

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 279**

21 Número de solicitud: 201101353

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

15.12.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.06.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA (100.0%)
JUAN DE QUESADA, Nº 30
35001 LAS PALMAS DE GRAN CANARIA ES**

72 Inventor/es:

**SORROZA OCHOA, Lita;
REAL VALCÁRCEL, Fernando;
FUENTES ROMÁN, Lorena;
ACOSTA ARBELO, Felix y
PADILLA CASTILLO, Daniel**

54 Título: **BACTERIA ACIDO LÁCTICA PROBIÓTICA**

57 Resumen:

Bacteria ácido láctica probiótica.

La presente invención se refiere a las capacidades inhibitorias de una bacteria ácido láctica, de la especie *Enterococcus gallinarum* con un 99,7% de homología con la cepa tipo LMG 13129, y la forma en que dicha bacteria es usada, incorporada en el alimento, para tratar o prevenir la vibriosis en peces cuando es consumida.

ES 2 408 279 A2

DESCRIPCION**Bacteria acido láctica probiótica****Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a las capacidades inhibitorias de una bacteria acido láctica y la forma en que la bacteria es usada, incorporada en el alimento, para tratar o prevenir la
5 vibriosis en peces cuando es consumida.

Antecedentes de la invención

La acuicultura marina ha sido uno de los sectores de la producción animal que más rápidamente han crecido en los últimos treinta años en todo el mundo. Los avances en las tecnologías aplicadas a la acuicultura han permitido un aumento en el volumen de
10 producción, a través de la diversificación de sus actividades con nuevos sistemas de producción y con el cultivo de nuevas especies. Sin embargo, al igual que otros sectores en expansión, la acuicultura se enfrenta actualmente a nuevos retos, que hacen necesaria su reestructuración para lograr una mayor eficiencia y sustentabilidad

El control de los costes de producción se ha convertido en un problema clave para la
15 viabilidad económica de las piscifactorías marinas en el Mediterráneo. En los sistemas de cultivo intensivo y semi intensivos practicados en la región, las enfermedades se presentan a menudo como un factor limitante que puede determinar la rentabilidad de las empresas. Además, nuevos requisitos legales y la demanda por parte de los consumidores de productos más seguros y de mayor calidad, así como la preocupación por la conservación
20 del medioambiente, están reforzando la necesidad de aplicar un enfoque más integrador en la prevención y control de las enfermedades de peces.

Si bien la quimioterapia es quizás el método más rápido para el control de las enfermedad, hay un creciente reconocimiento de su limitaciones en la acuicultura, debido a que en algunos casos, más que proporcionar una solución, puede ocasionar efectos adversos en la
25 salud del animal, mediante la activación de la toxicidad, la resistencia, producción de residuos, etc., dando lugar a consecuencias ambientales y, en ocasiones problemas en la salud pública (FAO, 2002). Por esta razón la por esta razón la Unión Europea ha planteado serias restricciones sobre el uso de antibióticos en acuicultura.

Un diagnóstico rápido y preciso de las enfermedades, la aplicación de medidas preventivas
30 y unos estudios epidemiológicos precisos constituyen la clave para minimizar el impacto de las enfermedades en piscicultura. Por ello, hoy en día las investigaciones se centran en la búsqueda de métodos profilácticos alternativos que sean amigables con el medio ambiente

y que contribuyan a una mejor producción, limitando del uso de productos terapéuticos; la introducción de vacunas comerciales ha significado un avance en este sentido, pero en las últimas décadas el uso de probióticos ha despertado gran interés, ya que el beneficio que juegan las bacterias no patógenas para proteger a su hospedador contra infecciones es enorme, así como también han demostrado efectos positivos sobre el crecimiento, supervivencia, en general bienestar en la salud de los animales.

El consumo de la bacteria ácido láctica probiótica, objeto de la patente, en forma de producto alimenticio, permite inhibir el crecimiento del patógeno *Vibrio anguillarum* como tratamiento de la vibriosis en peces.

