximadamente 250 pb del espaciador intergénico de ARNr 16S -23S.

Se realizó una PCR con un volumen final de 50 µl por cada oligonucleótido, que contenía una concentración de 0,2 mM, 5 microlitros de tampón de PCR, 200 mM de desoxinucleótidos (dNTPs), 2,5 µl de MgCl₂, 0,5 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, EE. UU.) Y aproximadamente 100 ng de ADN cromosómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Arctic TC A0096, Thermo Scientific) utilizando el método reportado por (Dubernet *et al.*, 2002) bajo las siguientes condiciones: las muestras se sometieron a desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 20 o 30 ciclos que consisten en desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineación a 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 30s y un paso de extensión final durante 7 min a 72 °C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,0% (p/v) teñidos con GelRed (Biotium) y se visualizaron con el sistema de documentación Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Se utilizó GeneRuler (Thermo Scientific) como marcador de tamaño molecular.

Las bandas obtenidas de los diferentes aislados se consideraron positivas para la identificación pertenecientes al género *Lactobacillus* si correspondían a un fragmento de aproximadamente 250 pb según el control, se utilizó como control el probiótico comercial Probacilus (*Lactobacillus sporogenes*).

Tabla 3 Primers para la identificación de *Lactobacillus*.

Género	Primer	Secuencia 5´ 3´	Sentido	Región que amplifica	Producto PCR
<i>Lactobacillus</i>	R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTCA	F	Región Inter génica 16-23s	250 pb
	LbLMA1- rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC	R		

F = Forward, R = Reverse. Fuente: Dubernet *et al.*, 2002.

6.5 Ensayo de actividad antagonista *in vitro* de bacterias ácido-lácticas contra *Aeromonas*

Se evaluó la actividad antagonista *in vitro* de *Lactobacillus* aislado frente a 4 aislamientos de patógenos *Aeromonas*, previamente caracterizados, utilizando el ensayo de difusión de pozos de agar (WDAA). Los aislamientos de *Aeromonas* (Cuadro 1) incluidos en el estudio fueron donados por el Dr. Vicente Vega-Sánchez del Instituto de Ciencias Agrarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, estos cultivos fueron previamente aislados e identificados, obtenidos de lesiones cutáneas o tejidos internos (bazo, hígado o riñón) de trucha arcoíris (Vega-Sánchez *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Aislados de *Aeromonas* usados en el ensayo de actividad antagonista

Número de identificación	Microorganismo	Origen del aislado
394	<i>A. hydrophila</i>	lesión
359	<i>A. popoffii</i>	
353	<i>A. bestiarum</i>	bazo
369	<i>A. sobria</i>	

Cuatro días antes del cribado, se inocularon 10 ml de caldo de agar trípico de soja (TSA) con aislados de *Aeromonas*, mientras que el aislado a cribar se inoculó 2 días antes del cribado en 10 ml de caldo MRS. Se ajustaron alícuotas (2 ml) de cada aislado de *Lactobacillus* y una alícuota de 2 ml de *Aeromonas* a una densidad óptica

(DO) de 0,1 a 625 nm en un tubo de centrífuga de 15 ml, que se correlaciona con 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} utilizando el método de la placa de caída (Chen *et al.*, 2003). El caldo TSA inoculado con *Aeromonas* se esparció uniformemente en una placa de agar y, después de solidificar y secar durante 15-20 min, se perforaron pocillos (diámetro 5 mm) y 10 μl de cada cultivo (aproximadamente 10^8 - 10^9 UFC/ml) a los pocillos por triplicado.

Posteriormente, las placas se incubaron a 25 °C durante 24 a 48 h. Una vez crecido el césped de *Aeromonas*, se midieron las zonas de inhibición, restando el diámetro del pozo perforado. Se consideraron positivas las cepas que presentaban halos superiores a 2 mm de diámetro.

6.6 Susceptibilidad a antibióticos de los aislados de bacterias ácido-lácticas

De acuerdo con las exigencias de la FAO y la OMS en 2001 (Liaskovskii & Podgorskii, 2005) este es un requisito de identificación obligatorio para los microorganismos susceptibles de caracterizarse como probióticos. Todos los aislados se sometieron a las pruebas de resistencia a antibióticos.

La resistencia a los antibióticos de los aislados se determinó mediante la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton, siguiendo el método descrito en las instrucciones del fabricante (MILTIBAC I. D.) El inóculo bacteriano se estandarizó a una concentración de 0,5 en la escala de McFarland y las placas de agar se inocularon e incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Los discos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana (Multibac ID) utilizados aquí tenían las siguientes dosis de antibióticos: 10 μg de ampicilina (AM), 30 μg de cefalotina (CF), 30 μg cefotaxima (CFX), 5 μg de ciprofloxacina (CPF), 30 μg de clindamicina (CLM), 1 μg de dicloxacilina (DC), 15 μg de eritromicina (E), 10 μg de gentamicina (GE), 10 U de penicilina (PE), 30 μg de tetraciclina (TE), 25 μg de trimetoprim-sulfametoxazol (STX) y 30 μg de vancomicina (VA) (Multibac ID).

Las zonas de inhibición del crecimiento se midieron y compararon mediante tablas de interpretación, que se utilizaron para categorizar las bacterias como resistentes, intermedias o sensibles (Cuadro 2). Las zonas de inhibición se calcularon de acuerdo con las recomendaciones del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico y con (Charteris et al., 1998) para el caso de ampicilina, penicilina y vancomicina.

Cuadro 2. Patrón de comparación de halos de sensibilidad a lo antibióticos en mm (NCCLS).

Código - Antibiótico	Concentración	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicillina (AM)	10 mcg	12	13-15	16
Cefalotina (CF)	30 mcg	14	15-17	18
Cefotaxima (CFX)	30 mcg	14	15-22	23
Ciprofloxacina (CPF)	5 mcg	15	16-20	21
Clindamicina (CLM)	30 mcg	14	15-20	21
Dicloxacillin (DC)	1 mcg	--	---	--
Eritromicina (E)	15 mcg	13	14-17	18
Gentamicina (GE)	10 mcg	12	13-14	15
Penicillina (PE)	10 U	19	20-27	28
Tetraciclina (TE)	30 mcg	14	15-18	19
Sulfametoxazol/trimetropim (STX)	25 mcg	10	11-15	16
Vancomicina (VA)	30 mcg	14	15-16	17

6.7 Identificación genotípica de (los) aislado(s) líder(es)

A los microorganismos o aislados líderes, es decir, que presentaron mayor susceptibilidad a los antibióticos y mayor actividad antagonista de patógenos, se les realizó la identificación genotípica.

Los aislados de *Lactobacillus* del intestino de trucha arcoíris con actividad inhibidora frente a los aislados de *Aeromonas* ensayados y sensibilidad frente a los antibióticos ensayados se identificaron taxonómicamente mediante secuenciación de ADN del gen amplificado por PCR que codifica un fragmento de la región intergénica del ARNr 16S-23S.

Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir del ADN bacteriano total purificado utilizando el kit de purificación de ADN genómico GeneJet (Thermo Scientific), en mezclas de reacción de 50 µl con 5 ng de ADN purificado, 0,7 µmol l

- 1 de cada cebador y 25 µl de Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) en un termociclador Eppendorf Mastercycler. Se utilizaron la metodología y los primers mencionados anteriormente.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,0% (p/v) teñidos con GelRed (Biotium) y se visualizaron con el sistema de documentación Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Se utilizó GeneRuler (Thermo Scientific) como marcador de tamaño molecular. Los amplicones se purificaron utilizando el kit GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific), ver ANEXO 5, y ambas cadenas de ADN (directo e inverso) se secuenciaron en la Unidad SGIker UPV/EHU (Universidad del País Vasco, España).

6.7.1 Análisis de secuencias

Los resultados de la secuenciación se exportaron como archivos de secuencia FASTA. El análisis y la comparación de las secuencias de ADN_r de la región intergénica 16S-23S se realizó con el programa BLAST disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Solo las identidades de secuencia superiores al 97% se consideraron significativas para la identificación bacteriana a nivel de especie.

7. RESULTADOS

7.1 ARTÍCULO ENVIADO

The screenshot shows the homepage for the journal 'Current Pharmaceutical Design'. At the top left is the Bentham Science logo. A banner at the top right says 'REGISTER TO OUR FREE NEWSLETTER FOR UPDATES'. Below the banner is a search bar with 'Search' and 'Advanced Search' buttons. A navigation menu includes 'Home', 'Journals & eBooks', 'Articles by Disease', 'Marketing Opportunities', 'For Authors, Editors & Librarians', and 'Contact Us'. The main content area features a large section for 'Current Pharmaceutical Design' with a cover image, volume information (Volume 27, 46 Issues, 2021), ISSN numbers (1873-4286 Online, 1381-4128 Print), and a note that the journal supports open access. It displays an Impact Factor of 2.396 and a 5 Year Impact Factor of 3.575. A 'Subscribe to this Journal' button is present. To the right, there is a 'Topical Collection 5.3' badge and an 'EDITOR-IN-CHIEF' section for Alessandro Antonelli, with a 'Biography' link and a 'View Full Editorial Board' link. A 'Track Your Manuscript' form is located at the bottom left of the journal section.

