

Probióticos en Acuicultura: Avances Recientes del Uso de Levaduras en Peces Marinos

Tovar-Ramírez, D.^a, Reyes-Becerril, M.C.^a, Guzmán-Villanueva, L.^a, Gleaves-López, V.^a, Civera-Cerecedo, R.^a, Ascencio-Valle, F.^a, Gracia-López, V.^a, Barbosa-Solomieu, V.^b, Gisbert-Casas, E.^c, Andree, K. B.^c, Alvarez-González, C. A.^d, Moyano-López, F.J.^e, Ortíz-Galindo, J.L.^f, Hinojosa-Baltazar, P.^a, Gutiérrez-Rivera, J. N.^a, Millán-Martínez, A. A.^a y Linares-Aranda, M.^a

^aCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S. 23090, México. E-mail: dtovar04@cibnor.mx

^bAqua Bounty Canada Inc. 0718 Bay Fortune RR#4 Souris, PEI, C0A2B0 Canada.

^cCentre d'Aquicultura, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Aptat. Correus 200, 43540 Sant Carles de la Rapita, Tarragona, España.

^dDACBIOL Laboratorio de Acuicultura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México.

^eDepartamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, La Cañada de San Urbano, Universidad de Almería, 04120, Almería, España.

^fUnidad Piloto de Maricultivos, CICIMAR-IPN, Av. IPN s/n, Col. Playa Palo de Santa Rita, 23096, La Paz, B.C.S., México.

Resumen

El uso de probióticos para el cultivo de peces marinos y dulceacuícolas, se incrementa cada vez más, debido a los efectos positivos que éstos confieren al hospedero. Las levaduras son probióticos, que han mostrado promover el crecimiento, la supervivencia, la actividad y la expresión de genes codificantes para las principales enzimas digestivas, cuando son administrados durante la etapa larvaria. Entre los beneficios aportados por estos microorganismos, encontramos el suministro de poliaminas, las cuales promueven diversos procesos fisiológicos vitales para el hospedero. En peces teleósteos, se ha observado que la administración de levaduras vivas en la dieta, estimula el sistema inmune y antioxidante así como la expresión de genes relacionados en el sistema inmune, confiriendo protección contra patógenos. Así mismo, en los juveniles, también se ha demostrado que se promueve la actividad de ciertas enzimas digestivas, permitiendo obtener mejores rendimientos en el crecimiento.

Palabras clave: probióticos, levaduras marinas, peces

Probióticos en acuicultura

El uso de probióticos en el cultivo de peces se incrementa cada vez más, debido a los efectos que éstos aportan al hospedero, de tal manera que el número de reportes concernientes al efecto de diferentes microorganismos considerados como probióticos, sobre la inmunología, maduración del sistema digestivo y en el metabolismo del hospedero, han ido incrementándose en los últimos años.

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

El término probiótico ha venido cambiando con los años. Gatesoupe, (1999) define probiótico como “aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud”, actualmente la FAO (2002) ha definido el término probióticos como, “microorganismos vivos que confieren un beneficio de salud al hospedero cuando son consumidos en cantidades adecuadas”.

Los efectos benéficos de los probióticos en el campo de la acuicultura pueden resumirse en seis puntos importantes:

1. Mejora de la calidad del agua (Vaseeharan y Ramasamy, 2003).
2. Modificación de la microflora intestinal (Balcázar *et al.*, 2007) y competencia con bacterias causantes de enfermedad por sitios de adhesión, fuentes de energía y nutrientes (Irianto y Austin, 2002).
3. Inhibición de microorganismos patógenos *in vitro* (Chabrillón *et al.*, 2005, Balcázar, 2006b).
4. Estimulación de la respuesta inmune sistémica y local, celular y humoral (Gatesoupe, 1999; Reyes *et al.*, 2008ab).

5. Aumento de la resistencia a infecciones de lactococosis y streptococosis (Brunt y Austin, 2005), vibriosis (Spaangaard *et al.*, 2001), furunculosis (Irianto y Austin, 2002; 2003), yersiniosis (Raida y col., 2003) y edwardsiellosis (Chang y Liu, 2002; Pirarat *et al.*, 2006), *Amyloodinium* y *Aeromonas* (Reyes *et al.*, 2008a, b).

6. Aporte de moléculas de importancia fisiológica para el hospedero, lo que conlleva a un mejor crecimiento, maduración de sistema digestivo, supervivencia y calidad larvaria (Tovar *et al.*, 2002, 2004).

Dentro de los probióticos se encuentran las levaduras, microorganismos ubicuos que son diseminados por los animales, el aire y las corrientes de agua, por lo que pueden ser detectadas en el tracto digestivo, tanto de peces silvestres como cultivados, sin embargo, su presencia es considerada como incidental a pesar de que son muchos los géneros de levaduras que han sido detectados en peces sanos (Gatesoupe, 2007). A pesar de la gran diversidad de levaduras existentes en el tracto digestivo, sólo dos especies han sido utilizadas como probióticos para peces: *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *Boulardii* (Tovar *et al.*, 2002, 2004; Waché *et al.*, 2006).

Lo efectos de la incorporación de *D. hansenii* sobre la maduración del sistema digestivo de larvas, han sido reportados para dos especies de peces marinos, uno de aguas templadas y el otro de aguas tropicales, *Dicentrarchus labrax* y *Paralabrax maculatofasciatus* respectivamente (Tovar *et al.*, 2004 y Guzmán-Villanueva *et al.*, 2007). Los efectos positivos observados sobre el crecimiento, supervivencia y maduración digestiva precoz, fueron atribuidos a la liberación continua de poliaminas aportadas por la levadura.

