

Research Article

Bacteria *Pseudoalteromonas* sp. con potencial probiótico para cultivos larvales de peces

Camila Sayes², Yanett Leyton¹ & Carlos E. Riquelme²

¹Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos
Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

²Centro de Bioinnovación, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Biológicos
Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile

Corresponding author: Camila Sayes (camila.sayes@gmail.com)

RESUMEN. El pez dorado, *Seriola lalandi*, es una especie marina pelágica de alta demanda comercial a nivel nacional e internacional. La sobrevivencia larval en cultivo es baja, lo cual es atribuido, entre otros factores, a la baja calidad de las larvas. El uso en cantidades adecuadas de bacterias probióticas en el cultivo larval de diferentes organismos ha evidenciado que mejora la sobrevivencia del hospedador. En base a estos antecedentes el objetivo fue aislar e identificar bacterias desde la microbiota de *S. lalandi* que cumplan con características de potenciales probióticos. Para lo cual se aislaron 46 cepas desde juveniles y larvas de *S. lalandi*, que fueron identificadas a nivel molecular mediante el análisis del gen 16S rNAr. Además, se realizaron pruebas filogenéticas, antibacterianas, hemolíticas, lipolíticas y proteolíticas. Los resultados demostraron que del total de bacterias aisladas, el 42% pertenece al género *Pseudoalteromonas*, nueve de las cuales presentaron actividad inhibitoria contra bacterias patógenas, de éstas, solo una resultó negativa para hemólisis, proteólisis y lipólisis. De acuerdo a los resultados obtenidos se propone incorporar la bacteria *Pseudoalteromonas* sp. como potencial probiótico mezclado con microalgas para alimentar rotíferos y artemias (vectores) usados tradicionalmente en cultivos larvales de *S. lalandi*.

Palabras clave: *Pseudoalteromonas* sp., *Seriola lalandi*, larvas, probióticos, inhibición, acuicultura.

Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. potential probiotic for larval fish culture

ABSTRACT. *Seriola lalandi* is a pelagic marine species with high market demand national and internationally. However the larval survival in culture is low, which is attributed, among other factors, to the low quality of the larvae. The use of probiotic bacteria in appropriate amounts, in the larval culture of different organisms, has shown to improve the survival of the host. Based on this background our objective was to isolate and identify the bacteria from *S. lalandi* microbiota that show potential probiotic characteristics. For this purpose, 46 strains were isolated from *S. lalandi* juveniles and larvae, identified at the molecular level by analyzing the 16S rRNA gene. The following tests were performed as well: phylogenetic, antibacterial, hemolytic, proteolytic and lipolytic. The results showed that the total isolated bacteria, 42% belong to the genus *Pseudoalteromonas*, and nine presented inhibitory activity against pathogenic bacteria, of these, only one was negative for hemolysis, proteolysis and lipolysis. Based on the results, it is proposed to incorporate the bacteria *Pseudoalteromonas* sp. as potential probiotic adding it mixed with microalgae that are fed rotifers and artemia (vectors), which are traditionally used in the larval cultures of *S. lalandi*.

Keywords: *Pseudoalteromonas* sp., *Seriola lalandi*, larvae, probiotic, inhibition, aquaculture.

INTRODUCTION

Seriola lalandi es una especie marina cuya actividad acuícola depende de la captura de juveniles del medio natural y se desarrolla principalmente en Japón, Australia y Nueva Zelanda (Moran *et al.*, 2007a). Esta especie es migratoria y llega al norte de Chile como

juvenil y adulto, especialmente entre Antofagasta y Coquimbo, donde se localiza su mayor actividad pesquera de tipo artesanal. Entre las características que hacen atractivo su cultivo se mencionan: altas tasas de crecimiento, altos niveles de conversión alimenticia, resistencia a altas densidades de cultivo, docilidad y demanda internacional creciente (Poortenaar *et al.*, 2001).

La obtención de su ciclo de vida completo se ha visto limitada por su baja sobrevivencia en las etapas de cultivo, atribuida a la producción de huevos y embriones de baja calidad (Carnevali *et al.*, 2001).

Los probióticos se definen como: microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas como alimento o suplemento alimenticio tienen efectos beneficiosos sobre el equilibrio microbiológico intestinal del hospedador (Sihag & Sharma, 2012; Saad *et al.*, 2013). Hay varios estudios que indican que los probióticos, ya sea individualmente o en combinación, pueden mejorar el sistema inmunológico de los peces convirtiéndose en una alternativa válida en su larvicultura para reducir su alta mortalidad. (Dimitroglou *et al.*, 2011). De la especificidad del probiótico, depende el aumento de beneficios sobre el hospedero. Al respecto Bhandari *et al.* (2010) y Klose *et al.* (2010) sugieren que el aislamiento de cepas nativas probióticas específicas de cada especie, favorece su establecimiento en el intestino y las interacciones con la microbiota residente. En esta microbiota se encuentran microorganismos que pueden estar cumpliendo importantes funciones para el huésped (Nayak, 2010).

