

El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (in vitro), aisladas de peces enfermos.

Monroy-Dosta MC,* Castro-Mejía J, Castro-Mejía G, De Lara-Andrade R, Ocampo-Cervantes JA y Cruz-Cruz I.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Licenciatura en Biología. Departamento El Hombre y su Ambiente. Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, México, D.F. C.P. 04960.

Email responsable: monroydosta@hotmail.com

RESUMEN

La acuicultura de especies ornamentales es una actividad económica en franco crecimiento, tanto a nivel mundial como en México, en donde tiene particular desarrollo lo correspondiente a especies dulceacuícolas. Las enfermedades infecciosas producidas por hongos, bacterias y virus, están consideradas una de las limitantes principales durante el proceso productivo. Entre las estrategias implementadas para disminuir el uso de antibióticos para el control de patógenos, se encuentra el control biológico mediante el uso de organismos probióticos, los cuales son "microorganismos vivos los cuales, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del hospedador"; entre los de uso más común en acuicultura se encuentran las lactobacterias y las levaduras. En el presente trabajo, se probó el efecto de bacterias probióticas aisladas del tracto digestivo de peces sanos, pertenecientes a las especies: *Bacillus* sp., *Bacillus laterosporus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp, y *Lactococcus lactis*, a diferentes diluciones (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4) en el crecimiento *in vitro* de las bacterias patógenas: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakasaki*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* y *Vibrio fluvialis*, aisladas del riñón de peces enfermos, cultivadas y purificadas a través de resiembras sucesivas e identificadas mediante la amplificación del gen 16S del ARNr (PCR) utilizando los primers universales 8 for. (5'-AGACTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1492 rev. (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') y su comparación con la base de secuencias GENE BANK. Las cepas probióticas fueron aisladas previamente del tracto intestinal de diversos peces sanos en el laboratorio. Para llevar a cabo las pruebas de desafío *in vitro*, las cepas patógenas se sembraron por triplicado en cajas de agar BHI a una concentración de 1×10^7 UFC mL⁻¹ y posteriormente, utilizando el método

de difusión en pozos, se adicionaron 70 µL de una suspensión con cada una de las cepas probióticas. Las placas se incubaron durante 24 h a 30°C para observar la formación de halos de inhibición. Los valores obtenidos de los halos de inhibición fueron transformados a datos cualitativos con la siguiente premisa: diámetro halo < 2.0 mm efecto negativo; diámetro de halo > 2.0 mm efecto positivo. En este estudio, se determinó que la cepa probiótica *B. subtilis* fue la que dio mejores resultados al inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas *P. vulgaris*, *E. sakasaki*, *V. fluvialis*, *K. oxytoca* y *C. freundii* en la mayoría de las diluciones utilizadas. Por lo que es una cepa con alto potencial en acuicultura.

Palabras clave: Crecimiento, halos, probióticos, bacterias, sensibilidad.

ABSTRACT

Ornamental aquaculture is an activity in clear economic growth, both globally and in Mexico where the development is particularly relevant to freshwater species. Infectious diseases produced by fungus, bacteria and virus are considered one of the principal limitations during the productive process. Between implemented strategies for reduction of antibiotic use, which are "living microorganisms that confer a health benefit to the host if they are given in adequate quantities"; lactic acid bacteria and yeast are among the most common used microorganism in aquaculture. This investigation, prove the effect of isolated probiotic bacteria from the digestive tract of healthy fish, belonging to specie: *Bacillus* sp., *Bacillus laterosporus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp, and *Lactococcus lactis*, at different dilutions (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 and 10^4) *in vitro* growth of pathogenic bacteria: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakasaki*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, and *Vibrio fluvialis*,

isolated from kidney of sick fish, cultured and purified through successive inoculations and identified by the amplification of gene 16S of rRNA (PCR) using universal primers 8 for. (5'-AGACTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1492 rev. (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') and comparison with GENE BANK sequences base. Probiotic strains were previously isolated from the digestive tract of different healthy fish in the laboratory. In order to perform in vitro challenge tests, pathogenic strains were inoculated three times each in BHI agar boxes at a concentration of 1×10^7 CFU mL⁻¹ and subsequently using the well diffusion method, 70 µL from a suspension with each of the probiotic strains were added. Agar boxes were incubated 24 h at 30°C to observe the formation of inhibition halos. Obtained values from inhibition halos were transformed to qualitative data with the following premise: halo diameter < 2.0 mm negative effect; halo diameter > 2.0 mm positive effect. In this study, it was determined that probiotic strains *B. subtilis* was the one that gave better results to inhibit the growth of pathogenic bacteria *P. vulgaris*, *E. sakazakii*, *V. fluvialis*, *K. oxytoca* and *C. freundii* in most of used dilutions. Making it a strain with high potential in aquaculture.