Las poliaminas son pequeñas moléculas policatiónicas, alifáticas, aromáticas, estables bajo condiciones ácidas o alcalinas que están presentes en todos los materiales biológicos (Tabor y Tabor, 1985). Se sabe que son indispensables para el buen funcionamiento de los organismos, al estar implicadas en los procesos vitales como el crecimiento; proliferación y diferenciación celular; esto es, participando en diversas etapas de la síntesis de proteínas, de ARN y ADN: control e inicio de la traducción (Konecki *et al.*, 1975) y la regulación de la fidelidad de ésta (Abraham *et al.*, 1979), estimulación de la asociación ribosomal (Kyner *et al.*, 1973),

mejoramiento de la síntesis de ARN (Barbiroli *et al.*, 1971) y ADN (Filligame *et al.*, 1975), estabilización de la estructura del ARN (Cohen, 1978), reducción de la velocidad de degradación del ARN (Fausto, 1972) y participación en la condensación del ADN (Anderson y Norris, 1960). Se sabe que son esenciales para el crecimiento y proliferación celular y como mediadores de la acción de hormonas y factores de crecimiento (Bardócz *et al.*, 1995). Otra función sugerida es que las poliaminas son moléculas importantes para mantener una correcta estructura y organización de la pared celular de levaduras (Miret *et al.*, 1992).

Por tal motivo, el propósito de esta revisión, es actualizar el conocimiento de los efectos de introducción de las levaduras vivas en alimento para el cultivo de peces en la etapa larvaria y la juvenil.

Efecto de la administración de levaduras sobre el metabolismo durante la etapa larvaria de peces

Tovar Ramírez *et al.*, (2002), probaron los efectos de la inclusión de *S. cerevisiae* (SC) y *D. hansenii* (H) por aspersión en la dieta microparticulada para larvas de *D. labrax*, a una proporción de 0.9 ml g⁻¹ (~7 x 10⁵ CFU g⁻¹). Estas dos cepas de levaduras fueron seleccionadas por su capacidad de adherencia al mucus intestinal de peces y por su capacidad de producir poliaminas en mayor cantidad que otras levaduras (Tovar *et al.*, 2002). Los efectos positivos fueron evidentes cuando se observó un incremento de la maduración digestiva de larvas alimentadas con *D. hansenii* en relación a control libre de levaduras y aquellas alimentadas con *S. cerevisiae*. La maduración digestiva está en función del aumento en los cocientes de actividad de diversas enzimas intestinales como la maltasa, aminopeptidasa y fosfatasa alcalina del borde de cepillo de los enterocitos con respecto a la enzima citosólica leucina-alanina-peptidasa en el día 27 después de la eclosión en peces alimentados con *D. hansenii* (Fig. 1).

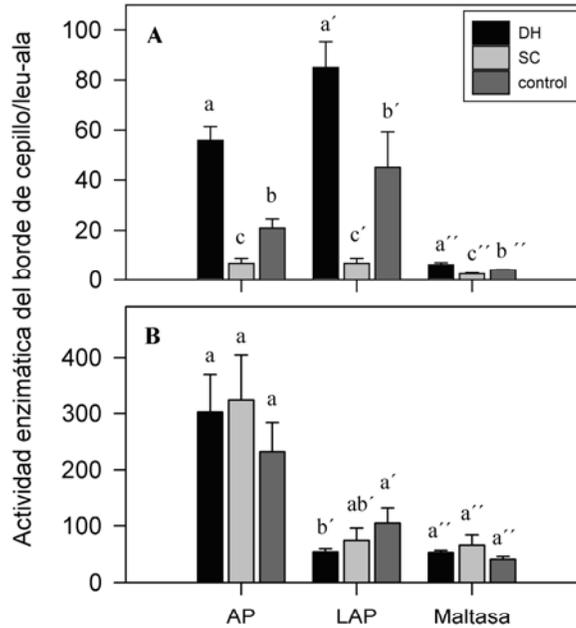


Figura 1. Cocientes de actividad enzimática de las células con borde de cepillo, fosfatasa alcalina (AP), leucino aminopeptidasa (LAP) y maltasa, y la enzima citoplásmica leucino-alanina peptidasa (leu-ala) de larvas alimentadas con las dietas *D. hansenii* (DH), *S. cerevisiae* (SC) y la dieta control. A, día 27 y B, día 42 después de la eclosión.

En la Figura 1, podemos observar que los valores de actividad enzimática de las larvas de 27 días alimentadas con DH son significativamente superiores a los encontrados en el control y en aquellas larvas alimentadas con *S. cerevisiae*.

De igual manera, la secreción de enzimas pancreáticas, como tripsina y la amilasa se ven favorecidas con la dieta enriquecida con la levadura *D. hansenii* (Fig. 2).

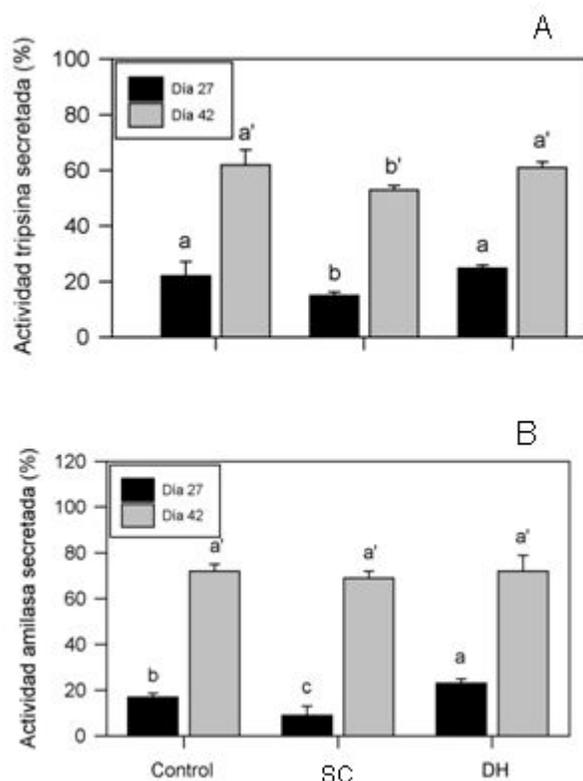


Figura 2. Actividad A) tripsina y B) amilasa secretadas en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las dietas DH, SC y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