Estudios realizados en una amplia variedad de especies de peces, sugieren que esta microbiota puede establecerse después de la primera etapa de alimentación (Hovda *et al.*, 2012; Navarrete *et al.*, 2012). En consecuencia, mejorar la calidad del alimento puede mejorar la calidad nutricional de las larvas, reducir los brotes de enfermedades y mejorar el sistema inmunológico de los peces (Kim & Austin, 2006; Mohideen *et al.*, 2010; Wang & Gu, 2010). Por otro lado, hay que considerar otros beneficios como la reducción de los costos de cultivo mediante la mejora del crecimiento y el uso eficiente del alimento (Yanbo & Zirong, 2006; Faramarzi *et al.*, 2011; Mohapatra *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2012). De igual forma, la aplicación de los probióticos puede conducir a mejorar la calidad del agua (Velmurugan & Rajagopal, 2009; Ngan & Phu, 2011; Nimrat *et al.*, 2012).

En base a estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias desde la microbiota asociada a larvas y juveniles de *S. lalandi*, y evaluar su potencialidad probiótica para su potencial uso en su cultivo larval.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias

Se realizaron aislamientos de cepas bacterianas desde larvas (9 cm de longitud y 6 g peso) y juveniles (26 cm de longitud y 177 g peso). Debido al pequeño tamaño

de las larvas, se procesó completamente un total de 14 organismos en Stomacher (Lab-Blender 80). Para los juveniles se aislaron desde gónada, branquias, mucus y digestivo, los que fueron igualmente procesados en Stomacher. De cada muestra se tomó 1 mL, se realizaron diluciones en solución salina marina y se sembraron en extendido en medio de cultivo Tryptone Soya Agar (TSA Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) suplementado con 2 NaCl%. Las placas se incubaron a 20°C por una semana y luego se aislaron las unidades formadoras de colonias (CFU) cuyo criterio se basó en la apariencia de las colonias como forma, pigmentación, elevación, superficie y borde. Las cepas obtenidas se guardaron a -80°C en perlas criobank (copancryom).

Identificación de bacterias aisladas

Desde un cultivo en triptona soya agar (TSA) se obtuvo la biomasa bacteriana de todas las cepas aisladas, se realizó la extracción de DNA genómico con el kit de extracción PowerSoil DNA MO BIO, según las instrucciones del fabricante. Luego se amplificó el gen 16S ARNr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) (Buffer Green 10x, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, 1 μM de cada oligonucleótido y 0,23 U μL⁻¹ *GoTaq* ADN polimerasa (promega), usando partidores universales, una primera amplificación se realizó con los partidores 27F (5'-AG AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1542R (5'-AG GAGGTGATCCAGCCGCA-3') previamente descritos por Brosius *et al.* (1981), luego se realizó tres procesos más para obtener la secuenciación completa del 16S ARNr usando los partidores 358F (5'-CCTA CGGGAGGCAGCAG-3'), 907R (5'-CCGTCAATTC CTTTRAGTTT-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3'). La amplificación de los productos se realizó en un termociclador Px2 (ThermoCorporation), las condiciones de PCR fueron 5 min a 94°C y luego 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C, 130 s a 72°C y 5 min a 72°C, los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa 1%. El producto de PCR fue purificado con el kit de purificación UltraClean™15 DNA, MoBio Laboratories, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó en Macrogen Inc., Korea. Las secuencias fueron analizadas usando el programa Chromas Pro y Blast en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) y RDP Data Base. Los alineamientos fueron realizados con Chromas Pro y la secuencia fue comparada con aquellas que se encontraron disponibles en la base de datos.

Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético a todas las cepas aisladas, usando la aplicación de modelos (find DNA best model) del programa MEGA6 (Molecula

Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.*, 2001). Las relaciones de similitud entre las secuencias de genes 16S de cada bacteria se visualizaron con la herramienta de Phylogeny de Biedit para la construcción del árbol filogenético con un valor de bootstrap de 1000.