10 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana ácido láctica de la especie *Enterococcus gallinarum*, que consumida por un animal marino, inhibe el crecimiento del patógeno *Vibrio anguillarum* después de 30 días de administración de dicha cepa bacteriana ácido láctica; donde el animal marino es escogido de un grupo en el que se encuentra la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina (*Argyrosomus regius*) y el lenguado (*Solea solea*).

También es característico de la invención el uso de dicha cepa bacteriana ácido láctica para la fabricación de una composición para el tratamiento de la vibriosis en peces, donde la composición es administrada en forma de producto alimenticio y en una cantidad efectiva, siendo la cantidad efectiva de 10^8 - 10^9 UFC (unidades formadoras de colonia) por gramo de alimento, repartida en al menos dos tomas diarias.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la inhibición del crecimiento frente a *Vibrio anguillarum*.

Descripción detallada de una realización preferida de la invención

Aunque la invención se describe en términos de una realización específica preferida, será fácilmente evidente para los expertos en esta técnica que se pueden hacer diversas modificaciones, redistribuciones y reemplazos. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas a la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento de cepas probióticas se utilizaron diversas especies de peces como 60 lubinas (*Dicentrarchus labrax*), 80 doradas (*Sparus aurata*), 60 corvinas (*Argyrosomus*

regius) y 50 lenguados (*Solea solea*) siendo muestreados en diferentes épocas del año.

Para el aislamiento de bacterias intestinales empleamos Agar Marino (AM), Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar sangre (AS), Agar Triptona de Soja (TSA), y medio Man Rogosa y Sharpe (MRS), todos ellos de la casa comercial Pronadisa (Conda Laboratorios, 5 Madrid, España), preparados según instrucciones del fabricante.

Las placas fueron mantenidas en estufa de 2 a 7 días a 25°C. Posteriormente se sembraron en cultivo puro en TSA y conservadas por liofilización y congelación a -80 °C en BHIB con 15% glicerol para su posterior análisis como posibles cepas probióticas.

Para la caracterización de la cepa como probiótica se analizaron varios mecanismos de 10 selección y se dividió el trabajo en pruebas in vitro e in vivo.

Evaluación in vitro

Dentro de la evaluación in vitro tenemos:

- Efecto inhibitorio del crecimiento
- Producción de sustancias antibacterianas
- 15 - Resistencia al pH ácidos y a la bilis
- Competencia por los lugares de adhesión con respecto a los microorganismos patógenos.
- Efecto inhibitorio del crecimiento frente a patógenos

En primer lugar se evaluó el efecto antagónico de todas las cepas bacterianas aisladas 20 frente a diversos patógenos de acuicultura, tanto marina como continental, mediante la metodología descrita por Austin (1992).

En la Tabla 1 observamos el listado de las diferentes cepas patógenas en acuicultura empleados en la experiencia de inhibición del crecimiento.

Tabla1. Patógenos utilizados en la experiencia de inhibición del crecimiento.

Especie patógena en acuicultura	Cepa	Origen
<i>Vibrio anguillarum</i>	4347	CECT
<i>Vibrio anguillarum</i>	975-1	CECT
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	94/99	IUSA
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	C2	IUSA
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	D1-21	ATCC
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i>	17911	CECT
<i>Vibrio alginolyticus</i>	521	CECT
<i>Yersinia ruckeri</i>	I	CECT
<i>Yersinia ruckeri</i> 250	250	CECT
<i>Yersinia ruckeri</i> ppi 661	ppi 661	CECT
<i>Yersinia ruckeri</i> 94/05	94/05	CIP
<i>Lactococcus garvieae</i>	102507	IUSA
<i>Streptococcus iniae</i>	IUSA-1	