Los efectos sobre el crecimiento no fueron los esperados en los grupos alimentados con levadura, ya que la introducción por aspersión modificó las propiedades físicas del alimento (Tovar *et al.*, 2002). Una vez que la inclusión de levaduras fue optimizada en la dieta, es decir, mezclándola con el resto de los ingredientes y al ser extruída, se llevó a cabo un experimento para conocer el efecto de dos niveles de levadura *D. hansenii*, 1.1 (10^6 CFU g^{-1}) y 5.7% (6×10^6 CFU g^{-1}) en el alimento microparticulado, sobre el crecimiento, supervivencia y desarrollo del sistema digestivo de larvas de la lubina europea, *D. labrax* (Tovar *et al.*, 2004). La nueva forma de incorporar el alimento, permitió la obtención de un mayor crecimiento y supervivencia con el nivel de 1.1% de *D. hansenii*, en comparación a la dieta control libre de levaduras, y que la dieta que contenía 5.7% de levadura (Fig. 3 y Tabla 1).

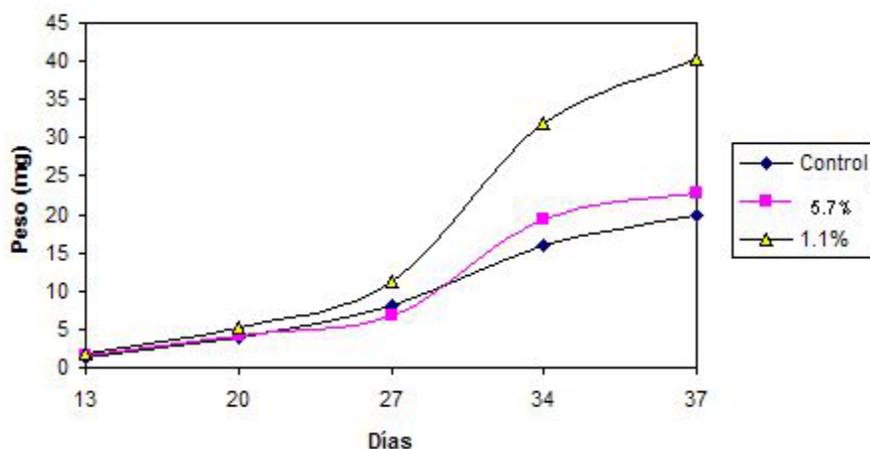


Figura 3. Crecimiento de larvas de la lubina Europea alimentada con dos niveles de inclusión de la cepa CBS 8339.

Tabla 1. Supervivencia final del las larvas alimentadas con 1.1 y 5.7% de levaduras.

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

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

El crecimiento obtenido con la dieta al 1.1% de levaduras fue el primer reporte, hasta nuestro conocimiento, por efecto del uso de probióticos en larvas. Con la misma concentración se obtuvieron los mejores resultados de supervivencia, mejor calidad larvaria (menor incidencia de deformaciones esqueléticas) y estimulación de la capacidad digestiva de la larva, representada por una actividad y expresión de enzimas digestivas pancreáticas y del borde de cepillo (Fig. 4, 6 y 5 respectivamente). Estudios recientes (Waché *et al.*, 2006), muestran que *S. cerevisiae* var *Boulardii*, acelera la actividad de las enzimas de borde de cepillo de alevines de trucha arcoiris a los 10 días de haber comenzado su administración, sin embargo, estos resultados no pueden ser comparados ya que la maduración de la trucha arcoiris es mas precoz que en la lubina Europea (Gatesoupe, 2007).

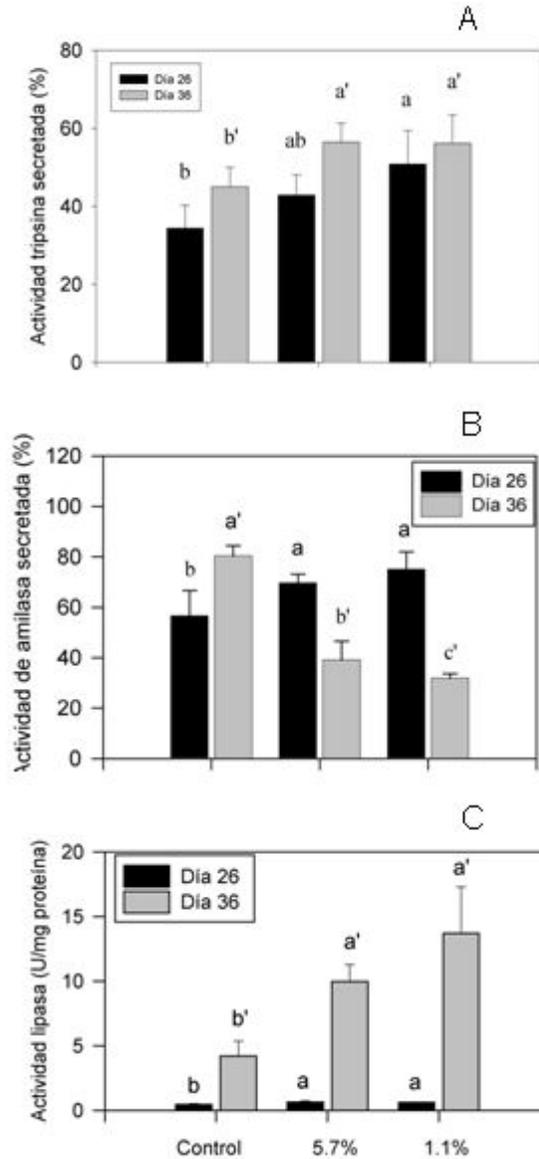


Figura 4. Actividad específica de A) tripsina, B) amilasa y C) lipasa en larvas alimentadas con levadura y dieta control. Las letras sobre las barras para cada tiempo de muestreo indican las diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$).