The screenshot shows the MPS (Manuscript Processing System) interface. The top bar includes the 'MPS' logo, a search bar for 'Title, Reference Number or Author Name', and a user profile icon. A left sidebar contains navigation options: 'Esquela Tercera', 'Review Portal', 'User Portal', 'Dashboard', 'New Submission', 'Read & Publish', 'Support', and 'User Manual'. The main content area displays a table of 'NEWLY SUBMITTED ARTICLES'. The table has columns for 'Journal', 'Reference No.', 'Date', 'Title', and 'Status'. One article is listed with the following details:

Journal	Reference No.	Date	Title	Status
CPD	1883-CPD-3621-181	2021-04-14	Identification and antimicrobial activity of <i>Lasiodermatus</i> spp. isolated from the intestine of <i>Oncorhynchus mykiss</i> from the State of Mexico	Pending for Sci. Prata Approval

Below the table, it indicates 'Showing 1 to 1 of 1 entries' and includes 'Previous' and 'Next' navigation buttons.



esvieta tenorio <esvieta@gmail.com>

CPD Quick Track Notification | BMS-CPD-2021-197

1 message

Current Pharmaceutical Design <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Tue, Apr 13, 2021 at 8:57 PM

Reply-To: Current Pharmaceutical Design <cpd@benthamscience.net>

To: esvieta@gmail.com

Cc: cpd@benthamscience.net

Dear Dr. ESVIETA TENORIO BORROTO

Thank you very much for submitting your manuscript entitled "Identification and antagonist activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the intestine of *Oncorhynchus mykiss* from the State of Mexico." for consideration for publication in the journal "Current Pharmaceutical Design".

You may wish to avail our new fast publication services called QUICK TRACK which allows urgent publication of those papers that the authors feel require rapid publication.

QUICK TRACK allows online publication within 2 weeks of receipt of the final approved galley proofs from the authors. Similarly the manuscript can be published in the next forthcoming PRINT issue of the journal.

The total publication time, from date of first receipt of manuscript to its online publication is "10 weeks" subject to its acceptance by the referees and modification (if any) by the authors within one week.

Quick Track is a paid service. Should you decide to opt for the service, you would be charged a US \$300 (non-refundable processing fee) on receipt of your request form to cover the cost incurred for expedited peer-review of your submitted manuscript. Later, the Quick Track publication fee (US\$285 per composed page charges) will be payable before online publication of the article. If the article is rejected at peer-review, however, then the US\$285 per composed page charge will not apply.

Authors who opt for this fee-based service do not have to pay the page charge for Research Articles in addition. Moreover, authors who have availed Quick Track service in a BSP journal will be entitled for an exclusive 30% discount if they again wish to avail the same services in any BSP journal.

Authors who select the Quick Track publication option and also wish to have their article as Open Access Plus will avail a 50% discount off the journal open access publication fee.

Authors are encouraged to submit the revised manuscript within 48 hours for timely publication of their manuscript submitted in QUICK TRACK category.

If you would like to avail QUICK TRACK services, please send your confirmation by an e-mail at fasttrack@benthamscience.net or cpd@benthamscience.net.

We must receive this form in the next 4 working days before we can proceed with peer reviewing process.

Please note that whether you opt for the QUICK TRACK facility or not, standard reviewing practices will be followed, which will not in any way affect the acceptance or rejection of the manuscript by the reviewers.

Thank you in advance for your consideration. We look forward to hearing from you soon.

With kind regards,

Yours sincerely,

Editorial Office
Current Pharmaceutical Design
Bentham Science Publishers

Note: For complaints contact: complaint@benthamscience.net

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=7815633585&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1696979173033256005&siml=msg-f%3A16969791730...> 1/2

RESEARCH ARTICLE

Identification and antagonist activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the intestine of *Oncorhynchus mykiss* from the State of Mexico.

Diana Priscila Rodríguez-Villegas^a, Esvieta Tenorio-Boroto^{a*}, Celene Salgado-Miranda^a, Vladimir Kabardin^b, Alberto Barbabosa Pliego^a, Fabiola Rivera-Ramírez^c, Juan Carlos Vázquez-Chagoyán^a, Vicente Vega-Sánchez^d

^aCenter for Research and Advanced Studies in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicines and Animal Husbandry, Autonomous University of Mexico State, Km 15.5 Autopista de cuota Toluca – Atlacomulco; Toluca, Estado de México, México, 50295; ^bDepartment of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of the Basque Country UPV/EHU, 48940, Leioa, Spain; ^cTechnological University of the Valley of Toluca; ^dAutonomous University of Hidalgo State, Institute of Agricultural Sciences, Tulancingo 43600, Hidalgo, Mexico

ARTICLE HISTORY

Received
Revised
Accepted

DOI:

Abstract: Background: The selection of probiotics for aquaculture is generally based on different criteria, a more efficient selection method may be to use microorganisms isolated from the host where the probiotic is intended to be used. **Objective:** The goal of this study was to evaluate the antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from a healthy fish and compare their in vitro antagonist activity with respect four isolated pathogenic bacteria from *Aeromonas* genus. **Method:** *Lactobacillus* were isolated from rainbow trout gut using MRS agar, followed by antimicrobial susceptibility and antagonist activity against *Aeromonas* by the Kirby-Bauer disc diffusion test and the drop plate method, respectively. Genetic identification of the most promising strains was also. **Results:** 14 *Lactobacillus* strains were isolated from intestinal content of healthy rainbow trout. These strains were subjected to preliminary in vitro antibiotic sensitivity and antagonist activity tests. Of the 14 strains, 4 strains showed less sensitivity to Trimethoprim-sulfamethoxazole and Gentamicin, in addition 3 strains showed less sensitivity to Vancomycin. The 14 strains were tested against four pathogenic microorganisms, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas bestiarum*, and *Aeromonas sobria*. Half of the strains showed high antagonistic capacity. The intergenic region of the 16S – 23S rRNA gene of 7 strains was sequenced, these were identified with 100% similarity with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* and 97% with *Lactobacillus casei*. **Conclusion:** Here we present an approach to the isolation and characterization of probiotic candidates native to Rainbow Trout from the State of Mexico.

Keywords: *Lactobacillus* spp., *Oncorhynchus mykiss*, *Aeromonas*, probiotics.

1. INTRODUCTION

There is now global recognition that aquaculture production is expanding to a wide diversity of cultured finfish. Salmonids remain an important contributor to fish production in many countries, among which, Rainbow trout is also a popular salmonid fish species and has received great attention in terms of importance to aquaculture [1].

In the case of Mexico, the production of Rainbow Trout has been increasing in recent years, the average annual growth rate of production in the last 10 years is 5.99% [2] according to the Statistical Yearbook of Aquaculture and Fisheries published in 2018; the largest Trout producing State is the State of Mexico.

However, the aquaculture of this species is not exempt from the incidence of pathogens. In aquaculture, various species of *Aeromonas* infect crop species and produce significant economic losses [3]. In a study carried out in rainbow trout farms in Mexico to determine the frequency of

*Address correspondence to this author at the Center for Research and Advanced Studies in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicines and Animal Husbandry, Autonomous University of Mexico State, Km 15.5 Autopista de cuota Toluca - Atlacomulco; Toluca, Estado de México, México, 50295; E-mail: esvieta@gmail.com

bacterial isolates in cultured rainbow trout, it was found that bacteria of the genus *Aeromonas* were the most frequently isolated bacteria. The presence of these pathogens in aquaculture farms has economic and public health implications [4].

The use of probiotics or beneficial bacteria, which control pathogens through a variety of mechanisms, is increasingly viewed as an alternative to antibiotic treatment [5]. So one of the most important characteristic that probiotic microorganism must have, is the capacity of pathogens microorganisms exclusion and, as a first step, it requires *in vitro* antagonistic evaluation that allows in further studies the evaluation of *in vivo* effect [6]. Another of the characteristics to consider is the sensitivity to antibiotics by the proposed probiotic bacteria. The use and frequent overuse of antibiotics, including those used in human medicine, in fish farming has resulted in the emergence and spread of antibiotic resistant bacteria in the aquaculture environment. This possesses a threat to human and animal health due to the increase of acquired antibiotic resistance in fish pathogens, the transfer of their genetic determinants to bacteria of terrestrial animals and to human pathogens, and the alterations of the bacterial microbiota of the aquatic environment [7].

To date, most of the probiotics proposed for use in aquaculture belong to the LAB group (Lactic Acid Bacteria), in the selection of a microorganism with probiotic potential are considered different characteristics, additional studies have indicated that bacteria isolated from the species of appropriate fish can be an efficient method to select effective probiotics [8]; [9].

The goal of this study was to evaluate the antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains isolated from a healthy fish and compare their *in vitro* antagonist activity with respect four isolated pathogenic bacteria from *Aeromonas* genus.

2. MATERIALS AND METHOD (FOR RESEARCH ARTICLES ONLY)

2.1 Isolation and procedure Sampling LAB.

The trout (*Oncorhynchus mykiss*) samples were obtained from three aquaculture centers located in the State of Mexico. Selection criteria: Healthy trout without clinical signs of infection, fed without supplements or probiotics and different ages. The weight of trout ranges from 1 to 300 grams.

The isolation of bacteria was carried out after the euthanasia of the fish. Euthanasia was performed by immersion with the anesthetic tricaine methane sulfonate [10]. This euthanasia method was adopted for this study due to its efficacy, ease of use and operator safety. Also, it does not have deleterious effects on the trout. All efforts were made to minimize suffering. After removing the content of each section, 1g of each of the GIT was homogenized in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.2. Subsequently, serial logarithmic decimal dilutions were made from the sample collected from the intestine. The samples were homogenized and enriched in MRS agar plates (Man, Rogosa and Sharpe, DIBICO). The isolates were incubated at 25 °C for 48 h [11] to isolate lactic acid bacteria.

2.2 Phenotypic characterization

The pure cultures were characterized as LAB by Gram staining, cell morphology, catalase, and cytochrome oxidase reaction according to standard procedures. Isolate's gram positive, negative catalase and negative to cytochrome oxidase was selected. A cryopreservation procedure was used for the long-term storage of bacterial isolates obtained from the GIT samples at -80 °C in MRS broth plus 25% glycerol. The purified stocked cultures were resuscitated by sub-culturing twice in MRS broth before each use.

2.3 Genotypic characterization

2.3.1. DNA extraction

Thirty isolates were categorized phenotypically as possible *Lactobacillus*. DNA was extracted from pure cultures of every isolate using the GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions.