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo

CIP: Colección del Instituto Pasteur

IUSA: Instituto Universitario de Sanidad Animal

5

Todos los patógenos se cultivaron en caldo infusión cerebro corazón (BHIB) durante 24 horas a 25°C para obtener un cultivo en fase exponencial. Posteriormente se centrifugó el medio a 5.000 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y el precipitado se lava 2 veces con PBS estéril, ajustándose a 1 de absorbancia a una longitud de onda de 600nm para obtener una concentración de 10^9 ufc/ml por recuento en placa mediante diluciones seriadas. A partir de esta concentración se realizan diluciones seriadas 1/10 hasta la concentración 10^7 ufc/ml y sembramos 100µl de esta dilución con ayuda de un asa de Dygraski en placas de TSA. Por otra parte, las cepas a analizar como posibles cepas probióticas se siembran por agotamiento en TSA durante 24 horas a 25°C, tomamos una pequeña muestra con ayuda del asa de siembra y lo depositamos sobre el medio TSA

10

15

sembrado previamente con 100µl del patógeno, y tras 24-48 horas de incubación, la presencia de halos de inhibición de crecimiento del patógeno alrededor de la posible cepa probiótica a analizar evidencia la existencia de efecto inhibitorio.

Producción de sustancias antibacterianas

- 5 Una vez detectado efecto inhibitorio del crecimiento de agentes patógenos alrededor de la cepa probiótica analizada, el análisis de la producción de sustancias antibacterianas nos permite evaluar si el efecto inhibitorio observado es debido a sustancias extracelulares que produce la bacteria durante su fase exponencial de crecimiento, por lo que únicamente las cepas bacterianas que presentaron efecto inhibitorio frente a alguno de los patógenos
- 10 analizados en la experiencia anterior, se evaluaron para la presencia o no de sustancias antibacterianas.

Método de difusión por pocillo

- En esta experiencia se evaluaron las posibles cepas probióticas siguiendo la metodología descrita por Nikoskelainen y cols. (2001) con pequeñas modificaciones (Kim & Austin,
- 15 2008). Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en 10ml de BHIB a 25 °C durante 48 horas, y tras este periodo las cepas fueron centrifugadas a 2000g durante 10 minutos y los sobrenadantes pasados por filtros de celulosa estériles de 0,45 µm. La mitad del sobrenadante se neutralizó con hidróxido de sodio (NaOH) 5N hasta un alcanzar un pH de 6,8. La otra mitad del sobrenadante no fue neutralizada, y ambos sobrenadantes fueron
- 20 liofilizados y concentrados 10 veces antes de su utilización.

- Todos los patógenos fueron cultivados en BHIB suplementado con 1% de NaCl durante 24 horas, para posteriormente realizar 2 lavados con PBS previa centrifugación a 2000 g durante 10 minutos. 100 µl de la suspensión de cada una de las cepas patógenas (10^7 ufc /ml) fueron sembradas en placas de TSA por triplicado donde previamente se hicieron 4
- 25 pocillos con puntas de pipeta estériles. En un pocillo se depositó 10 µl del sobrenadante de cada una de las cepas con pH neutralizado (pH 6,8), en el siguiente 10 µl de sobrenadante sin neutralizar (pH 5,2), y en los pocillos restantes se depositó BHIB neutralizado y sin neutralizar para determinar la posible actividad inhibitoria del medio.

- Una vez comprobada la producción de sustancias antibacterianas y teniendo en cuenta que
- 30 los productos extracelulares pueden ser de diversa índole como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, o ácidos orgánicos, hemos pretendido ver si en los productos extracelulares de nuestras cepas existe algunos de estos compuestos, para ello se analizó por cromatografía

líquida de alto rendimiento (HPLC), el sobrenadante de las cepas preseleccionadas pero solo para la determinación de ácidos orgánicos de cadena corta (ácido láctico y acético).

- Las bacterias preseleccionadas se cultivaron en 10 ml de BHIB durante 24 horas, y posteriormente centrifugadas a 6.000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se filtró a través de una membrana estéril de 0,2 μm y a continuación estas muestras fueron enviadas al Departamento de Biocombustible y Bioproductos del Instituto Tecnológico Agrario de la Comunidad Autónoma de Castilla y León para su análisis.