Pruebas de inhibición bacteriana

Los ensayos de inhibición se realizaron mediante el método de “doble capa” (Dopazo *et al.*, 1988) a las 46 cepas identificadas, inoculando 10 μL ($7,1 \times 10^4$ cél mL^{-1}) de cada cepa aisladas desde *S. lalandi* desde un cultivo de 18 h, en el centro de una placa petri con medio Mueller-Hinton (Difco) suplementado con 2% de cloruro de sodio (NaCl), y se incubó a 20°C por 48 h. Después de este tiempo, la macrocolonia formada se sometió a vapores de cloroformo por 45 min. Posteriormente, se agregó una segunda capa de agar semisólido previamente inoculada con la bacteria patógena *Vibrio cholerae*, *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* sp., *Vibrio anguillarum*, a una concentración de 2×10^4 cél mL^{-1} , los patógenos se usaron en forma independiente. Los cultivos fueron incubados a 20°C por 48 h. La presencia de un halo de inhibición definido alrededor de la macrocolonia fue considerada como actividad antibacteriana. El estudio se realizó en triplicado y el grado de inhibición se determinó midiendo el diámetro del halo, considerando como inhibición los valores mayores a 5 mm, según Leyton & Riquelme. (2010). Como control negativo se evaluó el efecto del cloroformo, inoculando la bacteria patógena sin el inóculo de la bacteria antagonista.

Pruebas enzimáticas

Se efectuaron las siguientes pruebas enzimáticas a todas las cepas que presentaron actividad inhibitoria contra bacterias patógenas:

a) Prueba hemolisis: La actividad hemolítica se determinó inoculando 10 μL de las cepas aisladas desde *S. lalandi* en el centro de placas agar sangre, la actividad hemolítica se observó entre las 24 y 48 h de incubación y el criterio usado para considerarlos positivos fue la presencia de un halo alrededor del inóculo bacteriano que indica lisis de eritrocitos en la sangre. Las cepas se identificaron como α -hemolisis, β -hemolisis y γ -hemolisis (Rodríguez, 2009).

b) Prueba de lipasa: La actividad lipasa se determinó inoculando 10 μL de las cepas aisladas desde *S. lalandi* en el centro de las placas con medio de cultivo triptona soja agar con 1% (v/v) de tween 80 y 1% (v/v) de tween 20% y 0.001% (p/v) de cloruro de calcio. La actividad lipolítica se observó a las 24 y 48 h de incubación. Para

una reacción positiva se consideró la formación de un halo de precipitación alrededor de la colonia formado por cristales de calcio que indica la degradación de lípidos (Sierra, 1957).

c) Prueba de proteasa: La actividad proteasa se determinó inoculando 10 μL de las cepas aisladas desde *S. lalandi* en el centro de las placas con medio de cultivo triptona soja agar suplementado con 1% v/v de leche descremada. La actividad proteolítica se observó entre las 24 y 48 h de incubación. Para una reacción positiva se consideró la aparición de un halo con precipitado alrededor de la colonia (Cowan & Steel, 1993).

RESULTADOS

Bacterias aisladas desde *S. lalandi*

Se aisló un total de 46 cepas bacterianas, de las cuales se observó que el género dominante correspondió a *Pseudoalteromonas* con un 47% (22 cepas), respecto al total de aislados. Además, se observó una variedad de otros 9 géneros bacterianos pertenecientes a *Enterobacter* (15%), *Klebsiella* (13%), *Pseudomonas* (7%), *Photobacterium* (4%), *Staphylococcus* (4%), *Vibrio* (4%), *Alcanivorax* (2%), *Bacillus* (2%) y *Zooshikella* (2%).

Identificación de bacterias aisladas

Las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas utilizando el programa Chromas Pro. Se realizó un blast en GenBank y RDP Data Base, y se compararon con las disponibles en estas bases de datos, seleccionando las que tuvieron un porcentaje de similitud >85% (Tabla 1).

Análisis filogenético

Para identificar las relaciones evolutivas y similitudes entre las especies aisladas desde *S. lalandi* se realizó el análisis filogenético a las 46 secuencias obtenidas, compuestas por una longitud entre 1000 y 1300 pb del 16S RNAr. Para verificar su ascendencia en común, se utilizó el Programa MEGA 6 para el alineamiento y análisis filogenético. Los resultados filogenéticos demostraron que las cepas aisladas e identificadas como *Pseudoalteromonas* sp. (SLP: 23, 17, 29, 39, 32, 14, 19, 45, 4, 49, 58, 46, 48, 51, 42, 28, 5, 36, 37, 44, 50, 35) forman un clado con la especie *Pseudoalteromonas* sp. encontradas en la base de datos. Esta similitud refuerza que estas cepas bacterianas son *Pseudoalteromonas* sp. (Fig. 1).