2.3.2. Primers and probes used in the PCR assay

In amplification, primers (OLIGO T4) were used based on an identified sequence specific to the genus *Lactobacillus* LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') and on the flanking terminal sequence of the 16S rRNA gene conserved among several bacteria, including the genus *Lactobacillus* R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') to amplify a region of approximately 250 bp of the 16S -23S rRNA intergenic spacer.

A PCR was performed with a final volume of 50 µl for each oligonucleotide, containing a concentration of 0.2 mM, 5 microliters of PCR buffer, 200 mM of deoxynucleotides (dNTPs), 2.5 µl of MgCl₂, 0.5 U of Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA), and about 100 ng of chromosomal DNA.

The reactions were carried out in a thermal cycler (Arctic TC A0096, Thermo Scientific) using the method reported by [12] under the following conditions: the samples were subjected to initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 20 or 30 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, alignment at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 30 s, and a final extension step for 7 min at 72 °C.

PCR products were analyzed by electrophoresis on 2.0% (w/v) agarose gels stained with GelRed (Biotium) and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad). GeneRuler (Thermo Scientific) was used as the molecular size marker.

The bands obtained from the different isolates were considered positive for the identification belonging to the genus *Lactobacillus* if they corresponded to a fragment of approximately 250 bp according to the control, the commercial probiotic Probiocilus (*Lactobacillus sporogenes*) was used as control.

2.4. Antibiotic susceptibility determination

The antibiotic resistance of the isolates was determined using the Kirby-Bauer disc diffusion test following the method described by manufacturer's instructions (Multibac I.D.). The bacterial inoculum was standardized to a concentration of 0.5 on the McFarland scale, and the agar plates were inoculated and incubated at 37 °C for 24 hours.

The antimicrobial susceptibility test discs (Multibac I.D.) used here had the following antibiotic dosages: 10 mcg of Ampicillin (AMP), 30 µg of Cephalothin (CEF), 5 µg of Ciprofloxacin (CIP), 30 µg Cefotaxime (CTX), 30 µg of Clindamycin (CLI), 1 µg of Dicloxacillin (DCX), 15 µg of Erythromycin (ERY), 10 µg of Gentamicin (GEN), 10 U of Penicillin (PEN), 30 µg of Tetracycline (TET), 25 µg of trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT) and 30 µg of Vancomycin (VAN) (Multibac I.D.).

The growth inhibition zones were measured and compared using interpretation tables, which was used to categorize the bacteria as resistant, intermediate or sensitive (Table 1). The inhibition zones were calculated in agreement with the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards and with [13] for the case of Ampicillin, Penicillin and Vancomycin.

Table 1. Comparison pattern of sensitivity halos in mm. (NCCLS).

Code - Antibiotic	Concentration	Resistance	Intermediate	Sensitive
Ampicillin (AMP) *	10 mcg	12	13-15	16
Cephalothin (CEF)	30 mcg	14	15-17	18
Cefotaxime (CTX)	30 mcg	14	15-22	23
Ciprofloxacin (CIP)	5 mcg	15	16-20	21
Clindamycin (CLI)	30 mcg	14	15-20	21
Dicloxacillin (DCX)	1 mcg	--	---	--
Erythromycin (ERY)	15 mcg	13	14-17	18
Gentamicin (GEN)	10 mcg	12	13-14	15
Penicillin (PEN) *	10 U	19	20-27	28
Tetracycline (TET)	30 mcg	14	15-18	19
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	25 mcg	10	11-15	16
Vancomycin (VAN) *	30 mcg	14	15-16	17

* [13]

2.5. Antagonistic assays

In vitro antagonistic activity of isolated *Lactobacillus* was evaluated, against 4 indicator strains pathogens (*Aeromonas*) using the agar well diffusion assay (WDAA). The *Aeromonas* isolates (Table 2) used in the study were donated by Dr. Vicente Vega-Sánchez from the Institute of Agricultural Sciences of the Autonomous University of the State of Hidalgo, these cultures were previously isolated and identified, obtained from skin lesions or internal tissues (spleen, liver or kidney) of rainbow trout [14].

Table 2. Isolated *Aeromonas* used in antagonism test.

Identification number	Microorganism	Origin of the isolate
394	<i>A. hydrophila</i>	Injury
359	<i>A. popoffii</i>	
353	<i>A. bestiarum</i>	Spleen
369	<i>A. sobria</i>	

Four days prior to screening, 10 mL of tryptic soy agar broth (TSA) was inoculated with *Aeromonas* isolates, while the isolate to be screened was inoculated 2 days prior to screening in 10 mL of MRS broth. Aliquots (2 mL) of each *Lactobacillus* isolate and a 2-mL aliquot of *Aeromonas* were adjusted to an optical density (OD) of 0.1 at 625 nm in a 15-mL centrifuge tube, correlating with 107 colony forming units (CFU) mL⁻¹ using the drop plate method [15]. The

TSA broth inoculated with *Aeromonas* (150 µL) was spread evenly on an agar plate and after solidifying and drying for 15–20 min, wells were punched (diameter, 5 mm) and 10 µL of every culture (approx. 10⁸–10⁹ CFU/ml) was added to wells in triplicates.

The plates were then incubated at 25 °C for 24–48 h. Once the *Aeromonas* lawn had grown, the zones of inhibition were measured, subtracting the diameter of the punched well, strains that presented halos above 2 mm diameter were considered as positive.

2.6. Intergenic region 16S-23S rRNA sequencing (Taxonomic identification)

The *Lactobacillus* isolates from the intestine of rainbow trout with inhibitory activity against the *Aeromonas* isolates tested and sensitivity towards the antibiotics tested, were taxonomically identified by DNA sequencing of the gene amplified by PCR encoding a fragment of the intergenic region 16S-23S rRNA.

PCR-amplifications were performed from total bacterial DNA purified using the GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific), in 50 µL reaction mixtures with 5 ng of purified DNA, 0.7 µmol l⁻¹ of each primer, and 25 µL of Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler. The methodology and primers mentioned above were used.

PCR products were analyzed by electrophoresis on 2.0% (w/v) agarose gels stained with GelRed (Biotium) and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad). GeneRuler (Thermo Scientific) was used as the

molecular size marker. The amplicons were purified by using the GeneJET PCR Purification kit (Thermo Scientific), and both DNA strands (forward and reverse) were sequenced at the Unidad SGIker UPV/EHU (Universidad del País Vasco, Spain).

2.7 Sequences analysis

Sequencing results were exported as FASTA sequence files. Analysis and comparison of intergenic region 16S- 23S rDNA sequences was performed with the BLAST program available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI; blast.ncbi.nlm.nih.gov). Only sequence identities above 97% were considered significant for bacterial identification at the species level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In total, 58 LAB strains were isolated from the GIT of apparently healthy trout (all from the intestine) based on their typical morphological appearance (small pinpointed and creamy white colonies), Gram-positive, catalase and cytochrome oxidase reaction and non-motile, coccus and rod-shaped characteristics. These (30) isolates were identified as acid lactic bacteria of which 14 were selected for antagonism and susceptibility experiments. *Lactobacillus* are acid-tolerant facultative anaerobes, and they are either homo- or heterofermentative. The genus *Lactobacillus* belongs to the normal mucosal microbiota of fish [16] This group of bacteria is important for maintaining the stability of the gastrointestinal tract, preventing intestinal infections and generally supporting intestinal health [17]. Some authors revealed that *Lactobacillus* was present in very low abundance (0.1%), but a higher proportion (1.15%) of *Lactobacillus* was displayed by the allochthonous microbiota in the DI of rainbow trout [18].

Lactobacillus species found in the gastrointestinal tract (GIT) have received a great deal of attention due to their health-promoting properties. By acidifying the intestines and through other antimicrobial mechanisms, they help to

eliminate unfavorable microflora and maintain a microbial balance [19].

3.1. Antimicrobial susceptibility testing

Fourteen isolates were highly sensitive to antimicrobial agents test (Table 3), but some showed less susceptibility. Some (28.5% n=4) lactic acid bacteria isolates showed light susceptibility to Trimethoprim-sulfamethoxazole and Gentamicin and (21.4% n=3) to Vancomycin. The isolates that showed less susceptibility are (AF, AN, AO, AR) to Trimethoprim-sulfamethoxazole, (AF, AM, AO, AP) to Gentamicin and (AM, AN, AR) to Vancomycin it is observed that there is a coincidence of the isolates as to their low susceptibility for these three antimicrobials. According to the established criteria, 100% of isolates were susceptible to Ampicillin (AMP), Cephalothin (CEF), Cefotaxime (CTX), Ciprofloxacin (CIP), Clindamycin (CLI), Dicloxacillin (DCX), Erythromycin (ERY), Penicillin (PEN) and Tetracycline (TET). Several papers report the susceptibility of *Lactobacillus* to different antimicrobial families, for example: Some isolates were shown sensitive to Amoxiclav, Cephalothin, Cotrimoxazole, Erythromycin, Tetracycline, Sulfamethizole, Amikacin, some isolates were displayed intermediate resistance to Cefuroxime, Clindamycin, Gentamicin, Vancomycin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin and prominent observation was resistance towards Ampicillin, Oxacillin denoted by the collect *Lactobacillus* spp. [20]. This research coincides with the slight sensitivity to Vancomycin and differs in that in this work *Lactobacillus* isolates have sensitivity to Ampicillin. The knowledge of the antimicrobial susceptibility or resistance is of interest to predict the behavior of an exogenously applied probiotic formula in subject to any type of chemotherapy, as well as to consider the concomitant use of the probiotic and antibiotics, for the restoration of the normal gastrointestinal flora [21].

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* isolate.