Resistencia al pH y bilis

- El objetivo es evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas de resistir a la bilis y a diferentes concentraciones de pH como un paso previo a la colonización. La bilis fue obtenida a partir de las mismas especies de peces de donde se aislaron las cepas probióticas, esta prueba se evaluó mediante la metodología descrita por Nikoskelainen (2001).

- En la experiencia de resistencia al pH, cada cepa seleccionada se cultivó en BHIB a 22 °C durante 24 horas. Tras este periodo de incubación, las cepas fueron centrifugadas a 2000 g durante 10 minutos y resuspendidas en PBS hasta alcanzar una concentración de 10^{10} ufc/ml. 10 μl de este inóculo se depositaron en 100 ml de PBS con pH comprendidos entre 3 y 7, e incubándolo durante 90 minutos a 22 °C, para posteriormente realizar recuento en placa.

- En la experiencia de resistencia a la bilis, las cepas seleccionadas se cultivaron en BHIB a 22 °C durante 24 horas, para posteriormente centrifugarlas a 2000 g durante 10 minutos, y realizar dos lavados con PBS, ajustando hasta una concentración final de 10^7 ufc/ml. A esta concentración se le añade un 10% de bilis fresca. La extracción de la bilis se realizó por punción directa con aguja fina en ejemplares de dorada, lubina, corvina y lenguado con ayuno previo de 24 horas. Los inóculos bacterianos adicionados con un 10% de bilis se incubaron durante 90 minutos a 22 °C. Pasado este tiempo se realizaron diluciones seriadas y se procedió al recuento en placa. Como control positivo de la experiencia, utilizamos la bacteria sin bilis, siendo tratadas de igual forma. En ambos casos, tanto para el experimento de pH como el de bilis se hicieron por triplicado.

Adhesión de las bacterias al mucus intestinal

La adhesión al mucus intestinal de peces es el primer paso para la colonización de las cepas bacterianas, siendo éste otro de los mecanismos que deben tener las bacterias para ser consideradas como probióticos. La adhesión al mucus intestinal se evaluó mediante la

5 técnica de fluorescencia.

Extracción del mucus

Para este método, se utilizó el mucus de doradas, corvinas, lubinas y lenguados en buenas condiciones sanitarias con un peso medio de 400 gramos, y mantenidos en ayuno durante 48 horas. Posteriormente, los peces fueron sacrificados por inmersión en hielo e

10 inmediatamente procesados siguiendo la metodología descrita por Chabrillón y cols. (2005).

El mucus se obtiene raspando cuidadosamente la superficie del intestino con una espátula de plástico, y una vez obtenido suficiente mucus, éste es homogenizando en PBS, la mezcla de PBS y mucus se centrifuga por dos veces a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C para remover las partículas y material celular, y el sobrenadante se pasa a través de un

15 filtro de celulosa estéril 0,45 µm. Posteriormente, las soluciones se homogenizan en PBS hasta alcanzar una concentración proteica de 0,5mg/ml mediante el kit de Bradford (Sigma. Altrich). Finalmente, la suspensión fue esterilizada por exposición a luz ultravioleta durante 30 minutos y conservada en alícuotas a -80 °C hasta su uso.

Ensayo de adhesión

20 Este ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por Van der Marel (2008). El mucus fue obtenido y preparado siguiendo la misma metodología anteriormente descrita. En esta experiencia, las cepas fueron marcadas con Syto 9 (Invitrogen), producto que tiñe selectivamente ácidos nucleicos de la bacteria con una coloración verdosa.

Las cepas seleccionadas se cultivan en BHIB 24 h a 25 °C y posteriormente se centrifuga

25 ajustándose hasta una concentración de 10^9 ufc/ml. 100 µl de Syto 9 (dilución 1/100) se adicionan a 900 µl de esta suspensión bacteriana, para posteriormente realizar un lavado con PBS, resuspendiendo en 900 µl suero fisiológico. Por otra parte, en una placa de polietileno de color negro de 96 pocillos (Nunc) se depositan 25 µl de mucus con 75 µl de solución de tapizado (16,8 g NaHCO₃ y 21,2 g Na₂CO₃ por litro a pH 9,6), incubando 12

30 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo se realizan 3 lavados con PBS para eliminar restos del mucus, y a continuación depositamos 25 µl de la bacteria teñida, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se hace un lavado con PBS

y depositamos 50 µl de suero fisiológico para proceder a la lectura por espectrofotometría a 535 nm de emisión y excitación a 485nm. La adhesión fue expresada como el porcentaje de fluorescencia de la bacteria fijada al mucus en relación a la fluorescencia de la suspensión bacteriana inicial.