Pruebas de inhibición bacteriana

Los resultados de inhibición demostraron que 10 cepas aisladas desde *S. lalandi* presentaron inhibición mayor a 15 mm contra bacterias patógenas, las cuales prove-

Tabla 1. Identificación de bacterias aisladas desde *Seriola lalandi* a través de GenBank & RDP Data Base.

N°	Strain	Closest relative in GenBank & RD	
		Database	% similitud
1	SLP 1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (4221175)	100
2	SLP 4	<i>Photobacterium</i> sp. (2301304)	100
3	SLP 5	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (3289848)	100
4	SLP 6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
5	SLP 8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	99
6	SLP 9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	99
7	SLP 10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	99
8	SLP 11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	100
9	SLP 12	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
10	SLP 13	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (388266)	100
11	SLP 14	<i>Enterobacter cloacae</i> (1264371)	99
12	SLP 15	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
13	SLP 16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	99
14	SLP 17	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	99
15	SLP 19	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	99
16	SLP 21	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483946)	100
17	SLP 22	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (NR043106)	99
18	SLP 23	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	100
19	SLP 25	<i>Staphylococcus</i> sp. (483980)	99
20	SLP 27	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NR036794)	100
21	SLP 28	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (619957)	100
22	SLP 29	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	100
23	SLP 30	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (NR044803)	100
24	SLP 31	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
25	SLP 32	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	100
26	SLP 33	<i>Pseudomonas cissicola</i> (NR044803)	100
27	SLP 34	<i>Staphylococcus</i> sp. (619957)	99
28	SLP 35	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
29	SLP 36	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
30	SLP 37	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
31	SLP 38	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
32	SLP 39	<i>Enterobacter cloacae</i> (NR028912)	99
33	SLP 40	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
34	SLP 42	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
35	SLP 44	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
36	SLP 45	<i>Photobacterium damsela</i> (NR040831)	100
37	SLP 46	<i>Pseudomonas</i> sp. (464935)	99
38	SLP 48	<i>Pseudomonas</i> sp. (464935)	100
39	SLP 49	<i>Vibrio pomeroyi</i> (NR025547)	100
40	SLP 50	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
41	SLP 51	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	100
42	SLP 52	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	88
43	SLP 53	<i>Bacillus pumilus</i> (NR043242)	93
44	SLP 57	<i>Zooshikella ganghwensis</i> (NR025668)	99
45	SLP 58	<i>Vibrio</i> sp. (1795478)	100
46	SLP 59	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (483980)	97

nían de branquias, gónada, digestivo, mucus y larvas (Tabla 2). La cepa que presentó un mayor halo de inhibición representativo fue SLP 1 con 35 mm.

Pruebas enzimáticas

Los resultados de hemólisis demostraron que 8 cepas presentaron capacidad para hemolizar glóbulos rojos de la sangre. Siendo la cepa SLP 1 la única que no generó