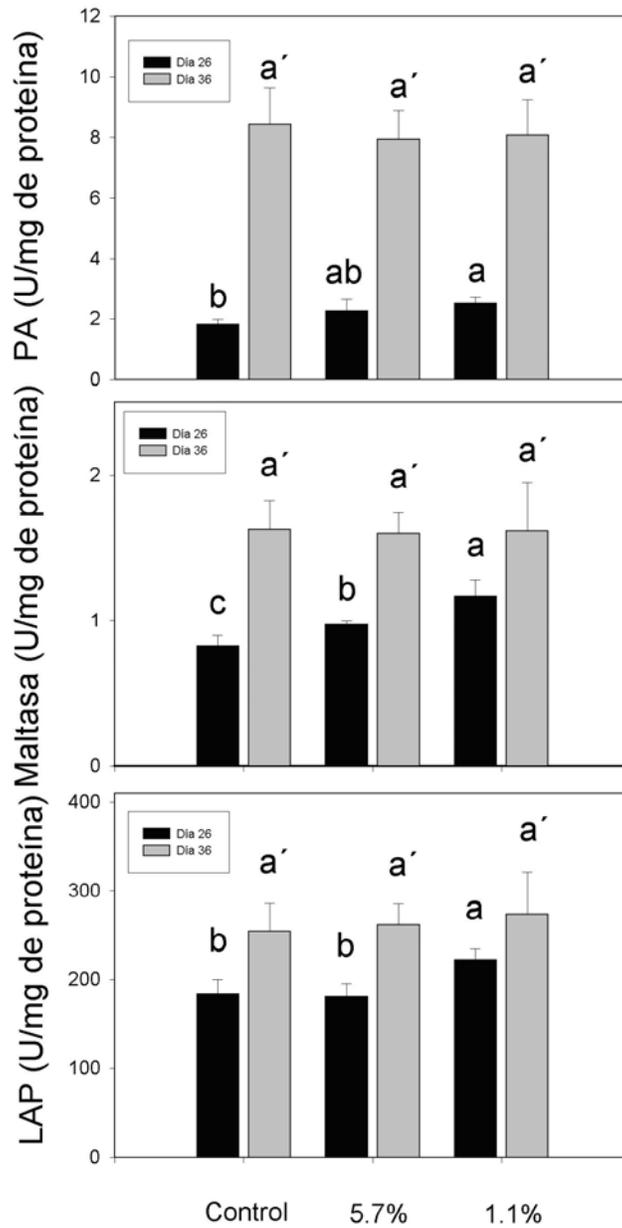


Figura 5. Cocientes de actividad enzimática de las células con borde de cepillo de larvas alimentadas con dos niveles de levadura y dieta control, leucino aminopeptidasa (LAP), maltasa y fosfatasa alcalina (PA) y la enzima citoplásmica leucino-alanina peptidasa (leu-ala). Las letras sobre las barras para cada tiempo de muestreo indican las diferencias en los tratamientos ($P < 0.05$).

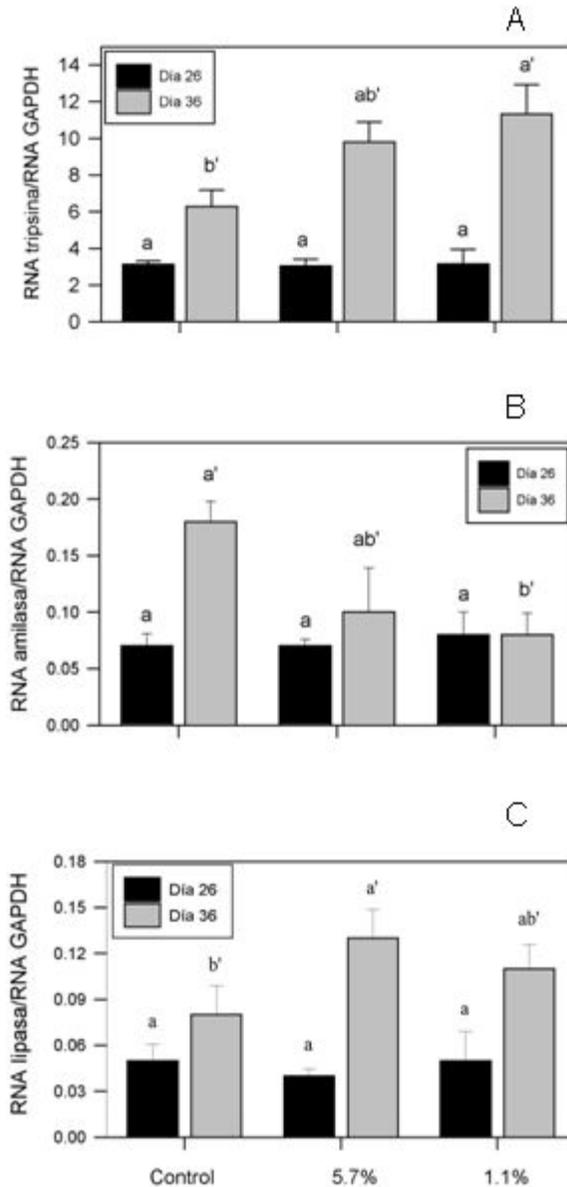


Figura 6. Niveles de ARNm de A) tripsina, B) amilasa y lipasa de larvas alimentadas con dos concentraciones de levadura y dieta control. Las letras sobre las barras, para cada tiempo de muestreo, indican las diferencias entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Los efectos observados en el crecimiento, supervivencia y capacidad digestiva de las larvas de la lubina Europea, pueden estar ligados al aporte de las poliaminas de la levadura, una vez que ésta coloniza el intestino de las larvas (Tovar *et al.*, 2004). Es así que Pérez *et al.*, (1997), observaron que la administración de 0.33% de espermina sintética, favorece el crecimiento, supervivencia y

maduración del sistema digestivo en larvas de esta misma especie. Por otro lado, Carmona *et al.* , (2008) observó que las poliaminas estimulan la expresión de la colecistokinina (CCK) en cultivos celulares primarios del intestino de *Lutjanus peru* expuestos a 0.1% de las poliaminas putrescina, espermina y espermidina durante 36 horas. La colecistokinina es la principal hormona que regula la digestión y es la encargada de estimular la secreción de enzimas pancreáticas y de la bilis, así como la contracción del intestino y del duodeno (Ronnestad, 2002).