Antibiotic/Isolate	AD	AF	AG	AI	AJ	AJB	AL2	AM	AN	AO	AOB	AP	AR	ASI
Ampicillin (AMP)	18	18	18	20	18	18	20	17	20	20	20	20	18	20
Cephalothin (CEF)	25	22	25	25	25	25	25	22	25	25	22	25	25	25
Cefotaxime (CTX)	25	23	25	25	25	25	25	25	23	23	23	25	23	25
Ciprofloxacin (CIP)	24	25	24	26	24	24	26	26	24	24	24	26	24	26
Clindamycin (CLI)	24	25	24	28	24	24	28	25	24	25	24	28	25	28
Dicloxacillin (DCX)	16	16	15	15	15	16	15	15	15	15	15	15	15	16
Erythromycin (ERY)	22	22	20	20	20	22	22	20	22	22	22	22	22	20
Gentamicin (GEN)	18	13	16	16	16	18	18	13	18	13	16	13	16	18
Penicillin (PEN)	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Tetracycline (TET)	19	22	19	22	20	22	20	19	22	20	19	20	19	22
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)	18	15	18	20	18	18	20	20	15	15	20	18	15	20
Vancomycin (VAN)	18	17	18	17	17	17	17	15	15	17	17	17	15	18

The prophylaxis uses for infections caused by pathogens such as *Aeromonas* contribute to the frequent use of antibiotics in fish farming. Unfortunately, in many cases antibiotic therapy is not used rationally, which contributes greatly to the development of antibiotic resistance in bacteria, both pathogenic and not pathogenic. Antimicrobial resistance contributes to economic losses in aquaculture. In view of several drawbacks caused by prophylactic administration of antibiotics, strict regulations have been established to ban or minimize their application in aquaculture. As an alternative to antibiotics, Probiotics, prebiotics, symbiotic and medicinal plants, were among the most promising feed supplements for control or treatments of bacterial, viral, and parasitic diseases of fish and shellfish.

This work was conducted to know the resistance level of *Lactobacillus* isolated from the gastrointestinal tract of Mexican trout to design a probiotic that regulates the infection to *Aeromonas*. In this order it was checked the susceptibility to the tested antimicrobial of the *Lactobacillus* isolates was verified, since, some species, such as *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, and *Lactobacillus fermentum*, are inherently resistant to glycopeptides susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents [22]. *Lactobacillus* species are generally acid resistant and are able to survive ingestion. They are generally resistant to Metronidazole, Aminoglycosides and Ciprofloxacin with *L. acidophilus* being susceptible to Penicillin and Vancomycin, whereas *L. rhamnosus* and *L. casei* are resistant to Metronidazole and Vancomycin [23].

Nevertheless, the application of probiotics in aquaculture is considered a good alternative to the use of antibiotics thanks to the former's higher safety record and the beneficial reduction in the use of drugs and/or chemical substances.

3.2 Antagonistic assays between *Aeromonas* vs *Lactobacillus*

Microbial antagonism is a common phenomenon in nature [24] and plays a major role in reducing or eliminating the incidence of opportunistic pathogens in the gastrointestinal tract of aquatic animals [25]. Table 4 shows that the fourteen-acid lactic bacteria strain of Mexican trout show antagonist activity against *Aeromonas* but 50% showed high antagonist activity against *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*) extracted from spleen and injury Mexican Trout. These *Lactobacillus sp.* isolates belong to three species (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*), that exhibit antagonistic activity against *Aeromonas*. However, some species of *Aeromonas*, including *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. sobria*, are also regarded as common pathogens of fish because they may cause furunculosis and hemorrhagic septicemia [26]. In this study (Table 3) the lactic acid bacteria isolate that showed increased antagonistic activity against *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) was (AI, AD), *Aeromonas popoffii* (AD, AG, AJL, AM, AS), *Aeromonas bestiarum* (AJB, AI, AL, AO and AR) and *Aeromonas sobria* (AD, AG, AJL, AJB, AN, AL, AS).

Table 4. Antagonist activities of *Lactobacillus* isolated from trout intestine against *Aeromonas*.

Isolate	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas popoffii</i>	<i>Aeromonas bestiarum</i>	<i>Aeromonas sobria</i>
AD	****	****	***	****
AF	**	***	**	***
AG	***	****	***	****
AI	****	***	****	***
AJL	***	****	***	****
AJB	***	***	****	****
AL	***	***	****	****
AM	**	****	***	**
AN	**	***	***	****
AO	***	**	****	***
AOB	**	**	**	**
AP	**	**	***	**
AR	**	***	****	**
AS	***	****	***	****

-, 0 mm; (*) 2mm; *, 3-5 mm; **, 6-9 mm; ***, 10-15 mm; ****, >15; ***** >20mm.

A. hydrophila is a representative gram-negative opportunistic pathogen, can also cause various symptoms including tissue swelling, necrosis, ulceration septicemia and immunosuppression, resulting in hemorrhage and skin ulceration, detached scales, ascites, skin darkness, and exophthalmos in fish. In aquaculture, Gram positive bacteria and Gram-negative bacteria have been used to enhance the growth performance, digestive enzyme activity, and immunity. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), are Gram-positive, rod-shaped, and non-spore forming bacteria that can produce lactic acid. They are non-toxicogenic and non-pathogenic and possess potential immunostimulant activity [27]. The previous studies have covered the use of LGG as probiotics against *Aeromonas* in Tilapia (*Oreochromis spp.*) [28]. On the other hand, AHL lactonase AiiK is firstly expressed at the surface layer of *Lactobacillus casei* (LGC) MCJΔ1 via a cell wall-associated constitutive expression vector pELCW-aiiK. LcAiiK exhibited considerable AHL lactonase activity and displayed obvious QQ ability against *A. hydrophila* AH-1 and AH-4 by attenuating their swimming motility, virulence factor production, and biofilm formation instead of killing them [29].

The use of antagonistic bacteria is widely expected to become an alternative method for the prevention and control of bacterial disease in fish. Numerous studies have shown that bacteria can produce inhibitory substances that had the effect of inhibiting the bacterial pathogens in aquaculture systems [30]. Other studies have demonstrated that application of probiotics can promote both innate and adaptive immunity in fish. Among the most used probiotics are *Lactobacillus spp.*, from the lactic acid bacteria (LAB) family. The extensive available literature revealed beneficial effects of LABs as probiotic on growth performance, immune responses, and disease resistance shellfish. In additions, revealed beneficial effects on host's gut defenses which has vital importance in diseases prevention as well digestive tract inflammation treatment [31].

3.3. Intergenic region 16S-23S rRNA sequencing (Taxonomic identification)

Seven isolates with greater antagonist activity against *Aeromonas* and greater susceptibility to antibiotics were sequenced. The PCR product obtained was approximately 250 bp long and encompassed the 16S-23S spacer region rDNA Fig. 1, that were aligned in 16S-23S rRNA gene with three ATCC species of GenBank (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*) Table 5. The 7 isolates show 100% similarity with the *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* strains. For its part, only 97% similarity with *Lactobacillus casei*. However, use of 16S rRNA gene sequences as standard markers for the differentiation of *Lactobacillus* species offers a very limited scope, as several species of *Lactobacillus* share similar 16S rRNA gene sequences.

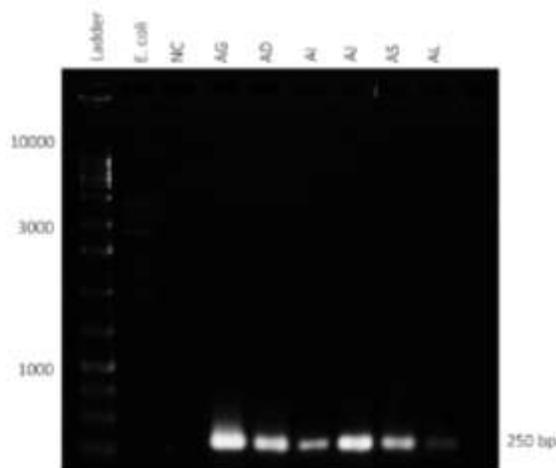


Fig. (1). Agarose gel showing experimental results (Isolation + Thermocyclization + PCR): Ladder, E. coli, NC = Negative Control, isolates: AG, AD, AI, AJ, AS, AL.

Table 5. Taxonomic Affiliation of LAB isolates from trout intestine based on the sequence of the intergenic region of the 16S-23S rRNA gene.

Isolate	Intergenic region of the 16S-23S rRNA gene	Top species match (GenBank accession number)	Similarity (%)
AD AG AL AS AI AJL AJB	5'CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAG AGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAA CCCTTTAGGGAGCGAGCCGCTAAGGTGG GACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCA CCTCCTTCTAAGGAAACAGACTGAAAGTCT GACGGAAACCTGCACACACGAAACTTTGTT AGTTTTGAG'3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain ATCC 11443 chromosomes, complete genome (CP022109.1)	100%
		<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 334, complete genome (CP000423.1)	100 %
		<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011 = JCM 1134 = ATCC 393 DNA, complete genome (AP012544.1)	99.09%

It was shown that 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparison can especially be useful in identifying closely related species, e.g., *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, and *Lactobacillus graminis* as well as *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus pentosus* [32].

In 7 out of 30 species, species-specific sequences could be found due to the similarity of the 16S–23S rRNA gene the taxonomy of *Lactobacilli* is constantly evolving along with molecular biology methods, and certain confusions arise. For instance, the status of the *Lactobacillus casei* group, which contains several probiotic bacteria, is not definite; the group comprises the species *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, and *L. zeae*, but most of the strains described as *L. casei* differ more from the species type strain (ATCC® 393) than from *L. paracasei* strains [33]. *Lactobacillus* belongs to the family *Lactobacillaceae* and consists of 170 species and 17 subspecies (Goldstein, Tyrrell et al. 2015). Another taxonomic report genus *Lactobacillus* comprises 261 species (at March 2020) that are extremely diverse at phenotypic, ecological and genotypic levels. This study evaluated the taxonomy of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* on the basis of whole genome sequences. Parameters that were evaluated included core genome phylogeny, (conserved) pairwise average amino acid identity, clade-specific signature genes, physiological criteria and the ecology of the organisms [34]. The generic term '*Lactobacilli*' will remain useful to designate all organisms that were classified as *Lactobacillaceae* until 2020. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*, together with *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, and *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* has the largest genome among the species of the *Lactobacillus* genus or the lactic acid bacteria (LAB) in general.