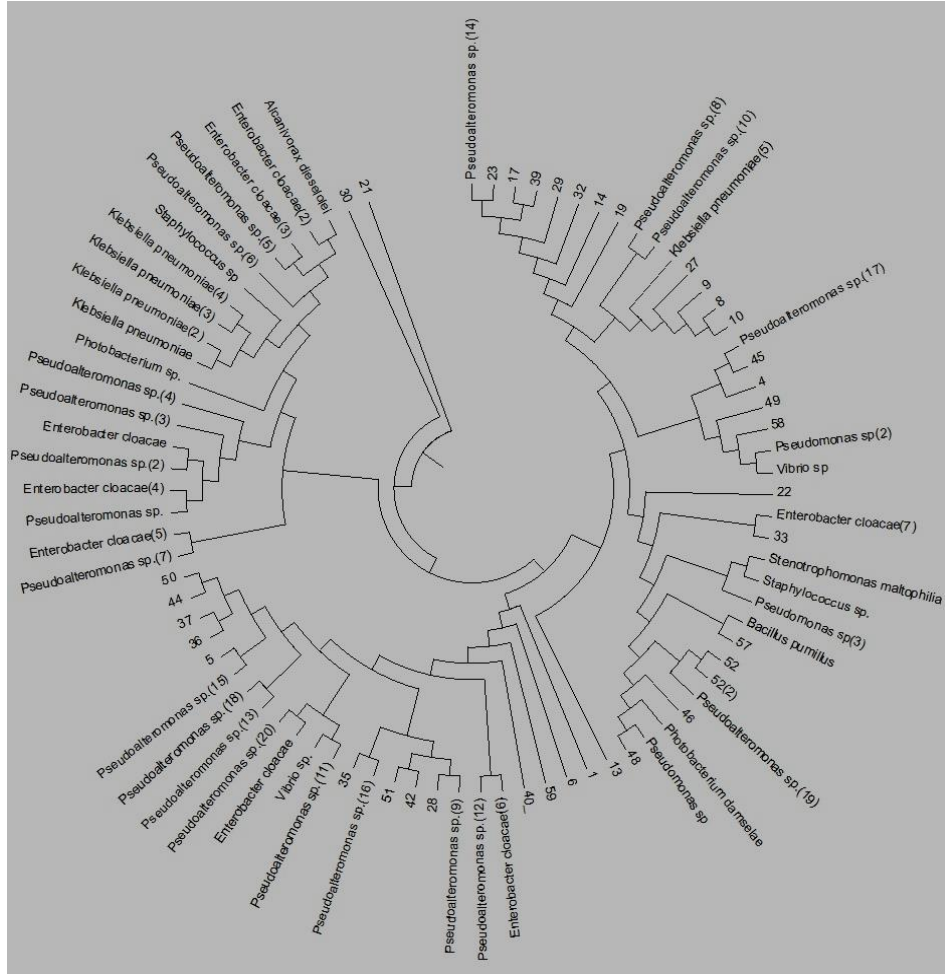


Figura 1. Árbol filogenético basado en secuencias de 16S RNAr de la microbiota aislada desde *Seriola lalandi* realizado con una repetición de 1000 veces. Los números representan las secuencias aisladas y los nombres fueron identificados a través de blast.

hemolisis (Tabla 3), así como también la única que fue negativa para los análisis de proteólisis y lipólisis.

DISCUSIÓN

El mar, que abarca más del 70% de la superficie del planeta, contiene una excepcional diversidad biológica que representa más del 95% de la biosfera (Spizek *et al.*, 2010). Por lo tanto, constituye una piscina infinita de diversidad microbiana, lo que representa una valiosa fuente de recursos para la biotecnología (Fenical & Jensen, 2006). Durante las últimas décadas, los microorganismos marinos y en particular las bacterias, han demostrado su potencialidad en la producción de antimicrobianos (Berdy, 2005). Debido a la persistente problemática de la presencia de microorganismos patógenos en los sistemas de cultivos, existe la necesidad urgente de buscar nuevos agentes antimicrobianos y nuevas estrategias para contrarrestar los microorganismos.

La información disponible sobre la composición de la microbiota del género *Seriola*, es escasa y existen algunos estudios de la microbiota de *Seriola quinqueradiata* reportada por Sakata *et al.* (1978), quienes con métodos de cultivo clásicos encontraron que el tracto gastrointestinal se compone principalmente de *Vibrio* spp., así como géneros de *Proteobacteria* y *Pseudomonas*. Aguilera *et al.* (2013) describen la población bacteriana cultivable asociada al tracto intestinal de *S. lalandi*, identificando un total de 16 géneros aislados, donde *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Staphylococcus* fueron predominantes. En el presente estudio se observó que los aislados de *S. lalandi* correspondieron a: *Pseudoalteromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Alcanivorax* y *Bacillus*. En otras especies de peces como *Epinephelus alexandrinus* y *Dicentrarchus*

Tabla 2. Actividad inhibidora de las cepas bacterianas aisladas desde *Seriola lalandi*.

Patógeno	Bacteria	Especie	Halo de inhibición(mm)	Origen
<i>Yersinia ruckeri</i>	SLP 1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	35	Juveniles (digestivo)
	SLP 13	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	30	Juveniles (digestivo)
	SLP 9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	Juveniles (digestivo)
<i>Vibrio cholerae</i>	SLP 13	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	20	Juveniles (digestivo)
	SLP 14	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	20	Juveniles (digestivo)
<i>Vibrio anguillarum</i>	SLP 45	<i>Photobacterium damsela</i>	16	Larvas
<i>Enterobacter cloacae</i>	SLP 23	<i>Enterobacter cloacae</i>	26	Juveniles (mucus)
<i>Enterococcus faecalis</i>	SLP 40	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	25	Larvas
	SLP 46	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	Larvas
<i>Klebsiella</i> sp.	SLP 49	<i>Vibrio pomeroyi</i>	20	Larvas

Tabla 3. Actividad enzimática de las cepas aisladas desde *Seriola lalandi*.