La enzima ornitina-descarboxilasa (ODC) esta íntimamente involucrada en el metabolismo de las poliaminas y la α -difluorometilornitina (DFMO) es uno de los inhibidores más eficientes de su actividad; al ser descarboxilada por la ODC, produce un intermediario electrofílico que reacciona con un centro nucleofílico del sitio activo de la enzima para formar un enlace covalente, y así producir la inactivación irreversible de la enzima (Pegg, 1986).

Para conocer el papel que juegan las poliaminas aportadas por las levaduras durante el desarrollo del sistema digestivo de larvas de *P. maculatofasciatus*, se diseñó un experimento donde se administró alimento microparticulado suplementado con *D. hansenii* al 1.1 % inhibida bioquímicamente de su actividad ODC (levadura ODC (-)) mediante su exposición al DFMO, así como *D. hansenii* silvestre (ODC(+)) y una dieta control, libre de levadura (Guzmán-Villanueva *et al.* , 2007). La administración del alimento microparticulado se realizó a partir del día 20, por coalimentación con el alimento vivo, hasta el día 25, y desde ese día solamente alimento microparticulado hasta el día 35.

Se observó que la presencia de DFMO (2mM) no afectó el crecimiento ni la producción de poliaminas en *D. hansenii* ($P > 0.05$) por lo que se asume que puede existir una vía alterna en la biosíntesis de estas moléculas como lo hacen algunas bacterias (Kallio y McCann, 1981). En cuanto al cultivo larvario, la supervivencia larval fue significativamente diferente con el $13.05 \pm 0.54\%$ para las larvas alimentadas con la levadura ODC (+), mientras que $11.60 \pm 0.92\%$ con ODC (-) y del $10.34 \pm 1.23\%$ para la dieta control, sin levaduras. Estos niveles de supervivencia son hasta el momento, los más altos logrados para esta especie.

El crecimiento se encontró que fue significativamente diferente en los tres grupos alimentados con las distintas dietas, siendo menor en los grupos alimentados con la levadura con respecto al grupo control, alimentado con presas vivas y alimento microparticulado, libre de levaduras. Sin

embargo, durante el cultivo larvario, se observó una más alta densidad en aquellos taques alimentados con levadura, que en los del alimento control (datos no mostrados). Esto propició aparentemente, una competencia por el alimento y un incremento en la segregación de tallas y canibalismo en aquellos alimentados sin levadura. Estas observaciones coinciden con las de Hetch y Pienaar (1993) en cultivos con un alto porcentaje de supervivencia, por lo que sugerimos que estos factores influyeron indirectamente en el crecimiento de las larvas.

En cuanto a la actividad enzimática digestiva se refiere, las larvas alimentadas con levaduras silvestres (ODC +), mostraron diferencias significativas en los más altos niveles de secreción de las enzimas lipasa y tripsina con respecto al grupo control. Para la α -amilasa, el grupo control presentó la mayor secreción y, finalmente, la aminopeptidasa incrementó su actividad en las larvas alimentadas con *D. hansenii* silvestre. Lo anterior sugiere que la maduración del tracto digestivo y la consecuente mejora de la supervivencia en el grupo alimentado con *D. hansenii* podrían atribuirse a la secreción de las poliaminas de las levaduras, como se ha observado en previos reportes (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2007). En otros vertebrados, se sabe que la maduración del tracto digestivo de ratas se acelera por la liberación endoluminal de espermina y espermidina (Buts *et al.*, 1994). Otros investigadores, reportan que la alimentación temprana con levaduras, especialmente *D. hansenii* y *S. cerevisiae*, aporta beneficios al hospedero, tales como la colonización temprana del tracto digestivo, lo que tiene efectos consecuentes sobre el desarrollo del sistema digestivo en larvas y en peces adultos, estimulando así el metabolismo y el crecimiento (Gatesoupe, 2007). Waché *et al.*, (2006) observan que la maduración temprana del sistema digestivo en alevines de la trucha arcoiris, se acelera cuando se incorpora a la dieta la levadura *D. hansenii*.

Efecto de la administración de levaduras sobre la estimulación del sistema inmune de peces juveniles

Los probióticos son usados como control biológico en la prevención de ataques bacterianos representando una opción para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos contra patógenos potenciales en el cultivo de peces (Gatesoupe, 1999; Irianto y Austin, 2002). En este sentido, el rol benéfico de las levaduras es particularmente interesante debido a que ellas proveen

β -glucanos y nucleótidos que estimulan el sistema inmune de peces (Sahoo y Mukherjee, 2001; Li *et al.*, 2004). Particularmente la levadura marina *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) se ha investigado recientemente por sus características potenciales como probiótico.

En este sentido, se estudiaron los efectos de la suplementación del alimento microparticulado con la levadura *D. hansenii* (CBS 8339), sobre la estimulación de sistema inmune de juveniles de la cabrilla sardinera *M. rosacea* después de ser retados por separado con *Amyloodinium ocellatum* y *Aeromonas hydrophila*; otro experimento más fue realizado con *Sparus aurata* (Reyes *et al.*, 2008a,b). Los organismos retados con *A. ocellatum* mostraron diferencias significativas en los niveles de inmunoglobulina M (IgM), hemoglobina, y proteína plasmática en peces alimentados con la dieta-levadura. La mortalidad obtenida a la semana en peces alimentados con la dieta control y con levadura, fue de 90.7% y 52.8% respectivamente, aumentando de esta forma la supervivencia en este grupo de peces (Fig. 7). En un segundo experimento, la adición de la levadura *D. hansenii* en peces retados con *A. hydrophila* (1×10^7 UFC), produjo un aumento significativo en IgM plasmática y en la actividad hepática de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) así como la expresión de los genes CAT y proteínas de choque térmico (HSP) en hígado e intestino. No se registraron mortalidades, sin embargo, *A. hydrophila* fue recuperada en intestino e hígado de los peces infectados al final del experimento. En el tercer experimento efectuado con la dorada *S. aurata*, se observó un aumento significativo del sistema inmune innato en análisis *in vitro* (actividad de peroxidasa, fagocitosis, citotoxicidad y explosión respiratoria en leucocitos de riñón cefálico) y de la enzima SOD en los organismos alimentados con la levadura *D. hansenii*. Finalmente, los genes evaluados relacionados con el sistema inmune (IgM, IL-1, Hep, TCR-B, NCCR, MHC-II, CSFR, C3 y TNF- α) se indujeron fuertemente, principalmente en el riñón cefálico de peces alimentados con la dieta suplementada con levadura. Con estos resultados se promueve el uso de la levadura marina *D. hansenii* CBS 8339 para estimular el sistema inmune innato y específico en peces teleósteos aún cuando son expuestos a fuertes retos infecciosos.