Lactobacillus rhamnosus is an anaerobic, facultative heterofermentative rod-shaped microorganism that is encountered in the fermentation of food and feed-raw materials, but also frequently found in the human and animal intestinal [35]. The species *L. rhamnosus* is closely related to

L. casei and *L. zeae*, and encompasses a genetically diverse group of strains, with a high frequency of discriminative polymorphisms in its core genome (SNPs and SAPs) and an impressive accessory genome or variome distribution [36]. The LAB includes, among others, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* species, that are collectively referred to as the *Lactobacillus casei* group. Due to the proximity of these species and the conservation of the 16S region, comparison of other regions is sometimes used to differentiate them [37]. Various molecular techniques have favored the differentiation of the *L. casei* group strains, but the literature reports the difficulty of this differentiation using the analysis of the 16S and 23S region. Other techniques have been used to establish the differences in addition to other variable regions [38]. Fig. 2 shows a network of interaction between sequences of the 16S RNA regions of the *Lactobacillus casei* group (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*) of Fish. Qualitative variables (Agency, Region 16s RNA, Source of Isolation, Institution and Country of Publication) were used in the design. The data were collected from GenBank to visualize the country where *Lactobacillus* sequences (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus casei*) is being reporting in fish. The figure shows that India has reported a wide variety of identified isolates from various fish structures by sequencing the 16S region. In this network were added the isolates obtained from Mexican trout intestine and identified within the group *L. casei*. In addition, the Mexican research center was dedicated to where the samples were processed. The application of probiotic *Lactobacillus* spp. in fish aquaculture has been extensively studied. Probiotic is a relatively new term which is used to name microorganisms that are associated with the beneficial effects for the host. In addition, some strains of *Lactobacillus* have beneficial health effects, in particular the protection of the gastrointestinal tracts against pathogens [39], and have been marketed for many years as probiotics in pharmaceuticals or functional foods.

- <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.
- [6] Monroy-dosta M, Ocampo-cervantes J. Use of five probiotic strains to determine sensitivity in vitro on pathogenic bacteria growth isolated from sick fishes. *Sick fishes* 2015;1:23–8.
- [7] Muñoz-Atienza E, Gómez-Salá B, Araújo C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, et al. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol* 2013;13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15>.
- [8] Kim DH, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 2006;21:513–24. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.02.007>.
- [9] Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzucla I, Mazquíz JL, Girones O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 2008;278:188–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>.
- [10] AVMA (American Veterinary Medical Association). *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. 2013.
- [11] Didinen BI, Onuk EE, Metin S, Cayli O. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. *Aquac Nutr* 2018;24:400–7. <https://doi.org/10.1111/ann.12571>.
- [12] Dubernet S, Desmarestres N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214:271–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x>.
- [13] Hana J, Chena D, Lie S, Lia X, Zhoud WW, Zhangb B, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Ital J Food Sci* 2015;27:282–9. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v270>.
- [14] Vega-Sánchez V, Acosta-Dibarrat J, Vega-Castillo F, Castro-Escarpullí G, Aguilera-Arreola MG, Soriano-Vargas E. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Trop* 2014;130:76–9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.021>.
- [15] Chen CY, Nace GW, Irwin PL. A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2003;55:475–9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5).
- [16] He S, Ran C, Qin C, Li S, Zhang H, de Vos WM, et al. Anti-Infective Effect of Adhesive Probiotic *Lactobacillus* in Fish is Correlated With Their Spatial Distribution in the Intestinal Tissue. *Sci Rep* 2017;7:13195. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13466-1>.
- [17] Lu Y, Zhang Z, Liang X, Chen Y, Zhang J, Yi H, et al. Study of gastrointestinal tract viability and motility via modulation of serotonin in a zebrafish model by probiotics. *Food Funct* 2019;10:7416–25. <https://doi.org/10.1039/c9fo02129a>.
- [18] Lyons PP, Turnbull JF, Dawson KA, Crumlish M. Phylogenetic and functional characterization of the distal intestinal microbiome of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from both farm and aquarium settings. *J Appl Microbiol* 2017;122:347–63. <https://doi.org/10.1111/jam.13347>.
- [19] Shoaib A, Dachang W, Xin Y. Determining the role of a probiotic in the restoration of intestinal microbial balance by molecular and cultural techniques. *Genet Mol Res* 2015;14:1526–37. <https://doi.org/10.4238/2015.February.20.8>.
- [20] Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomed J* 2017;40:270–83. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.008>.
- [21] Korhonen JM, Van Hoek AH, Saarela M, Huys G, Tosi L, Mayrhofer S, et al. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Benef Microbes* 2010;1:75–80. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0002>.
- [22] Zarazaga M, Sáenz Y, Portillo A, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Del Campo R, et al. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:3039–41. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.3039>.
- [23] Goldstein EJ, Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis* 2015;60 Suppl 2:S98–107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>.
- [24] Al-Fatimi MA, Jtlich WD, Jansen R, Lindequist U. Bioactive components of the traditionally used mushroom *Podaxis pistillaris*. *Evid Based Complement Altern Med* 2006;3:87–92. <https://doi.org/10.1093/ecam/nek008>.
- [25] Li J, Chen C, Zhang T, Liu W, Wang L, Chen Y, et al. Evaluation of microcystin-LR absorption using an in vivo intestine model and its effect on zebrafish

- intestine. *Aquat Toxicol* 2019;206:186–94. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.014>.
- [26] Barger PC, Liles MR, Newton JC. Type II Secretion Is Essential for Virulence of the Emerging Fish Pathogen, Hypervirulent. *Front Vet Sci* 2020;7:574113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.574113>.
- [27] Ngankala S, Satchasatoporn K, Setthawongsin C, Raksajit W. Histopathological study and intestinal mucous cell responses against. *Vet World* 2020;13:967–74. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.967-974>.
- [28] Sewaka M, Trullas C, Chotiko A, Rodkhum C, Chansue N, Boonamntanasarn S, et al. Efficacy of symbiotic Jerusalem artichoke and *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented diets on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology, immune parameters and protection against *Aeromonas veronii* in juvenile red tilapia (Ore. *Fish Shellfish Immunol* 2019;86:260–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.026>.
- [29] Dong W, Cai Y, Xu Z, Fu B, Chen Q, Cui Y, et al. Heterologous expression of AHL lactonase AiiK by *Lactobacillus casei* MCJΔ1 with great quorum quenching ability against *Aeromonas hydrophila* AH-1 and AH-4. *Microb Cell Fact* 2020;19:191. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01448-4>.
- [30] Hoseinifar SH, Sun YZ, Wang A, Zhou Z. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Microbiol* 2018;9:2429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>.
- [31] Azimirad M, Meshkini S, Ahmadifard N, Hoseinifar SH. The effects of feeding with symbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Fish Shellfish Immunol* 2016;54:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.001>.
- [32] Berthier F, Ehrlich SD. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett* 1998;161:97–106. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00055-X).
- [33] Dicks LM, Du Plessis EM, Dellaglio F, Lauer E. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46:337–40. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-337>.
- [34] Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020;70:2782–858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.
- [35] Darby TM, Naudin CR, Luo L, Jones RM. *Lactobacillus rhamnosus* GG-induced Expression of Leptin in the Intestine Orchestrates Epithelial Cell Proliferation. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;9:627–39. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.12.004>.
- [36] Ceapa C, Davids M, Ritari J, Lambert J, Wels M, Douillard FP, et al. The Variable Regions of *Lactobacillus rhamnosus* Genomes Reveal the Dynamic Evolution of Metabolic and Host-Adaptation Repertoires. *Genome Biol Evol* 2016;8:1889–905. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw123>.
- [37] Ward LJ, Timmins MJ. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:90–2. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x>.
- [38] Jarocki P, Komoń-Janczara E, Glibowska A, Dworniczak M, Pytko M, Korzeniowska-Kowal A, et al. Molecular Routes to Specific Identification of the *Lactobacillus Casei* Group at the Species, Subspecies and Strain Level. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082694>.
- [39] Elmer GW, Surawicz CM, McFarland L V. Biotherapeutic agents: A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *J Am Med Assoc* 1996;275:870–6. <https://doi.org/10.1001/jama.275.11.870>.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizaron varios ensayos para dar cumplimiento con la regulatoria establecida por la EFSA para el diseño y desarrollo de un probiótico para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Primero, se aislaron bacterias ácido lácticas del intestino de truchas aparentemente sanas y se caracterizaron fenotípica y genotípicamente para determinar que pertenecen al género *Lactobacillus*.

Los microorganismos empleados como probióticos en peces, se pueden aislar de varias fuentes, aunque la principal es el tracto digestivo (TD) de los animales acuáticos y el *mucus* (Soriano-Santos, 2020).

Es posible presumir que bacterias aisladas de los propios peces, tendrán mayor éxito que bacterias aisladas de fuentes terrestres, sin embargo, es preciso hacer una selección previa *in vitro* ya que obviamente. No todas las bacterias nativas de los peces tienen propiedades probióticas (Segura & Díaz, 2009).

Los microorganismos destinados a su uso como probióticos en la acuicultura deben ser considerados seguros no solo para los hospederos acuáticos sino también para los seres humanos y el ambiente que los rodea (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013).

Se evaluó la sensibilidad a los antibióticos de 14 aislados del género *Lactobacillus*, donde, el 100% de los aislamientos fueron susceptibles a ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), clindamicina (CLM), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), penicilina (PE) y tetraciclina (TE), sulfametoxazol/trimetropim (STX), Vancomicina (VA).