- 5 La adhesión no específica y la hidrofobicidad de las cepas, también fue determinada mediante este método.

Ensayo de exclusión competitiva

Esta prueba consiste en determinar si las cepas seleccionadas son capaces de competir con algún patógeno por sitios de fijación, para ello utilizamos el método anterior mente

- 10 descritos (Syto 9) bajo las mismas condiciones del protocolo.

Brevemente, después de tener fijado el mucus se coloca primero 25 µl de la bacteria probiótica sin tefir, dejamos 30 minutos se lava y se coloca 25 µl del patógeno teñido con Syto 9, incubamos 30 minutos, lavamos y llevamos a leer en el espectrofotómetro (485nm excitación, 535 emisión). El porcentaje de exclusión se calcula de la misma forma que en el

- 15 método de timidina.

Identificación de cepas probióticas

Para una buena identificación de las bacterias es importante conocer sus características morfológicas como sus diversas reacciones metabólicas así como también las reacciones enzimáticas. Las cepas pre-seleccionadas como candidatas a probióticos fueron

- 20 identificadas mediante pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo siguiendo la metodología descrita por Smiber y Krieg (1981), sistemas miniaturizados Api (BioMérieux, Madrid, España) y secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

El método más preciso de clasificación de las bacterias es el análisis de su material genético mediante la secuenciación del gen 16s rRNA. La aplicación más frecuente de este

- 25 método es el análisis de secuencias de ADN ribosómico, puesto que existen tanto secuencias de ADN muy conservadas (específicas de familia o de género) como secuencias muy variables (específicas de especie o de subespecie).

La extracción del ADN se realizó mediante el kit de extracción comercial (Invitrogen, Carlsbad, USA). La técnica de la PCR para la amplificación de un segmento de 1200 pb del

- 30 gen 16S RNA se realizó con los cebadores universales basados en su región variable recN-F (5' GCAGGAAARTCTATTATYATTGATGC-3') y recN-R (5'-

CWCCTGTATCAACTTCATCAAA-3'), con el termociclador C1000 thermal cycler, (Biorad) siguiendo la metodología descrita por Arahal *et al.* (2008).

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio en buffer TAE 1X (100 v; 1h). Los productos de PCR fueron
 5 purificados con un kit comercial (SV Gel and PCR Clean-up System, Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante, los fragmentos purificados fueron re-suspendidos en 20 μ l de buffer TE, las reacciones fueron secuenciadas por los servicios de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en un secuenciador automático Abi Prism 3730, usando Big Dye Terminator v.3.1 cycle.

10 ***Ensayos in vivo***

Los ensayos in vivo se realizaron en la sala de patología ubicada en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas del Gobierno de Canarias. Estas instalaciones constan de 18 tanques de 500 litros en circuito cerrado y aireación mediante difusores. Los ejemplares se mantuvieron durante el periodo de aclimatación y los ensayos de inoculación
 15 con fotoperiodo controlado de 12 horas, y con 2 renovaciones diarias para mantener unas buenas condiciones en la calidad del agua.

Determinación de la inocuidad de las cepas probióticas

Este ensayo se realizó con la finalidad de comprobar que las cepas seleccionadas como posibles probióticos son inocuas, entendiéndose por este término la capacidad de no
 20 producir daño alguno al huésped tras su administración.

Para la realización de esta experiencia se utilizaron 15 tanques de 500 litros con 10 lubinas por tanque. Las lubinas, con un peso medio de 10 g fueron aclimatadas a nuestras condiciones de cultivo durante los 15 días previos a la experiencia de inocuidad, siendo alimentados con un 2% de su biomasa dos veces al día.