Key words: Growth, halos, probiotics, bacteria, sensibility.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura de ornato se ha convertido en una actividad productiva con un alto potencial a nivel mundial, México no es la excepción, ya que en nuestro país se comercializan alrededor de 43 millones de peces de ornato primordialmente de agua dulce, de los cuales se importa el 46% y el restante (54%) se produce en más de 250 granjas acuícolas nacionales (SAGARPA 2012). Sin embargo; una de las principales dificultades que existe en el cultivo de especies ornamentales es la aparición de enfermedades infecciosas como resultado de la incidencia de bacterias, hongos y virus frecuentemente asociados con el aumento en las densidades de cultivo y deficiencias en los métodos de manejo, calidad de aguas, valor nutricional del alimento, entre otros factores (Paillard et al. 2004; Pruzzo et al. 2005).

Debido a lo anterior, el aspecto sanitario es primordial en los sistemas de producción acuícola,

que hasta hoy en día siguen haciendo uso de químicos y antibióticos para el control de los procesos infecciosos, aun cuando este procedimiento se asocia a impactos ambientales negativos, cuando dichos compuestos quedan disponibles para la fauna nativa, cuerpos de agua y sedimentos aledaños, además de favorecer la resistencia bacteriana en los organismos cultivados (Carnevia et al. 2010). Por tal motivo, se han establecido métodos de reemplazo del control de patógenos con antibióticos mediante el control biológico, el cual representa una interesante oportunidad desde el punto de vista científico, ambiental y económico (López y Cruz 2011).

De este modo surge el interés del uso de probióticos, definidos como "microorganismos vivos los cuales administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del hospedador" (FAO, 2006). El desarrollo de probióticos adecuados no es una tarea simple, requiere de investigación científica con pruebas a gran escala y el desarrollo de instrumentos apropiados de monitoreo (World Gastroenterology Organization 2008; Castro et al. 2011). Los probióticos comúnmente usados en acuicultura incluyen un amplio rango de taxa, desde bacterias lácticas hasta otros microorganismos como levaduras, sin embargo hoy en día los estudios se enfocan a la obtención de probióticos específicos, ya que estos podrían incrementar los beneficios (Monroy et al. 2012).

Una de las características más importantes que debe poseer un microorganismo probiótico es la capacidad de exclusión de microorganismos patógenos y como primer paso se requiere la evaluación antagonica *in vitro*, que permita en estudios posteriores evaluar su efecto *in vivo*. Por lo que el objetivo de esta investigación fue el comparar la inhibición del crecimiento *in vitro*, de cinco bacterias patógenas aisladas de peces de ornato con signos de infección por cepas probióticas, aisladas de peces sanos.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de peces enfermos

Sensibilidad de cinco cepas probióticas

Monroy-Dosta MC, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G, De Lara-Andrade R, Ocampo-Cervantes JA y Cruz-Cruz I.

Para esta investigación se obtuvieron 50 peces de ornato de una granja de peces de Chinconcuac, Estado de Morelos, los cuales mostraron un comportamiento anormal como boqueo, nado errático o poca movilidad y lesiones como hemorragia en la base de las aletas, en los ojos o branquias, exoftalmia, abultamiento en el abdomen y furúnculos, lo que indicaba que los organismos estaban atravesando por un proceso infeccioso. Los organismos se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento de bacterias patógenas

Los peces fueron colocados en charolas de disección y con ayuda de hisopos estériles se tomaron muestras de las lesiones observadas, posteriormente fueron anestesiados con sulfometano de tricaina al 1% para efectuar una disección haciendo un corte por encima de la línea lateral desde el opérculo y hasta la aleta caudal para dejar los órganos internos expuestos y poder tomar la muestra del riñón. Las muestras se inocularon en 9 mL de solución salina estéril; posteriormente se tomaron 0.1mL y se sembraron en cajas de agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares (TCBS), Infusión Cerebro Corazón (BHI) y Eosina Azul de Metileno (EMB) por duplicado. Las cajas se incubaron por 24 h a 28°C; transcurrido este periodo, se efectuó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) y se caracterizó la morfología colonial. A continuación las cepas fueron aisladas a través de resiembras sucesivas. A las cepas puras se les efectuó la tinción de Gram para observar la morfología celular con ayuda de un microscopio óptico.