Bacteria	Especie	Hemolisis	Lipolisis	Proteolisis
SLP 1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Hemolisis γ	Negativo	Negativo
SLP 13	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Hemolisis α	Positivo	Positivo
SLP 9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hemolisis α	Positivo	Positivo
SLP 14	<i>Enterobacter cloacae</i>	Hemolisis α	Positivo	Positivo
SLP 45	<i>Photobacterium damsela</i>	Hemolisis β	Positivo	Positivo
SLP 23	<i>Enterobacter cloacae</i>	Hemolisis α	Positivo	Positivo
SLP 40	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Hemolisis β	Positivo	Positivo
SLP 46	<i>Pseudomonas</i> sp.	Hemolisis α	Positivo	Positivo
SLP 49	<i>Vibrio pomeroyi</i>	Hemolisis β	Positivo	Positivo

labrax se aislaron cepas como *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella ozanae* (Nawaz *et al.*, 2012). Al respecto, la presencia de los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* en *S. lalandi*, indica que estos géneros bacterianos también son comunes en otras especies de peces.

Además, se encontró que de las 46 cepas bacterianas identificadas 9 presentaron actividad inhibidora contra bacterias que han sido señaladas como patógenos de diferentes organismos como: *Vibrio cholerae* (Peters *et al.*, 2015), *Yersinia ruckeri* (Austin & Austin, 2007), *Enterococcus faecalis* (Dufourcq *et al.*, 2013), *Enterobacter cloacae* (Keller *et al.*, 1998), *Klebsiella* sp. (Echeverri *et al.*, 2010) y *Vibrio anguillarum* (Prol-García & Pintado, 2013.). De estos resultados se concluye que del total de los aislados, el 17% posee actividad antimicrobiana contra los patógenos estudiados, siendo la cepa SLP 1 (*Pseudoalteromonas* sp.) la bacteria que presentó los mejores resultados de inhibición.

La identificación del nombre de la especie de la cepa SLP 1 como *Pseudoalteromonas* sp. coincide con los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos. Al respecto, se ha señalado la actividad benéfica de *Pseudoalteromonas* sp. en otros estudios (Gram *et al.*,

2010), como uso de probióticos en peces (Sherman *et al.*, 2005), inhibidor del patógeno *V. harveyi* (Morya *et al.*, 2014), probióticos en moluscos (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2014) y en crustáceos (Pham *et al.*, 2014).

También, varios autores han demostrado que las bacterias marinas del género *Pseudoalteromonas* son productoras de metabolitos con actividad biológica como enzimas extracelulares, polímeros, péptidos, antivirales, sustancias y proteínas de bajo y alto peso molecular con actividades antimicrobianas (Bowman, 2007; Thomas *et al.*, 2008; López *et al.*, 2012). Además, Longeon *et al.* (2004) indican que la proteína P-153 secretada por *Pseudoalteromonas* sp. X153 muestra buena actividad inhibitoria frente a cepas patógenas humanas. Dufourcq *et al.* (2013) también encontraron que *Pseudoalteromonas* sp. es inhibidora del patógeno *E. faecalis*.

La cepa SLP 1 (*Pseudoalteromonas* sp.) también resultó negativa a las pruebas enzimáticas de hemolisis, proteolisis y lipolisis. Al no tener actividad hemolítica y no destruir los glóbulos rojos, no actuaría como una especie virulenta o patógena en el hospedador. Al respecto, Bravo *et al.* (2009) señalan que la actividad hemolítica es producida por la acción de una enzima llamada hemolisina que lisa los eritrocitos de la sangre, y que esta propiedad es indeseable según los criterios

de selección para una cepa probiótica. De acuerdo a esto, Neu *et al.* (2014) discuten igualmente que la aplicación de probióticos requiere que no cause efectos secundarios, tales como toxicidad en organismos eucariotas. Al respecto, Ma *et al.* (2014) encontraron que *Pseudoalteromonas* sp. complementada en la dieta del pepino de mar *Apostichopus japonicus*, mejora la actividad enzimática digestiva y estimula la respuesta inmune mejorando la resistencia a la infección de *Vibrio splendidus*.

Las bacterias probióticas pueden ser una buena alternativa para evitar el uso de antibióticos. Además, pueden proporcionar beneficios para el huésped a través de la modulación directa o indirecta de la microbiota intestinal, mejorando el sistema inmune y el crecimiento, proporcionando una mejor resistencia a enfermedades (Merrifield *et al.*, 2010a). Autores, como Bhandari *et al.* (2008) y Klose *et al.* (2010) sugieren que el aislamiento de probióticos nativos de cada especie de interés favorecería su establecimiento en el intestino y las interacciones con la microbiota residente. Estos antecedentes indican que *Pseudoalteromonas* sp. aislada en este trabajo podría ser utilizada como probiótico en la fase larval del cultivo de *S. lalandi*, ya que fue aislada de esta misma especie. Una alternativa es adicionarla en el alimento vivo de las larvas como rotíferos y artemias, actuando como vector del probiótico. Además, este potencial probiótico presentó actividad inhibitoria contra patógenos, no es una especie hemolítica por lo tanto no sería una especie virulenta. Finalmente, esta cepa SLP 1 podría ser una buena candidata para ser utilizada en etapas larvales, más aun cuando *Pseudoalteromonas* sp. es una bacteria dominante en el tracto digestivo de *S. lalandi*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al programa FONDEF-CONICYT proyecto D10I1050 por el financiamiento de esta investigación. Así como, a los revisores anónimos y editor por sus comentarios y propuestas para mejorar este manuscrito.