25 Las cepas a inocular fueron cultivadas en medio BHIB a 22°C durante 24 horas. Posteriormente, las cepas fueron centrifugadas a 2000 g durante 5 minutos, realizándose 2 lavados con PBS, y ajustando finalmente la suspensión bacteriana a una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 600 nm para su posterior recuento en placa tras diluciones seriadas a 10, obteniéndose una concentración media de 10^8 ufc/ml en cada una de las cepas a analizar.

30 La inocuidad se evaluó mediante la inoculación por vía intraperitoneal de 100 μ l de una suspensión bacteriana con una concentración de 10^8 ufc/ml, de cada una de las cepas

seleccionadas como posibles cepas probióticas. Los ensayos de inocuidad fueron realizados por triplicado por cada cepa, y como control negativo se inocularon lubinas con PBS estéril.

Tras la inoculación de cada una de las cepas seleccionadas, los peces se mantuvieron en observación diaria durante un mes para determinar posibles bajas y/o cualquier signo de enfermedad. Pasado el periodo de evaluación los peces fueron sacrificados en hielo y transportados en bolsas estériles hasta el laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Se tomaron muestras de hígado, bazo, riñón y cerebro para su estudio microbiológico en TSA para determinar la presencia o no de las cepas inoculadas, y estudio histopatológico con hematoxilina-eosina.

Preparación de la dieta experimental

La dieta experimental se preparó siguiendo la metodología descrita por Irianto y Austin (2002). Las cepas seleccionadas se cultivaron en BHIB durante 24 horas a 22°C.

Posteriormente, se centrifugaron a 2000 g durante 5 min, realizándose 2 lavados con PBS hasta ajustar la suspensión a una concentración de 10^{10} ufc/ml en PBS. 20 ml de la suspensión bacteriana fue adicionado a 120 g de pienso comercial por pulverización directa. Posteriormente, el pienso pulverizado se deja secar en la estufa a 25 °C durante 24 horas, obteniendo una concentración final de 10^9 ufc/g de alimento.

Para determinar la viabilidad de las cepas seleccionadas adicionadas al pienso por pulverización en el tiempo, el pienso fue mantenido en refrigeración durante una semana. Diariamente, el pienso fue analizado a partir de 1 g de alimento por recuento en placa de TSA y BHI tras ser homogenizado en 9 ml de PBS durante un periodo de 20 días.

Efecto protector frente a la infección experimental con *Vibrio anguillarum*

El objetivo de esta experiencia es determinar el posible efecto protector de las cepas seleccionadas in vitro como candidatas a cepas probióticas frente a una infección experimental con *Vibrio anguillarum*. Se seleccionó este patógeno por la gran importancia que presenta en la acuicultura marina.

Se utilizaron 900 lubinas con un peso medio de 18 g, siendo distribuidas en 18 tanques de 500 litros a una densidad de 50 lubinas por tanque. Para cada cepa analizada el ensayo se realizó por triplicado con sus respectivos controles. En la experiencia contamos con los peces alimentados con la dieta experimental infectados comparados con el control negativo donde se mantienen los peces sin infectar y el control positivo con peces infectados. Los

peces fueron aclimatados durante 15 días y se mantuvieron bajo condiciones óptimas de cultivo. Las dietas experimentales, suplementadas con las cepas probióticas seleccionadas, se prepararon y los peces fueron alimentados durante 30 días previos a la inoculación con el patógeno con el 2% de su biomasa.

- 5 La inoculación experimental con *Vibrio anguillarum* se realizó por baño durante 8 horas a una concentración de 10^8 ufc/ml, y los peces se mantuvieron por un periodo de 20 días post-infección. Previo a la inoculación experimental se llevó a cabo la activación del patógeno, para lo cual se realizaron 2 pases consecutivos del patógeno en lubinas por vía intraperitoneal, recuperando la cepa inoculada a partir de órganos internos de los animales
- 10 muertos. Una vez activado el patógeno, se cultivó en medio BHIB suplementado con un 1,5% de cloruro sódico en agitación durante 24 horas. Posteriormente se realizaron lavados en PBS, y el patógeno se suspendió finalmente en agua de mar estéril.