Identificación bacteriana

Una vez aisladas las cepas, se procedió a la identificación bacteriana a través de pruebas bioquímicas convencionales: movilidad, citocromo C, oxido fermentación de la glucosa y catalasa. Así mismo se confirmó la identificación mediante la detección del gen 16S del ARNr, efectuando la extracción de ADN genómico utilizando el sistema Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ADN aislado de las cepas en

estudio, se realizaron amplificaciones del gen 16S del ARNr (PCR) utilizando los *primers* universales 8 for. (5'-AGACTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1492 rev. (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Para remover residuos de primers, nucleótidos y polimerasas, las muestras se purificaron mediante el uso del sistema de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Los productos de la purificación se enviaron al servicio de secuenciación Macrogen DNA Corea y las secuencias obtenidas se interpretaron por medio de los programas Chromas y Blast. Finalmente, la información obtenida se comparó con la base mundial de secuencias (GENEBANK) para obtener las relaciones filogenéticas.

Obtención de bacterias probióticas

Las bacterias probióticas utilizadas en esta investigación fueron previamente aisladas del tracto digestivo de diversos peces sanos por Monroy et al. (2010). Las cuales correspondieron a las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, *Bacillus subtilis* y *Bacillus laterosporus*

Capacidad antagonica in vitro de bacterias probióticas frente a patógenas

Una vez identificadas las cepas patógenas se llevaron cabo las pruebas de desafío antagonico *in vitro*, entre las bacterias probióticas y las patógenas, para lo cual las cepas patógenas se sembraron por triplicado en cajas de agar BHI a una concentración de 1x10⁷ UFC mL⁻¹. Las cajas se incubaron durante 24 h a 30°C. Posteriormente, utilizando el método de difusión en pozos, se adicionaron 70 µL de una suspensión con cada una de las cepas probióticas antes mencionadas con la absorbancia a 620 nm correspondiente a una población bacteriana de 10⁸ UFC mL⁻¹ y diluciones hasta 10⁶ UFC mL⁻¹. Las cajas se volvieron a incubaran durante 24 h a 30°C, y transcurrido este tiempo se observó la formación de halos de inhibición para cada dilución. Se consideraron positivas aquellas cepas que presentaron halos superiores a 2 mm.

Conversión de datos cuantitativos a cualitativos

Los valores obtenidos de los halos de inhibición fueron transformados a datos cualitativos

con la siguiente premisa: diámetro de halo < 2.0 mm efecto negativo; diámetro de halo > 2.0 mm efecto positivo.

RESULTADOS

Las especies de bacterias patógenas aisladas e identificadas fueron: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* y *Vibrio fluvialis*.

De la Tabla 1 a la 5 se presenta la sensibilidad de los patógenos a las diluciones de los probióticos experimentales. Como puede observarse en la Tabla 1, el patógeno *P. vulgaris* presenta una sensibilidad positiva con todos los probióticos experimentales empleados, sin importar la dilución utilizada.

Tabla 1. Sensibilidad positiva (+) o negativa (-) del patógeno *Proteus vulgaris* expuesto a las diluciones de los probióticos experimentales.

Probióticos experimentales	Sensibilidad en las diferentes diluciones					
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus laterosporus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	+	+	+

En la Tabla 2 se observa que el patógeno *E. sakazakii* no presenta sensibilidad (< 2.0 mm de diámetro) en los siguientes probióticos: *B. laterosporus* (diluciones 10⁶, 10⁵ y 10⁴); *Lactobacillus sp.* (diluciones 10⁹, 10⁶ y 10⁴) y *Bacillus sp.* (diluciones 10⁶ y 10⁴). Las demás diluciones con el probiótico empleado dan un resultado positivo en la sensibilidad en contra del patógeno utilizado.

Tabla 2. Sensibilidad positiva (+) o negativa (-) del patógeno *Enterobacter sakazakii* expuesto a las diluciones de los probióticos experimentales.