La susceptibilidad a los antimicrobianos por parte de los *Lactobacillus* es escasamente definida, debido a su complejidad taxonómica y en que se componen de los diferentes métodos recomendados por el *Clinical Laboratory Standards Institute* y la *International Dairy Foundation*. Su uso como probióticos para la prevención de la infección por *Clostridium difficile* prevalece entre los consumidores de todo el mundo, pero plantea la cuestión de sí el uso de cualquier antibiótico concurrente afectará su capacidad para que estos sobrevivan. Las especies de

Lactobacillus son generalmente ácidas, resistentes y pueden sobrevivir a la ingestión.

Por otra parte, se encontró en la literatura que la mayoría de las cepas de *L. rhamnosus* eran fenotípicamente susceptibles a los seis antibióticos probados (ampicilina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, estreptomicina y tetraciclina), cuatro de las cepas eran fenotípicamente multirresistentes, tres cepas a clindamicina, eritromicina y estreptomicina y una cepa a estreptomicina y tetraciclina (Korhonen *et al.*, 2010).

La mayoría de las especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente resistentes a los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina, estreptomicina y neomicina), ciprofloxacina y trimetoprima, y son susceptibles a penicilina y B-lactámicos, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, linezolid y quinupristina-dalfopristina (Abriouel *et al.*, 2015).

Los peligros para la salud pública relacionados con el uso de antimicrobianos en la acuicultura incluyen el desarrollo y propagación de bacterias y genes de resistencia a los antimicrobianos, y la aparición de residuos de antimicrobianos en productos de la acuicultura. El mayor riesgo potencial para la salud pública asociado con esto es que se cree que el uso de antimicrobianos en la acuicultura es el desarrollo de un reservorio de resistencia transferible (Fečkaninová *et al.*, 2017). Por lo que es importante evaluar los aislados de microorganismos propuestos como probióticos antes de sugerir su uso.

Las especies de *Lactobacillus* se utilizan ampliamente como probióticos y cultivos iniciadores, para una variedad de alimentos, respaldado por una larga historia de uso seguro. Aunque más de 35 especies cumplen con los criterios de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para la presunción calificada de estado de seguridad, la seguridad de las especies de *Lactobacillus* y su transporte de genes de resistencia a los antibióticos (AR) está bajo revisión *ad hoc* continua. Las especies de *Lactobacillus* generalmente se consideran no patógenas. Sin embargo, muchas de las especies examinadas en este estudio tienen niveles de resistencia a los antibióticos que superan los recomendados por la EFSA, lo que sugiere que

estos valores de corte debe reexaminarse a la luz de la base genética de la resistencia (Campedelli *et al.*, 2019).

El interés en los probióticos en la acuicultura, particularmente en el cultivo de trucha arcoíris, se ha centrado en las bacterias del ácido láctico (BAL), más notablemente en *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus faecium* y *Pediococcus* spp. (María Gabriela Sica *et al.*, 2012). Al colonizar la capa de moco intestinal, las bacterias del ácido láctico pueden servir como primera barrera de defensa contra bacterias patógenas invasoras (Ringo *et al.*, 1998).

Las BAL ejercen una fuerte actividad antagónica. contra muchos microorganismos relacionados y no relacionados, incluidos en el deterioro de los alimentos y los agentes patógenos. Los efectos antagónicos se deben principalmente a la disminución de la pH que producen, a la competencia por los nutrientes y a la producción de metabolitos inhibidores. Por lo tanto, las BAL han adquirido importancia en el campo de la profilaxis y también se propuso su uso para especies acuáticas que pueden proporcionar una forma alternativa de reducir la aplicación de antibióticos en la acuicultura (María G. Sica *et al.*, 2010).

La extensión, intensificación y diversificación de la acuicultura han aumentado la incidencia de brotes de enfermedades en las pocas décadas. La septicemia móvil de *Aeromonas*, es la más común entre las enfermedades bacterianas de los peces de agua dulce que se ha asociado con varias especies del género *Aeromonas* como: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. schuberti*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, etc. Entre estos, *A. hydrophila* y *A. sobria*, fueron documentados como agentes causales de mortalidad en peces a gran escala (Mukherjee *et al.*, 2017).

La virulencia de *Aeromonas* se puede atribuir a algunos factores, incluida la adhesión a células epiteliales, mediada a través de flagelos o estructuras proteicas de la membrana externa (Zhang *et al.*, 2020), reordenamiento citoesquelético del hospedador (Li *et al.*, 2013) y translocación en un modelo de cultivo celular) (Ringo *et al.*, 2004). Las cepas de *Aeromonas* también son capaces de producir toxinas. En general, estos son hemolíticos o enterotoxigénicos e incluyen aerolisina (AerA)

(Watanabe & Morita, 2020), hemolisina (HlyA) (Wang *et al.*, 2015), enterotoxina termolábil de *Aeromonas* (Alt), toxina termoestable (Ast) y citotoxina (Act).

En este trabajo, siete (50%) de las cepas aisladas mostraron alta actividad antagonista contra *Aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas popoffi*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas sobria*) extraídas de lesiones y bazo de trucha mexicana.

Las BAL pueden equilibrar el microbioma intestinal a través de la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, lisozimas y otros metabolitos que inhiben toxinas nocivas, además de proporcionar un mecanismo competitivo de eliminación en los sitios de unión de la mucosa intestinal evitando así la colonización y perturbando el metabolismo de microbios patógenos (Ngamkala *et al.*, 2020).

La adhesión se considera una característica deseable para una cepa probiótica, ya que puede promover la residencia intestinal de los probióticos, así como su interacción con las células inmunes y epiteliales del hospedero. La adhesión de cepas de *Lactobacillus* al moco y células epiteliales intestinales se ha informado en muchos estudios. Los componentes de la superficie celular de *Lactobacillus* [la proteína de unión al moco (MUB), LPXTG y *pili*] juegan un papel importante en la adherencia de los lactobacilos en el intestino, así como interacciones con el hospedero. *L. rhamnosus*, se adhiere a la mucosa intestinal a través de SpaC, una proteína del componente *pili*, que también podría inducir la generación epitelial de ROS y quinasa regulada por señales extracelulares. Esta proteína puede ser activada mediante señalización por mitógenos (ERK/MAPK) en enterocitos para beneficiar al hospedero.

Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 aumentó la resistencia a *Aeromonas salmonicida* ssp., reducción de mortalidad por furunculosis (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Los siete aislamientos que mostraron mayor sensibilidad a los antibióticos y mayor actividad antagonista hacia los patógenos del género *Aeromonas* utilizados, muestran un 100% de similitud con las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y

Lactobacillus paracasei, y solo el 97% de similitud con *Lactobacillus casei* con respecto a secuencias reportadas en GenBank.

En adición, *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* y *L. Rhamnosus* forman un grupo taxonómico estrechamente relacionado dentro de los lactobacilos heterofermentativos. Estas tres especies son difíciles de diferenciar utilizando perfiles de fermentación tradicionales. Se han desarrollado primers de PCR específicos para estas tres especies que se basan en diferencias en la región V1 del gen de ARNr 16S un primer de ADN polimórfico amplificado (RAPD) para diferenciar *L. paracasei* (Ward & Timmins, 1999).

9. CONCLUSIONES

- Los aislados de bacterias ácido-lácticas con actividad probiótica del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron positivos al género *Lactobacillus* en la identificación por medio de PCR.
- Los siete aislados de bacterias del género *Lactobacillus* pertenecientes a la microbiota autóctona de la trucha arcoíris (%) tienen la capacidad de inhibir *in vitro* a bacterias patógenas como: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas popoffi*, *Aeromonas bestiarum* y *Aeromonas sobria*.
- Los siete aislados pertenecientes al grupo *Lactobacillus casei*, que presentaron alta sensibilidad a los antibióticos y buena capacidad antagonista *in vitro* contra patógenos del género *Aeromonas* se proponen como posibles probióticos para los ensayos *in vivo*.
- Los *lactobacillus* aislados del intestino de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) pertenecen al grupo de *Lactobacillus casei*.
- Este estudio es el primer reporte sobre el aislamiento de *Lactobacillus* a partir del intestino de trucha de una granja acuícola del Estado de México.
- El valor del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis de maestría radica en la extensión del conocimiento de las propiedades probióticas de *Lactobacillus* aisladas de un hábitat no estudiado en nuestro país, para su potencial aplicación en la acuicultura.

RECOMENDACIONES

- Continuar con la investigación de las bacterias autóctonas de trucha arcoíris, ya que, se observaron cepas potencialmente benéficas, y hay otras que no fueron evaluadas en el presente estudio.
- Es esencial investigar más sobre la seguridad de estos posibles probióticos propuestos para su correcta aplicación en la acuicultura.
- Probar el potencial benéfico *in vivo* de las cepas que presentaron resultados favorables *in vitro*.
- Determinar el mecanismo de acción *in vitro* de las cepas seleccionadas y los efectos *in vivo* para definir su uso.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H., Casado Muñoz, M. del C., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Bockelmann, W., Pichner, R., Kabisch, J., Cho, G. S., Franz, C. M. A. P., Gálvez, A., & Benomar, N. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. In *Food Research International* (Vol. 78, pp. 465–481). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.016>
- AVMA. (2013). Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. In *AVMA. USA* (Issue January). <https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>
- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Mpuzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>
- Beltrán-Meza, M. C. (2017). Innovación en el sector acuícola. *Ra Ximhai*, 13(3), 351–364. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46154070020>
- Brunt, J., & Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28(12), 693–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00672.x>
- Burbank, D. R., Lapatra, S. E., Fornshell, G., & Cain, K. D. (2012). Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 35(11), 809–816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01432.x>
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>
- Castillo Miranda, A. Y. (2017). *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA Y*