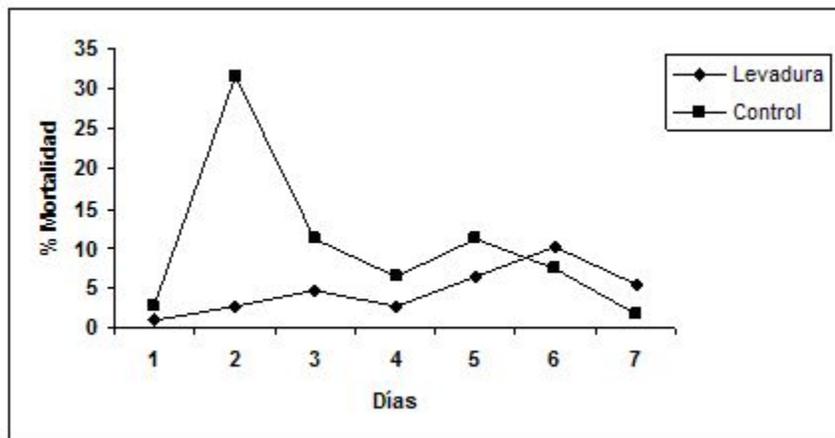


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de la cabrilla sardinera alimentada con y sin levadura (control) durante 7 días después del estrés expuesto por el parásito *A. ocellatum*.

Efecto de la administración de levaduras sobre la modulación del metabolismo en peces juveniles.

A la fecha, *S. cerevisiae* y *D. hansenii* son las levaduras que han sido más utilizadas como probióticos para estimular el crecimiento de peces juveniles, introducidas solas o en preparaciones con otras bacterias. En cuanto a la combinación de probióticos, Mohanty *et al.* (1993) utilizaron *S. cerevisiae* y *Lactobacillus coagulans* en una dieta experimental para alimentar a la carpa India, sin llegar a conclusiones definitivas sobre el efecto en el crecimiento. Poco tiempo después lograron la inducción de crecimiento en *Catla catla* y *Cirrhinus mrigala* (Mohanty *et al.*, 1996; Swain *et al.*, 1996).

Recientemente, Linares-Aranda, (2007), introdujo *D. hansenii* (1.1%) en una dieta microparticulada (Reyes *et al.*, 2008) con la que fueron alimentados juveniles de *M. rosacea* observando que los peces alimentados con levaduras en la dieta, presentaron un mayor factor de condición, presentando por lo tanto, un peso mayor, ($p < 0.05$) al cabo de 30 días de administración, comparado con una dieta control libre de levaduras. Caso contrario, Waché *et al.*, (2006) no observa efecto alguno sobre el crecimiento en la trucha arcoiris alimentada con *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079, sin embargo, observa la estimulación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, γ -glutamil transpeptidasa y aminopeptidasa N en la membrana del borde de cepillo, a los 10 días después de haber comenzado la administración de

levaduras en la dieta. Linares-Aranda (2007) observa también el efecto de la activación de la actividad enzimática del borde de cepillo, específicamente la leucina aminopeptidasa N, a los 21 días de la administración de las levaduras, sin embargo, no encuentra diferencia significativa entre la actividad de las enzimas digestivas del páncreas, ciegos pilóricos y estómago con peces alimentados con levaduras y los controles.

Los efectos del crecimiento y mejoría de la actividad enzimática del intestino, observados en los experimentos anteriores, podrían estar ligados al sitio de adhesión de las levaduras. En este sentido, la colonización natural del tracto gastrointestinal de peces por microorganismos, está asociada a la composición de la mucosa, que provee un hábitat rico en nutrientes para la proliferación de las levaduras. El potencial de adhesión de la levadura *D. hansenii* hacia la mucosa intestinal de varias especies, ha sido demostrada previamente, donde se sugiere que la hidrofobicidad de la superficie celular, juega papel importante en tal proceso (Vázquez-Juárez *et al.*, 1994; Andlid *et al.*, 1995). A pesar de que se ha propuesto la adhesión como un prerrequisito para considerar un microorganismo como probiótico, algunos autores sugieren que aun no están establecidos tales criterios (Van der Aa Kühle *et al.*, 2005), por lo que los resultados no podrían ser concluyentes en este sentido (Gatesoupe, 2008).

Linares-Aranda, (2007), analiza los sitios de fijación a lo largo de intestino anterior, medio y posterior de *M. rosacea*, para localizar y cuantificar las levaduras adheridas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Al final de los 30 días de alimentación con la dieta suplementada con levadura, se recuperaron y cuantificaron por cuenta viable las levaduras presentes en el intestino en medio YPD sólido.

La observación del epitelio intestinal con SEM, confirmó la capacidad de adhesión de esta levadura al intestino de *M. rosacea*; se observaron levaduras en los segmentos intestinales durante las 4 semanas del experimento (Figuras 8 y 9). En la primera semana de muestreo, se encontró que los organismos alimentados con dietas adicionadas con levaduras, presentaban gran número de levaduras adheridas a lo largo de todo el tracto intestinal. La adhesión se llevó a cabo selectivamente de acuerdo a la región intestinal, al parecer, los sitios más apropiados se encuentran en la sección anterior y media del intestino de *M. rosacea*. El número de levaduras

recuperadas ($2.5 \log \text{ UFC por g}^{-1}$) y las variaciones en el número de levaduras a lo largo del cultivo de juveniles de *M. rosacea*, es similar al reportado por Waché *et al.*, (2006) para la trucha arcoiris *O. mykiss*.