El porcentaje relativo de supervivencia (PRS) fue determinado como se describe a continuación:

15

Porcentaje de mortalidad de los peces con probiótico

$$PRS = 1 - \frac{\text{Porcentaje de mortalidad de los peces con probiótico}}{\text{Porcentaje de mortalidad de los peces sin tratamiento}} \times 100$$

Porcentaje de mortalidad de los peces sin tratamiento

- 20 Tras la infección se empezó a contabilizar diariamente los muertos, así como también los peces moribundos que empezaron a manifestar los signos típicos de la enfermedad, además se tomaron muestras de todos estos peces para su posterior análisis microbiológico e histopatológico. Todos los órganos internos (hígado, bazo, riñón y cerebro) de los peces fueron sembrados directamente sobre medio TCBS y BHIA con la finalidad de recuperar la
- 25 bacteria patógena. Una vez recuperada la cepa patógena, esta fue sometida a diversas pruebas bioquímicas y moleculares para su completa identificación. Para histología las muestras fueron conservadas en formol al 10% y teñidas mediante la técnica de hematoxilina-eosina.

- Siguiendo la metodología descrita por González y col (2003), los cebadores utilizados para
- 30 la identificación de *V. anguillarum* por PCR fueron:

5'-GTTC-ATAGCATCAATGAGGAG-3' y 5'-GAGCAGACAATATGTTG-GATG-3'

Las muestras de ADN fueron obtenidas de un cultivo bacteriano puro y de tejidos (bazo y riñón), la suspensión bacteriana se ajusto a 10^9 ufc/ml en PBS, el tejido se homogenizo con PBS (25 % peso/ volumen). Para la extracción de ADN se utilizaron con 2 kit comerciales (Invitrogen, Carlsbad, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

RESULTADOS

En el aislamiento de cepas probióticas después de procesar y analizar las muestras del intestino de las cuatro especies, Dorada, Lubina Corvina y Lenguado en diferentes épocas del año y en diferentes medios de cultivo, obtuvimos un gran número de cepas de las cuales se seleccionaron solo 120 cepas bacterianas de entre todos los medios de cultivo y especies. Todas estas cepas fueron evaluadas para analizar el efecto inhibitorio frente a patógenos encontrando que solo una cepa era capaz de inhibir a 10/13 cepas patógenas utilizadas, siendo esta cepa común en las cuatro especies de peces estudiadas (Fig. 1).

Una vez demostrado el efecto inhibitorio por parte de nuestra cepa seleccionada evaluamos los productos extracelulares encontrando que dicho efecto era debido a los ácidos presentes en el sobrenadante de dicho cultivo. Esta muestra fue analizada por HPLC y hallamos que la cepa nombrada L1 producía diversos compuestos entre los que encontramos al ácido láctico (24,12%), ácido acético (21,7%) etanol (7,6%) y glicerol (6.3%). Esta cepa (L1) fue identificada por técnicas moleculares como *Enterococcus gallinarum* con una homología del 99,7 % con respecto a la cepa LMG 13129, con número de secuencia AJ301833 (versión 1 de la secuencia), con fecha de depósito 24/11/2000 y obtenida de la base de datos con ruta de acceso a la página

<http://www.straininfo.net/strainPassport.action?sort=description&dir=asc&cultureId=31259>.

Para simular el paso de nuestra cepa a través del tracto gastrointestinal, analizamos la supervivencia de dicha cepa frente a la bilis y a pH ácidos encontrando que al estar en contacto con la bilis esta sobrevive un 75,7% y en pH 4 presenta el 40 % de supervivencia. Continuando con la evaluación encontramos que la cepa L1 es capaz de adherirse al mucus intestinal en un 30% y asimismo es capaz de excluir un 66, 2% del patógeno *Vibrio anguillarum* y 43,5% a *Photobacterium damsela subsp piscicida*.