REFERENCES

Aguilera, E., G. Yany & J. Romero. 2013. Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(3): 395-403.

Austin, B. & D.A. Austin. 2007. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Springer-Praxis, Godalming, pp. 207-217.

Bhandari, S.K., B. Xu, C. Nyachoti, D. Giesting & D. Kraus. 2008. Evaluation of alternatives to antibiotics using an K88 model of piglet diarrhea: effects on gut microbial ecology. *J. Anim. Sci.*, 86(4): 836-847.

Bhandari, S.K., F.O. Opapeju, D.O. Krause & C.M. Nyachoti. 2010. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: performance and gut microbial population. *Livest. Sci.*, 133(1): 185-188.

Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Tokyo J. Antibiotic.*, 58: 1-26.

Bowman, J.P. 2007. Bioactive compounds synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs*, 5: 220-241.

Bravo, L., Y. Correa, J. Clausell, A. Fernández, M. Ramírez, F. Núñez, Y. Ledo & Y. Cruz. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Rev. Chil. Infectol.*, 26(3): 233-23.

Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter & H.F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 148: 107-127.

Carnevali, O., G. Mosconi, A. Cambi, S. Ridolfi, S. Zanuy & A. Polzonetti-Magni. 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture*, 202: 249-256.

Cowan, S.T. & L.J. Steel. 1993. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University, Cambridge, 352 pp.

Dimitroglou, A., D.L. Merrifield, O. Carnevali, S. Picchietti, M. Avella, C. Daniels, D. Güroy & S.J. Davies. 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production a Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1-16.

Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja & A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 97-101.

Dufourcq, R., E. Chalkiadakis, M. Fauchon, E. Deslandes, V. Kerjean, S. Chanteau, E. Petit, J. Guezennec & M. Dupont-Rouzeyrol. 2013. Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia. *Lett. Appl. Microbiol.*, 58(2): 102-108.

Echeverri, T., M. Lina, C. Correa & J. Carlos. 2010. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*, 23(3): 240-249.