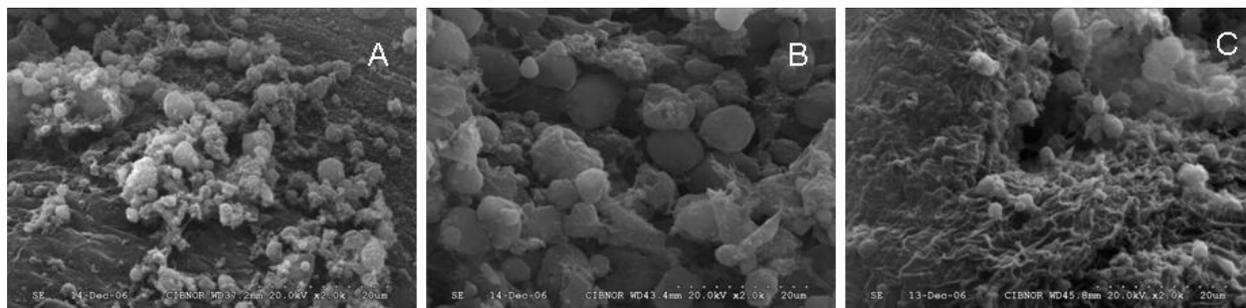


Figura 8. Presencia de *D. hansenii* en los segmentos intestinales de *M. rosacea* a la primera semana de alimentación. Intestino (A) anterior, (B) medio y (C) posterior.

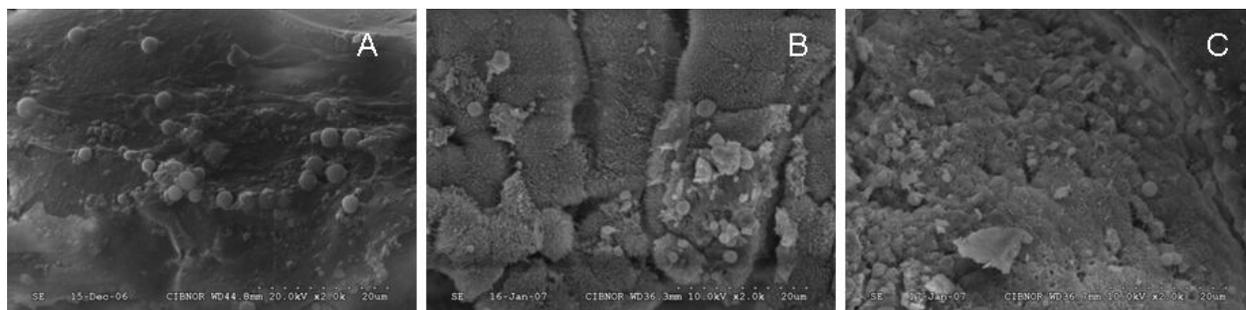


Figura 9. Presencia de *D. hansenii* en los segmentos intestinales de *M. rosacea* a las 4 semanas de alimentación. Intestino (A) anterior, (B) medio y (C) posterior.

Conclusiones

La adhesión a la mucosa intestinal, la producción de poliaminas y la habilidad de estimular el sistema inmune, así como el crecimiento, la maduración digestiva, supervivencia y la calidad larvaria, hacen de *D. hansenii*, un probiótico con elevado potencial de uso, que ya ha sido evaluado satisfactoriamente en el cultivo de larvas y peces juveniles de distintas especies, como *D. labrax*, *O. mykiss*, *M. rosacea*, *S. aurata* y *P. maculatofasciatus* (Tovar *et al.*, 2002, 2004; Waché *et al.*, 2006; Linares-Aranda, 2007; Guzmán-Villanueva, 2007; Reyes *et al.*, 2008a,b).

Actualmente, se está trabajando en determinar el mejor vehículo para administrar las levaduras vivas en microdietas de 50 a 100µm de diámetro, diseñadas para larvas de peces marinos. Para lo cual, se están ensayando distintos métodos de inclusión, como la microencapsulación con alginato al 2% de *D. hansenii* viva y la aspersión de esta levadura en dietas microparticuladas utilizando ligantes como el aceite de pescado y el alginato de sodio al 2% (Gleaves *et al.*, 2008).

Agradecimientos

A los proyectos SAGARPA-CONACYT 2004-044, SEP-CONACYT 39509-Q, IFS Grant A/3367-1. Al personal técnico de CICIMAR y CIBNOR, por su apoyo: cDr. Martín O. Rosales, M.C. Víctor Carrasco Chávez, M.C. Tanos Grayeb, M.C. J. Manuel Martínez, cDr. Ernesto Goytortúa Bores, Tec. Ariel Cruz Villacorta y Biol. Mar. Hever Latisnere B.