GENÉTICA DE Flavobacterium psychrophilum. OBTENIDAS DE CASOS DE SÍNDROME DEL ALEVÍN DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (RTFS). Universidad Autónoma del Estado de México.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species. *Journal of Food Protection*, 61(12), 1636–1643. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.12.1636>
- Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 475–479. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00194-5)
- CONAPESCA. (2018). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2018. In SAGARPA. https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO_2018.pdf
- Didinen, B. I., Onuk, E. E., Metin, S., & Cayli, O. (2018). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 400–407. <https://doi.org/10.1111/anu.12571>
- Dionicio Mendoza, J. B. (2019). *Empaquetado al alto vacío de trucha arcoíris para comercialización en el mercado interno, Estado de México 2019*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Dixon, B. (2000). La Biología De La Resistencia a Los Antibioticos En Acuicultura. In *Panorama Acuícola* (p. 3). http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/acuicultura/publicaciones/_archivos//110714_La Biología de la resistencia a los antibióticos en Acuicultura.pdf
- Dubernet, S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 271–275. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x>

- Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Popelka, P., & Toropilová, J. (2017). The use of probiotic bacteria against *Aeromonas* infections in salmonid aquaculture. *Aquaculture*, 469, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.042>
- García, M., Campa, Á., Saucedo, P., Casanova, M., Medina, R., & Mazón, J. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Veterinary World*, 8(2), 170–176. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.170-176>
- Gomez-Gil, B., Roque, A., & Turnbull, J. F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1–3), 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00431-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00431-2)
- INAES. (2018). *Acuicultura, historia y actualidad en México*. Blog.
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). *Irianto_et_al-2002-Journal_of_Fish_Diseases.pdf*. 333–342.
- Korhonen, J. M., Van Hoek, A. H., Saarela, M., Huys, G., Tosi, L., Mayrhofer, S., & Wright, A. V. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Benef Microbes*, 1(1), 75–80. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0002>
- Li, C., Beck, B., Su, B., Terhune, J., & Peatman, E. (2013). Early mucosal responses in blue catfish (*Ictalurus furcatus*) skin to *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.002>
- Liaskovskii, T. M., & Podgorskii, V. S. (2005). Assessment of probiotics according to the international organizations (FAO/WHO). *Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)*, 67(6).
- Mata López, S. (2017). *Flavobacterium psychrophilum COMO PATÓGENO EMERGENTE EN PISCICULTURA*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T. M., Bøgwald, J., Castex, M., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of

probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1–2), 1–18.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>

Mukherjee, A., Dutta, D., Banerjee, S., Ringø, E., Breines, E. M., Hareide, E., Chandra, G., & Ghosh, K. (2017). Culturable autochthonous gut bacteria in rohu, *Labeo rohita*. In vitro growth inhibition against pathogenic *Aeromonas* spp., stability in gut, bio-safety and identification by 16S rRNA gene sequencing. *Symbiosis*, 73(3). <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0474-7>

Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., Del Campo, R., Hernández, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15>

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>

Ng, W. K., Kim, Y. C., Romano, N., Koh, C. B., & Yang, S. Y. (2014). Effects of Dietary Probiotics on the Growth and Feeding Efficiency of Red Hybrid Tilapia, *Oreochromis* sp., and Subsequent Resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Applied Aquaculture*, 26(1), 22–31. <https://doi.org/10.1080/10454438.2013.874961>

Ngamkala, S., Satchasataporn, K., Setthawongsin, C., & Raksajit, W. (2020). Histopathological study and intestinal mucous cell responses against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia administered with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Veterinary World*, 13(5). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.967-974>

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., & Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198(3–4). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00593-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00593-2)

Patil, R., Jeyasekaran, G., Shanmugam, S. A., & Jeya Shakila, R. (2001). Control of

bacterial pathogens, associated with fish diseases, by antagonistic marine actinomycetes isolated from marine sediments. *Indian Journal of Marine Sciences*, 30 (4), 264–267.

Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., & Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>

Ragash, M. (2009). *Manual de Crianza de Trucha (Oncorhynchus mykiss)*. [http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/peces/trucha/Manual de crianza truchas.pdf](http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/peces/trucha/Manual%20de%20crianza%20truchas.pdf)

Ringo, E., Bendiksen, H. R., Gausen, S. J., Sundsfjord, A., & Olsen, R. E. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 855–864. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00595.x>

Ringø, E., Jutfelt, F., Kanapathipillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T. M., Myklebust, R., & Olsen, R. E. (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research*, 318(2). <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0934-2>

SAGARPA. (2012). *Carta Nacional Acuícola*.

Salgado-Miranda, C., Palomares, E., Jurado, M., Marín, A., Vega, F., & Soriano-Vargas, E. (2010). Isolation and Distribution of Bacterial Flora in Farmed Rainbow Trout from Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(4), 244–247. <https://doi.org/10.1577/H09-004.1>

Segura, C. N., & Díaz, L. M. V. (2009). *Aislamiento, identificación y valoración In vitro del potencial probiótico de cepas bacterianas nativas de Tilapia nilótica (Oreochromis niloticus)*. http://unicornio.utadeo.edu.co/tesis/biologia_marina/T911.pdf

- SENASICA. (2003). *Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuicola de Trucha par la Inocuidad Alimentaria*.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. In *Food Microbiology* (Vol. 27, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Sica, María G., Olivera, N. L., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., López Cazorla, A. C., & Cubitto, M. A. (2010). Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3), 387–397. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572010000300003>
- Sica, María Gabriela, Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., & Cubitto, M. A. (2012). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(4), 869–879. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9703-5>
- Soriano-Santos, J. (2020). *Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión The probiotics and their metabolites in aquaculture. A review*. 30(1), 93–105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/>
- Vega-Sánchez, V., Acosta-Dibarrat, J., Vega-Castillo, F., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., & Soriano-Vargas, E. (2014). Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Tropica*, 130(1), 76–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.021>
- Wang, N., Wu, Y., Pang, M., Liu, J., Lu, C., & Liu, Y. (2015). Protective efficacy of recombinant hemolysin co-regulated protein (Hcp) of *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 46(2). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.019>
- Ward, L. J., & Timmins, M. J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*,

Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 29(2), 90–92. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x>

Watanabe, N., & Morita, K. (2020). Diversity in gene arrangement in a DNA region lacking aerA in clinical and environmental *Aeromonas hydrophila* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(1). <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01318-z>

Zepeda-Velázquez, A. P. (2015). *Aeromonas* spp. : la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *AquaTIC*, 42, 1–16.

Zhang, L., Song, M., Yang, N., Zhang, X., Abbas Raza, S. H., Jia, K., Tian, J., Zhang, Y., Zhang, D., Shi, Q., Wu, T., Kang, Y., Hou, G., Qian, A., Wang, G., & Shan, X. (2020). Nucleoside Diphosphate Kinases (ndk) reveals a key role in adhesion and virulence of *Aeromonas veronii*. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104577. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104577>

11. ANEXOS

ANEXO 1. Ficha técnica medio de cultivo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS).



MEDIO DE CULTIVO
Bacteriología General
Catálogo 1267

AGAR MRS (DE MAN, ROGOSA Y SHARPE)

USO

Para cultivo, aislamiento y cuenta de *Lactobacilos* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO

El contenido de peptona, extracto de carne y de levadura proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El polisorbato 80, el magnesio y manganeso actúan favoreciendo el crecimiento óptimo de los *Lactobacilos*. La dextrosa es la fuente de energía. El fosfato de sodio ayuda a controlar el pH. El acetato de sodio junto con el valor del pH del medio de cultivo inhiben considerablemente la flora acompañante.

Sembrar el medio de cultivo con la muestra de ensayo directamente o a partir del Caldo MRS previamente inoculado e incubado. Se recomienda para mejores resultados el método de vaciado en placa. Incubar 24 – 72 h a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en atmósfera con 5% de CO_2 .

NOTA : La superficie de las placas no debe dejarse secar, porque la concentración de acetato de sodio aumenta y por consecuencia es inhibido el crecimiento de *Lactobacilos*.

Lectura de resultados: Efectuar la cuenta de colonias. Los *Lactobacilos* deben ser identificados de acuerdo a sus características bioquímicas

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Acetato de sodio	5.0	Fosfato disódico	2.0
Agar	12.0	Peptona proteosa No. 3	10.0
Citrato de amonio	2.0	Polisorbato (Tween 80)	1.0
Dextrosa	20.0	Sulfato de magnesio	0.1
Extracto de carne	10.0	Sulfato de manganeso	0.05
Extracto de levadura	5.0		

pH 6.5 ± 0.2

PREPARACION

Rehidratar 67 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C . Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C .

NOTA: La superficie de las placas no debe secarse, porque aumenta la concentración de acetato en la superficie y se inhibe el crecimiento de *Lactobacilos*.

CONTROL DE ACTIVIDAD

MICROORGANISMO	CEPA	CRECIMIENTO
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 8291	Buena
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	Buena
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	Buena
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 9338	Buena
<i>Pediococcus damnosus</i>	ATCC 29358	Buena

BIBLIOGRAFIA

Rogosa, M. Mitchell, J. A. , a Wiseman,, RR. F. : A selective medium fo the isolation of oral and fecal lactobacilli. J. Bact. , 62 : 132 – 133. 1951

Sharpe, M. E. : Selective media for the isolation and enumeration of lactobacilli. Lab. Practice, 9 : 223 – 227. 1960

ANEXO 2. Protocolo para Tinción diferencial de bacterias.

EQUIPO DE COLORANTES PARA TINCIÓN DIFERENCIAL DE BACTERIAS

MANEJO DE LA MUESTRA

1. Preferentemente el espécimen deberá ser tomado previo a la tinción.
2. Realizar una extensión en un porta objetos desengrasado con suficiente muestra y seque en posición vertical a temperatura ambiente.
3. Fijar la muestra con calor.

SUGERENCIAS DE TINCIÓN

1. En los enjuagues de agua corriente, puede sustituir por agua destilada para evitar la adherencia de partículas y sales duras.
2. Causas de precipitados en la placa: Lavado inadecuado, dejar que el colorante seque sobre la lamina o porta objetos sucio.