Probióticos experimentales	Sensibilidad en las diferentes diluciones					
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus laterosporus</i>	+	+	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus sp.</i>	-	+	+	-	+	-
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	-	+	-

En la Tabla 3, se presenta la sensibilidad del patógeno *V. fluvialis* con respecto a la dilución del probiótico. En esta se observa la falta de sensibilidad (< 2.0 mm) ante los probióticos *B. laterosporus* (diluciones 10⁹, 10⁵ y 10⁴); *Lactobacillus sp.* (dilución 10⁶) y *Bacillus sp.* (dilución 10⁵). En el resto de los probióticos y sus diluciones se presentó una sensibilidad positiva.

Tabla 3. Sensibilidad positiva (+) o negativa (-) del patógeno *Vibrio fluvialis* expuesto a las diluciones de los probióticos experimentales.

Probióticos experimentales	Sensibilidad en las diferentes diluciones					
	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus laterosporus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus sp.</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+	+	-	+

En lo que respecta al patógeno *K. oxytoca* y su respuesta de sensibilidad a los probióticos experimentales y sus diluciones, se observa en la Tabla 4 una mayor sensibilidad negativa, ya que son más los probióticos y sus diluciones que lo presentan. *B. subtilis* a la dilución 10⁶; *B. laterosporus* con casi todas las diluciones (10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵ y 10⁴); *Lactobacillus sp.* (diluciones 10⁹,

10^8 , 10^7 y 10^6) y *Bacillus* sp. en la dilución 10^6 . Cabe hacer notar que solamente el probiótico *L. lactis* dio una respuesta positiva en todas las diluciones experimentales.

Tabla 4. Sensibilidad positiva (+) o negativa (-) del patógeno *Klebsiella oxytoca* expuesto a las diluciones de los probióticos experimentales.

Probióticos experimentales	Sensibilidad en las diferentes diluciones					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Bacillus laterosporus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	-	+	+

Con el patógeno *C. freundii* se observa en la Tabla 5 una sensibilidad negativa (< 2.0 mm) ante *B. laterosporus* (diluciones 10^6 , 10^5 y 10^4) y con el probiótico *Lactobacillus* sp. en las mismas diluciones. *B. subtilis* provoca una sensibilidad positiva en todas las diluciones, así como *L. lactis*.

Tabla 5. Sensibilidad positiva (+) o negativa (-) del patógeno *Citrobacter freundii* expuesto a las diluciones de los probióticos experimentales.

Probióticos experimentales	Sensibilidad en las diferentes diluciones					
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus laterosporus</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+

DISCUSIÓN

Las bacterias ácido lácticas se utilizan como probióticos no sólo en el ser humano sino también en mamífero y otros organismos. Recientemente los

trabajos de Gómez-Gil et al. (2000), Briones y Lozano (2003), Campaña et al. (2003) y Monrroy et al. (2009) mencionan que este tipo de bacterias se han utilizado para eliminar la presencia de bacterias patógenas en los sistemas de cultivo de peces y crustáceos.

En este estudio, se determinó que *B. subtilis* inhibió el crecimiento de las bacterias patógenas *P. vulgaris*, *E. sakazakii*, *V. fluvialis*, *K. oxytoca* y *C. freundii*. El mecanismo inhibitorio de la interacción probiótico- bacteria patógena no se caracterizó en este estudio, pero trabajos realizados con bacterias ácido lácticas (BAL) sugieren que el efecto inhibitorio del *Bacillus* es por medio de la alteración del pH del medio de crecimiento, de la utilización de nutrientes específicos y/o la producción de compuestos volátiles (Gullian et al. 2004; Chaurasia et al. 2005; Yilmaz et al. 2006). Además, varios autores reportan que los géneros de *Bacillus* producen antibióticos polipéptidos como son: bacitracina, gramicidina S, polimixcina y tirotricina (Balcázar y Rojas 2007).

Por otro lado, *Bacillus* ha demostrado una fuerte actividad inhibitoria contra las cepas de *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*; bacterias aisladas *in vitro* e *in vivo* de un cultivo de camarones peneidos, produjeron halos de inhibición de 10 a 15 mm (Balcázar y Rojas 2007). Gómez-Gil et al. (1998) y Vaseeharan y Ramasamy (2003), comprobaron que probióticos del género *Bacillus* controlaron el crecimiento de *V. harveyi* en *Peneus monodon*, aumentando la resistencia a la bacteria patógena y reduciendo la mortalidad en un 90% en los camarones, proporcionando *Bacillus* como suplemento en la alimentación de manera constante. En peces, *Bacillus subtilis* ha demostrado efectividad para inhibir el crecimiento y controlar las infecciones de la cepa patógena *Aeromonas* sp. en tilapia (*Oreochromis* sp.) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Newaj-Fyzul et al. 2006). Kesarcodi-Watson et al. (2008) mencionaron que los probióticos pueden mejorar el sistema inmunológico obteniéndose un efecto positivo en la supervivencia de los organismos acuáticos cultivados en respuesta a un ambiente adverso (Díaz et al. 2001).