Literatura Citada

- Abraham, A. K., Olsner, S., and Phil, A. 1979. Fidelity in protein synthesis *in vitro* is increased in the pancreas in presence of spermidine. FEBS Letters 101, 93-96.
- Anderson, N. G. and Norris, C. B. 1960. The effects of the amines on the structure of isolated nuclei. Experimental Cell Research 19, 605-618.
- Andlid, T., R. Vázquez-Juárez and L. Gustafsson. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) microb. Ecol. 30:321-324.
- Balcázar J. L., De Blas I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, C., Márquez, I., Girones O., Muzquiz, J. L. 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). British journal of nutrition. 97, 522-527.
- Barbiroli, B., Corti, A. and Caldadera, C. M. 1971. The pattern of synthesis of ribonucleic acid species under action of spermine in the chick embryo. Biochemical Journal 123, 123-124.
- Bardócz, S. 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends in food science and technology, october, vol 6 pp 341-346.
- Brunt, J., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control *lactococcosis* and *streptococcosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 28, 693-701.
- Buts, J.P., Keyser, N. and L. Raedemaeker. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, Pediatric Research, 36, No. 4: 522-527.
- Carmona-Contreras, J. 2008. Efecto de la poliaminas sintéticas sobre la expresión del gen codificante para la colecistokinina en cultivos celulares primarios del epitelio gástrico del huachinango *Lutjanus peru*. Tesis de maestría, Programa de Posgrado, UABCS.
- Chabrillon, M., Rico, R. M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. 2005. Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. piscicida. Journal of Fish Diseases 28, 229-37.
- Chang, C. I., Liu, W. Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Diseases. 5, 311-315.
- Cohen, S. S. 1978. What do the polyamines do? Nature, 274, 209-210.
- Fausto, N. 1972. RNA metabolism in isolated perfused normal and regeneration livers: polyamine effects. Biochimica et Biophysica Acta 281, 543-553.
- Filligame, R. H., Jorstad, C. M., and Morris, D. R. 1975. Increased cellular levels of spermidine or spermine are required for optimal DNA synthesis in lymphocytes activated by concanavaline A. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72, 4042-4046.

- Gatesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gatesoupe J. F. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture*, Volume 267, Issues 1-4, 3 July 2007, Pages 20-30
- Gleaves-López, V., Tovar-Ramírez, D., Moyano-Lopez, F.J., Civera-Cerecedo, R., Gracia-López, V., Saenz de Rodrigañez, M. 2008. Effect of probiotic delivery on microdiets for development of leopard grouper larvae (*Mycteroperca rosacea*). XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Florianópolis Brasil, Junio 1-5, 2008.
- Guzmán Villanueva, L., Tovar-Ramírez, D. and Civera Cerecedo, R. 2007. Effect of wild and ornithine decarboxylase deficient *Debaryomyces hansenii*, on *Paralabrax maculatofasciatus* larvae development, Caribbean and Latin American Aquaculture 2007, San Juan Puerto Rico, 6 - 9 Noviembre.
- Hetch, T. and Pieraar, G. 1993. A review of cannibalism in its implications in fish larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 24: 246-261.
- Irianto, A., Austin, B., 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 26, 59-62.
- Kallio y McCann, 1981. Difluoromethylornithine irreversibly inactivates ornithine decarboxylase of *Pseudomonas aeruginosa*, but does not inhibit the enzymes of *Escherichia coli*. *Biochem J.* 1981 Oct 15;200(1):69-75.
- Konecki, D., Kramer, G., Pinphanichakarn, P. and Hardesty, B. 1975. Polyamines are necessary for maximum *in vitro* synthesis of globin peptides and play role in chaininitiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 169, 192-198.
- Kyner, D., Zabros, P. and Levin, D. H. 1973. Inhibition of protein chain initiation in eukaryotes by deacetylated transfer RNA and its reversibility by spermine. *Biochemica et Biophysica Acta* 324, 386-396.
- Li, P., Lewis, D. H., Gatlin, D. M. 2004. Dietary oligonucleotide influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 561-569.
- Linares-Aranda, M. 2007. Efecto de la incorporación de levaduras vivas en el alimento sobre la capacidad digestiva en juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Tesis de Maestría, Programa de posgrado del CIBNOR.
- Miret, J.J., Solari, A. J., Barderi, P. A. and Goldemberg, S. H. 1992. Polyamine and cell wall organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 8, 1033-41.
- Mohanty, S.N., Swain, S.K., Tripathi, S.D., 1993. Growth and survival of rohu spawn fed on liver based diet. *J. Inland Fish. Soc. Indai* 25 (2), 41-45.
- Mohanty, S.N., Swain, S.K., Tripathi, S.D., 1996. Rearing of catla (*Catla catla* Ham.) spawn on formulated diets. *J. Aquacult. Trop.* 11, 253-258.
- Parker, R. B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
- Pegg, A.E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234:249-262.
- Péres, A., Cahu, C.L., and Zambonino-Infante, J.L. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 16: 479-485.

- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. 2006 Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*); Vet. Immunol. Immunopathol. 113, 339-347.
- Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., Buchmann, K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). Journal of Fish Diseases 26, 495-498.
- Reyes-Becerril, M., Dariel Tovar-Ramírez, Felipe Ascencio-Valle, Roberto Civera- Cerecedo, Vicente Gracia-López, Valérie Barbosa-Solomieu. 2008a. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquaculture 280, 39-44.
- Reyes-Becerril, M., Irene Salinas, Alberto Cuesta, José Meseguer, Dariel Tovar-Ramírez, Felipe Ascencio-Valle, María Ángeles Esteban 2008b. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology 2008), doi: 10.1016/j.fsi.2008.02.010.
- Rønnestad, I., 2002. Control and efficiency of digestive function of marine fish larvae. In: Cruz-Suárez, L. E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Sahoo, P. K., Mukherjee, S. C. 2001. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). Fish Shellfish Immunol 11, 683-695.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. Environmental Microbiology 3, 755-65.
- Swain, S.K., Rangacharyulu, P.V., Sarkar, S., Das, K.M., 1996. Effect of a probiotic supplement on growth, nutrient utilization and carcass composition in mrigal fry. J. Aquacult. (Cent. Inst. Fresh Water Aquacult., Kausalyaganga, Bhubaneshwar, Orissa, India) 4, 29-35.
- Tabor, C. W., Tabor, H. 1984. Polyamines. Annu Rev Biochem; 53,749-790.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel., 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. Aquaculture, vol 204/1-2, pp113-123.
- Tovar-Ramírez, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe and R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture, vol: 234/1-4, pp 415-427.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1994. Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. Colloids Surfaces B: Biointerfaces 2, 199-208.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T. and Gustafsson, L. 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gardneri*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 6(1), 64-71.

- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L., 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 29–39.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon* Letters in Applied Microbiology, 36, 83-87.
- Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F.J., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L., Quentel, C., 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258, 470–478.