PROCEDIMIENTO

1. Coloque la placa en una gradilla de tinción.
2. Cubra el frotis con colorante Violeta de Genciana y espere **1 minuto**.
3. Escurre el colorante de Violeta de Genciana sin enjuagar, cubra con solución Yodo Gram y espere **1 minuto**.
4. Lave con solución de Acetona-alcohol mezcla para decolorar, deje actuar de 5-15 seg. en frotis delgados y de 15 - 60 seg. en frotis gruesos.
5. Enjuagar para remover restos del decolorante.
6. Cubra el frotis con colorante Safranina y esperar **1 minuto**.
7. Lavar repetidas veces con agua corriente o destilada hasta aclarar.
8. Secar al aire y observar al microscopio con objetivo 100 X.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

BACTERIAS	COLOR
Gram Positivas (+)	Morado azulado
Gram Negativas (-)	Rojo

BIBLIOGRAFIA

1. Clark, George. et. al., STAINING PROCEDURES, Editorial Williams & Wilkins, Fourth edition, 1980, P. 375-378.
2. Lynch, Raphael, Mellor, Spare & Inwood, METODOS DE LABORATORIO, Editorial Interamericana, 2a. Edición 1978.

ANEXO 3. Protocolo de extracción de ADN. GeneJET Genomic DNA Purification Kit.

E. Gram-Positive Bacteria Genomic DNA Purification Protocol

Before starting

Prepare Gram-positive bacteria lysis buffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, add lysozyme to 20 mg/mL immediately before use.

Step	Procedure
1	Harvest up to 2×10^8 bacterial cells in a 1.5 or 2 mL microcentrifuge tube by centrifugation for 10 min at $5000 \times g$. Discard the supernatant.
2	Resuspend the pellet in 180 μ L of Gram-positive bacteria lysis buffer. Incubate for 30 min at 37 °C.
3	Add 200 μ L of Lysis Solution and 20 μ L of Proteinase K. Mix thoroughly by vortexing or pipetting to obtain a uniform suspension.
4	Incubate the sample at 56 °C while vortexing occasionally or use a shaking water bath, rocking platform or thermomixer until the cells are completely lysed (~30 min).
5	Add 20 μ L of RNase A Solution, mix by vortexing and incubate the mixture for 10 min at room temperature.
6	Add 400 μ L of 50% ethanol and mix by pipetting or vortexing.
7	Transfer the prepared lysate to a GeneJET Genomic DNA Purification Column inserted in a collection tube. Centrifuge the column for 1 min at $6000 \times g$. Discard the collection tube containing the flow-through solution. Place the GeneJET Genomic DNA Purification Column into a new 2 mL collection tube (included). Note. Close the bag with GeneJET Genomic DNA Purification Columns tightly after each use!
8	Add 500 μ L of Wash Buffer I (with ethanol added). Centrifuge for 1 min at $8000 \times g$. Discard the flow-through and place the purification column back into the collection tube.
9	Add 500 μ L of Wash Buffer II (with ethanol added) to the GeneJET Genomic DNA Purification Column. Centrifuge for 3 min at maximum speed ($\geq 12000 \times g$). <i>Optional.</i> If residual solution is seen in the purification column, empty the collection tube and re-spin the column for 1 min. at maximum speed. Discard the collection tube containing the flow-through solution and transfer the GeneJET Genomic DNA Purification Column to a sterile 1.5 mL microcentrifuge tube (not included).
10	Add 200 μ L of Elution Buffer to the center of the GeneJET Genomic DNA Purification Column membrane to elute genomic DNA. Incubate for 2 min at room temperature and centrifuge for 1 min at $8000 \times g$. Note • For maximum DNA yield, repeat the elution step with additional 200 μ L of Elution Buffer. • If more concentrated DNA is required or DNA is isolated from a small amount of starting material the volume of the Elution Buffer added to the column can be reduced to 50-100 μ L. Please be aware that smaller volumes of Elution Buffer will result in smaller final quantity of eluted DNA.
11	Discard the purification column. Use the purified DNA immediately in downstream applications or store at -20 °C.

ANEXO 4. Protocolo de determinación de susceptibilidad a antibióticos. Multibac I.D.



ABEL GUTIERREZ RAMOS
INVESTIGACION
DIAGNOSTICA

LABORATORIO DE REACTIVOS PARA DIAGNOSTICO

MULTIBAC I.D.

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es la evaluación en el laboratorio de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su sensibilidad al mismo como una predicción de su eficacia clínica. El antibiograma define la actividad "in Vitro" de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y manifiesta su capacidad para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. Por consiguiente, ofrece en su conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos. El panorama actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito (por el momento) mecanismos de resistencia. Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente normalizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Para efectos de reproducibilidad y práctica rutinaria, las pruebas semicuantitativas de difusión en agar nos brindan la información suficiente para la elección y seguimiento del tratamiento con antimicrobianos.

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos usados más comúnmente.

El método de difusión en agar es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias de crecimiento rápido como: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Acinetobacter* sp, etc.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El antibiograma por la técnica de difusión en agar (disco-placa) basado en las investigaciones de Bauer-Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una caja de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico se difunde radialmente, a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas, de 18 a 24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración del antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI), obtenida por métodos de dilución.

MÉTODO

Medios, materiales y equipo necesario:

- Medio de cultivo Mueller-Hinton Agar.
- Solución salina isotónica estéril.
- Tubos de ensayo estériles.
- Hisopos de algodón, estériles.
- Cajas de petri estériles.
- Pinzas de disección.

- Multidiscos o sensidiscos conteniendo la concentración adecuada de antimicrobiano.

PROCEDIMIENTO

1. Preparación del inóculo: recoger con un asa microbiológica, de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 5 ml. De medio líquido (infusión cerebro-corazón, caldo Todd Hewitt, caldo soya tripticasa, etc.) e incubar a 35°C. Durante 2 hasta 6 horas, conseguir o superar turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Si la turbidez es superior, se realiza el ajuste necesario con solución salina estéril.

El estándar de sulfato de bario de MacFarland, se prepara mezclando: 0.5 ml. de cloruro de bario 0.048 M. (1.175% peso/volumen de cloruro de bario dihidratado con: 99.5 ml. De H₂SO₄ al 1% v/v [0.36 N.]) Esto es la mitad de la densidad del tubo no.1 de MacFarland y se denomina 0.5 úe MacFarland.

2. Preparar el medio de Muller-Hinton agar y depositar aproximadamente 25 ml. del medio, sobre las cajas de petri estériles de 90 mm de diámetro (si las cajas fuesen de mayor diámetro, calcular el volumen necesario para obtener un grosor de la placa de agar de aproximadamente 4mm). Las placas pueden guardarse en refrigeración hasta su uso debiendo tener la precaución de que no almacenen agua de condensación. Para microorganismos exigentes, se puede adicionar al medio, sangre de camero desfibrinada estéril al 5%.

3. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un hisopo de algodón estéril dentro de la suspensión y al retirarlo, rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

4. Inocular las placas de Muller-Hinton agar completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

5. Colocar los discos con dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición.

6. Incubar las placas invertidas a 35°C. En atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. Las placas se incubarán 16-18 horas.

LECTURA DE LOS RESULTADOS

Después de 18 horas de incubación, leer el diámetro de las zonas completas de inhibición con una regla. Las zonas de los medios transparentes se miden sobre el reverso de la placa y los medios que contienen sangre, sobre la superficie del agar.

Cuando aparecen colonias dentro del halo de inhibición, puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos y conviene volver a identificarlas y realizar otra vez el ensayo de sensibilidad antimicrobiana.

ANEXO 5. Protocolo de purificación de ADN producto de PCR. GeneJET Genomic DNA Purification Kit.

PURIFICATION PROTOCOLS

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p. 3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at **>12000 × g** (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

Protocol A. DNA purification using centrifuge

Step	Procedure
1	Add a 1:1 volume of Binding Buffer to completed PCR mixture (e.g. for every 100 µL of reaction mixture, add 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly. Check the color of the solution. A yellow color indicates an optimal pH for DNA binding. If the color of the solution is orange or violet, add 10 µL of 3 M sodium acetate, pH 5.2 solution and mix. The color of the mix will become yellow.
2 for DNA ≤500 bp	Optional: if the DNA fragment is ≤500 bp, add a 1:2 volume of 100% isopropanol (e.g., 100 µL of isopropanol should be added to 100 µL of PCR mixture combined with 100 µL of Binding Buffer). Mix thoroughly. Note. If PCR mixture contains primer-dimers, purification without isopropanol is recommended. However, the yield of the target DNA fragment will be lower.
3	Transfer up to 800 µL of the solution from step 1 (or optional step 2) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through. Notes. If the total volume exceeds 800 µL, the solution can be added to the column in stages. After the addition of 800 µL of solution, centrifuge the column for 30-60 s and discard flow-through. Repeat until the entire solution has been added to the column membrane. Close the bag with GeneJET Purification Columns tightly after each use!
4	Add 700 µL of Wash Buffer (diluted with the ethanol as described on p. 3) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 30-60 s. Discard the flow-through and place the purification column back into the collection tube.
5	Centrifuge the empty GeneJET purification column for an additional 1 min to completely remove any residual wash buffer. Note. This step is essential as the presence of residual ethanol in the DNA sample may inhibit subsequent reactions.
6	Transfer the GeneJET purification column to a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add 50 µL of Elution Buffer to the center of the GeneJET purification column membrane and centrifuge for 1 min. Note <ul style="list-style-type: none"> • For low DNA amounts the elution volumes can be reduced to increase DNA concentration. An elution volume between 20-50 µL does not significantly reduce the DNA yield. However, elution volumes less than 10 µL are not recommended. • If DNA fragment is >10 kb, prewarm Elution Buffer to 65 °C before applying to column. • If the elution volume is 10 µL and DNA amount is ≥5 µg, incubate column for 1 min at room temperature before centrifugation.
7	Discard the GeneJET purification column and store the purified DNA at -20 °C.