- Faramarzi, M., S. Kiaalvandi, M. Lashkarbolooki & F. Iranshahi. 2011. The investigation of *Lactobacillus acidophilus* as probiotics on growth performance and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Sci.*, 6(1): 32-38.
- Fenical, W. & P.R. Jensen. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.*, 2: 666-673.
- Gram, L., J. Melchiorson & J. Bruhn. 2010. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Mar. Biotechnol.*, 12(4): 439-451.
- Hovda, M.B., R. Fontanillas, C. McGurk, A. Obach & B.J. Rosnes. 2012. Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Res.*, 43: 154-159.
- Kesarcodi-Watson, A., P. Miner, J. Nicolas, K. Asmani & R. Robert. 2014. Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. *Aquacult. Res.*, 2014: 1-10. doi: 10.1111/are. 12579.
- Kumar, S., K. Tamura, I. Jakobsen & M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17(12): 1244-1245.
- Kim, D.H. & B. Austin. 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 513-524.
- Keller, R., M. Pedroso, R. Ritchmann & R. Silva. 1998. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect. Immunol.*, 66(2): 645-649.
- Klose, V., K. Bayer, R. Bruckbeck, G. Schatzmayr & P. Loibner. 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Vet. Microbiol.*, 144(3): 515-521.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2010. Marine *Bacillus* spp. associated with the egg capsule of *Concholepas concholepas* (Common Name "Loco") have an inhibitory activity toward the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Ecol.*, 60: 599-605.
- Longeon, A., J. Peduzzi, M. Barthelemy, S. Corre, J.L. Nicolas & M. Guyot. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar. Biotechnol.*, 6: 633-641.
- López, R., V. Monteón, E. González, R. Montejo, Y. Monteón & M. Chan. 2012. Isolation and assessment of the crude extract antimicrobial activity of marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, 43(4): 38-46 pp.
- Ma, Y., F. Sun, C. Zhang, P. Bao, S. Cao & M. Zhang. 2014. Effects of *Pseudoalteromonas* sp. BC228 on digestive enzyme activity and immune response of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *J. Ocean Univ. China*, 13(6): 1061-1066.
- Merrifield, D.L., A. Dimitroglou, G. Bradley, R. Baker & S. Davies. 2010a. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.*, 16: 504-510.
- Mohapatra, S., T. Chakraborty, A.K. Prusty, P. Das, K. Paniprasad & K.N. Mohanta. 2012. Use of probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth nutrient digestibility, retention digestive enzyme activities and intestinal. *Microflora. Aquacult. Nutr.*, 18: 1-11.
- Mohideen, M.M., A. Kader, T.S. Mohan, S.P. Mohamed & M.I. Hussain. 2010. Effect of probiotic bacteria on the growth rate of fresh water fish, *Catla catla*. *Int. J. Biol. Technol.*, 1(2): 113-117.
- Moran, D., C. Smith, B. Gara & C. Poortenaar. 2007. Reproductive behavior and early development in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquaculture*, 262: 95-104.
- Morya, V.K., W. Choi & E. Kim. 2014. Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas* sp. from fermented Korean food, as an antagonist to *Vibrio harveyi*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 172(7): 3390-3401.
- Navarrete, P., F. Magne, C. Araneda, P. Fuentes, L. Barros, R. Opazo, R. Espejo & J. Romero. 2012. PCR-TTGE Analysis of 16SrRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE* 7(2): e31335. doi:10.1371/ journal.pone. 0031335.
- Nayak, S.K. 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquacult. Res.*, 41: 1553-1573.
- Nawaz, M., S.A. Khan, Q. Tran, K. Sung, A.A. Khan, I. Adamu & R.S. Steele. 2012. Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand. *Int. J. Food Microbiol.*, 155(3): 179-84.
- Ngan, P.T & T.Q. Phu. 2011. Effects of *Bacillus* bacteria (B8, B37, B38) on water quality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured tanks. *Proceedings of the 4th Aquaculture and Fisheries Conference*, pp. 28-41.
- Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai & V. Vuthiphanchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Vet. Microbiol.*, 159: 443-450.

- Neu, A.K., M. Månsson, L. Gram & J. Prol-García. 2014. Toxicity of bioactive and probiotic marine bacteria and their secondary metabolites in *Artemia* sp. and *Caenorhabditis elegans* as eukaryotic model organisms. *Appl. Environm. Microbiol.*, 80(1): 146-153.
- Peterson, B.C., N.J. Booth & B.B. Manning. 2012. Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquacult. Nutr.*, 18: 132-137.
- Peters, M.C. 2015. Analysis of the stability of a type III secretion system containing pathogenicity island (PII-3) in the human pathogen *Vibrio cholerae*. *Bach. Sci. Thesis*, University of Delaware, Delaware, 62 pp.
- Pham, D., D. Ansquer, A. Chevalier, C. Dauga, A. Peyramale, N. Wabete & Y. Labreuche. 2014. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture*, 432: 475-482.
- Poortenaar, C., S. Hoocker & N. Sharp. 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*, 201: 271-286
- Prol-García, M & J. Pintado. 2013. Effectiveness of probiotic *Phaeobacter* bacteria grown in biofilters against *Vibrio anguillarum* infections in the rearing of turbot (*Psetta maxima*) larvae. *Mar. Biotechnol.*, 15: 726-738.
- Rodríguez, M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 197 pp.
- Saad, N., C. Delattre, M. Urdaci, J. Schmitter & P. Bressollier. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT- Food Sci. Biol. Technol.*, 50(1): 1-16.
- Sakata, T., M. Nakaji & D. Kakimoto. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish I: General characterization of the isolates from yellow tail. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 27: 65-71.
- Sherman, P.M., J.C. Ossa & K. Johnson-Henry. 2009. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr. Clin. Pract.*, 24(1): 10-14.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lypholitic activity of microorganism and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. *Anton Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.*, 23(1): 15-22.
- Sihag, R.C. & P. Sharma. 2012. Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture. *J. Fish Aquatic Sci.*, 7(2): 72-103.
- Spizsek, J., J. Novotna, T. Rezanka & A. Demain. 2010. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *J. Int. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 1241-1248.
- Velmurugan, S. & S. Rajagopal. 2009. Beneficial uses of probiotics in mass scale production of marine ornamental fish. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(4): 185-190.
- Wang, Y.B & Q. Gu. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Mar. Biol. Res.*, 6: 327-332.
- Yanbo, W. & X. Zirong. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 127: 283-292.

Received: 16 June 2015; Accepted: 9 November 2015