Villamil et al. (2003), describieron la capacidad que tiene la bacteria *láctica Lactobacillus brevis* (1×10^8 bacterias mL^{-1}) de eliminar al patógeno *Vibrio alginolyticus* en cultivos de alimento vivo. Dicha actividad, se atribuyó parcialmente a la producción de ácido láctico y ácido acético por parte de la lactobacteria debilitando la membrana citoplasmática de las bacterias patógenas y permitiendo la entrada de las bacteriocinas.

La capacidad que tiene las especies de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* usadas en este estudio para inhibir el crecimiento *in vitro* de las bacterias patógenas probadas, sugiere que son buenas candidatas para ser consideradas como probióticas y usarlas para eliminar bacterias patógenas de peces y crustáceos en cultivo a gran escala.

BIBLIOGRAFÍA

- Balcázar JL y Rojas-Luna T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM126 against *Vibrio* species confers protections against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Microbiol* 55: 409-412.
- Briones FP y Lozano AE. (2003). Factors affecting growth of the spiny lobster *Palinurus gracilis* and *Palinurus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, México, *Rev. de Biol. Trop.*, 51: 165-174.
- Castro T, Monroy MC, Castro J, De Lara R y Castro G. (2011) Efecto de cuatro probióticos en el crecimiento y la sobrevivencia de *Carassius auratus*. *Ciencia Pesquera* 19(1): 21-28.
- Campaña TA, Villareal C, Civera C y Martínez CLR. (2003). Efecto del nivel proteico de la dieta sobre el desarrollo de juveniles de la langosta australiana *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Revista Biología Tropical* 51: 749-752.
- Carnevia D, Letamendía M y Perretta A. (2009). Bacteriosis cutánea en peces ornamentales asociada a mortalidad en criaderos de peces ornamentales de Montevideo. 1. Aspectos semiológicos y microbiológicos. *Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras* 27: 38-41.
- Chaurasia B, Pandey A, Palni LMS, Trivedi P, Kumar B y Colvin N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research* 160:75-81.
- FAO, (2006). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).120 p.
- Gomez-Gil B, Tron-Mayén L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V y Guerra-Flores AL. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163:1-9.
- Gómez-Gil B, Roque A y Turnbull JF. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- Gullian M, Thompson F y Rodríguez J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ y Gibson L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274: 1-14.
- López B. y Cruz L. (2011). Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benéfico al proceso digestivo de la tilapia roja (*Oreochromis* spp.) en etapa de engorde en la zona de Santo Domingo. Informe Técnico para obtener el Título de Ingeniero. Agropecuario. Ecuador, Escuela Politécnica del Ejército.
- Monroy MC, Castro T, Fernández F y Mayorga L. (2010). Inhibition of *Aeromonas hydrophila* by probiotic strains isolated from the digestive tract of *Pterophyllum scalare*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9(1): 37-42.
- Monroy DMC, Castro BT, Fernández PJF, Mayorga RL, Herrera GH y Cortés SS. (2012). Bacteria with Probiotic Capabilities Isolated from the Digestive Tract of the Ornamental Fish *Pterophyllum scalare*. Capítulo 10. pp. 231-246. En: *Probiotics in animals*. INTECH. Croacia.
- Newaj-Fyzul A, Adesiyun AA, Mutani A, Ramsuhag A, Brunt J y Austin B. (2006). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* 103: 1699-1706.
- Paillard C, Le Rox F y Borrego JJ. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent

- studies: Trends and evolution. Aquatic Living Resources 17: 447-498.
- Pruzzo C, Gallo G y Canesi L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. Environmental Microbiology 7(6): 761-772.
- SAGARPA. (2012). Apoya investigación científica a la producción de peces de ornato. México, SAGARPA. Boletines 17-28 p.
- Villamil L, Figueras A, Planas M y Novoa B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture 219: 43-56.
- Yilmaz M, Soran H y Beyatli Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. Microbiological Research 161: 127-131.
- World Gastroenterology Organisation. (2008). Guías prácticas de la OMGE. Probióticos y prebióticos I. World Gastroenterology Organisation. 23 p.