En las experiencias in vivo la cepa L1 no ocasionó ningún daño tanto interno como externo en los peces que fueron evaluados. En el ensayo del efecto protector frente a *V.*

anguillarum encontramos que los peces mostraron síntomas típicos de esta enfermedad y que la cepa L1 era capaz de proteger la mortalidad en un 6% lo que representa un porcentaje relativo de supervivencia del 20 %.

Bibliografía

- 5 Arahál DR, Sánchez E, Macián MC, Garay E. (2008). Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family «*Leuconostocaceae*». *Int Microbiol* 11: 33-39.

Austin B, Baudet E, Stobie M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J Fish Dis.* 15: 55-61.
- 10 Chabrállón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C., Moríño, M.A., 2005. Adhesion of sole (*Solea senegalensis*) mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 229–237.

FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
- 15 González, S.F.; Osorio, C.R. and Santos, Y. (2003). Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of Aquatic Organism* 55, 109-115.

Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 25: 333-342.
- 20 Kim, D. H., & Austin, B, (2008), Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 141-147.

Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. y Ouwehand, A.C. 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2430-2435.
- 25 Smibert, R.M., Krieg, N.R., 1981. General characterization, p. 409-443. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips (ed.). *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.

Van der Marel, M., Schroers, V., Neuhaus, H., Steinhagen, D., 2008. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis. 31,321–330.

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Una cepa bacteriana ácido láctica de la especie *Enterococcus gallinarum*, que consumida por un animal marino, inhibe el crecimiento del patógeno *Vibrio anguillarum*
5 después de 30 días de administración de dicha cepa bacteriana ácido láctica.
- 2.- Uso de una cepa bacteriana ácido láctica según reivindicación 1, para la fabricación de una composición para el tratamiento de la vibriosis en peces.
- 3.- Uso de una cepa bacteriana ácido láctica según reivindicación 2, donde la composición es administrada en forma de producto alimenticio.
- 10 4.- Uso de una cepa bacteriana ácido láctica según reivindicaciones 2 y 3, donde la composición es administrada en una cantidad efectiva, siendo la cantidad efectiva de 10^8 - 10^9 UFC (unidades formadoras de colonia) por gramo de alimento, repartida en al menos dos tomas diarias.
- 15 5.- Uso de una cepa bacteriana ácido láctica según reivindicación 2, donde el animal marino es escogido de un grupo en el que se encuentra la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), la corvina (*Argyrosomus regius*) y el lenguado (*Solea solea*).

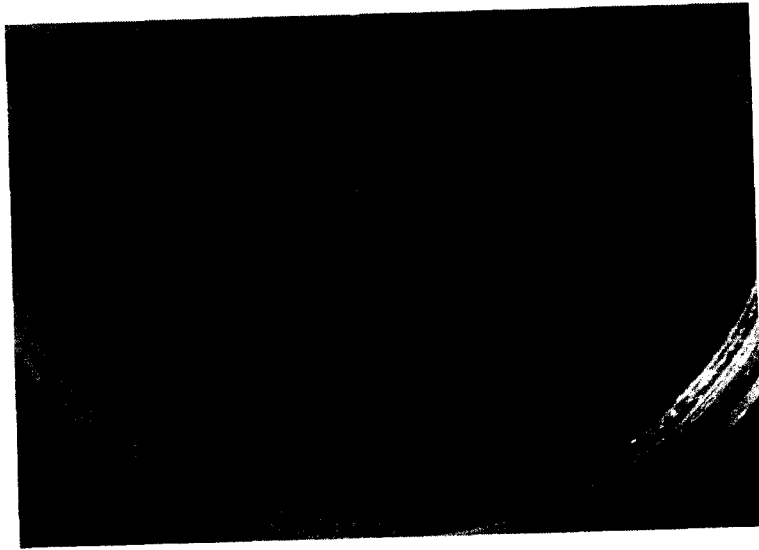


Figura 1