



Análisis *in vitro* de la actividad antibacteriana *Oedogonium capillare* contra bacterias patógenas de peces

***In vitro* analysis of the antibacterial activity of *Oedogonium capillare* against pathogenic bacteria in fish**

Pilar Negrete Redondo* Guadalupe Figueroa* Jorge Romero Jarero*
Roxana López Simeón*

Abstract

The present study proved *in vitro* the capability of an extract of *Oedogonium capillare*, a fresh water green algae, to be an effective antibacterial agent against 23 different bacterial species of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae and Vibrionaceae families, that are pathogens in humans and important in aquaculture. All the different wild strains were isolated from *Carassius auratus* fish cultivated in fish farms in the state of Morelos, Mexico. After being purified the strains were identified through the API-20E and API-20NE methods. The algae were collected from the ponds located in the "Center of Biological and Aquaculture Researches" in Xochimilco, Mexico. After the algae had been dried and homogenized, they were subjected to hexane extractions at reflux temperature. The second extraction was made using a chromatographic column of silica gel and ethyl-chlorophorm. In order to determine the susceptibility of bacteria to the activity of the extract a standardized diffusion disk test was carried out. Filtered paper disks were saturated with the extract obtained from the *O. capillare* algae and commercial antibiotics widely used in the fish industry such as: kanamycin, chloramphenicol and tetracycline. In order to determine the presence or R-plasmid in the strains, the alkaline lysis technique, was used. The whole experiment was mirrored using strains of the American Type Culture Collection. The antibacterial behavior of *O. capillare* was compared with each of the aforementioned commercial antibiotics with a correlation analysis. High correlation coefficients were obtained between the activity of the algae extract and the antibiotics used in this study. Of the three antibiotics studied, kanamycin was found to be the most related one to the antibacterial activity of *O. capillare*. A higher antibacterial activity of the extract was found on the collection strains. The average diameter of the inhibition halos in the cultures of the four bacterial families of this group was greater than that of the wild strains, possibly due to the presence of R-plasmids in the latter group.

Key words: NATURAL EXTRACTS , R-PLASMIDS, AQUACULTURE, OEDOGONIUM CAPILLARE, ANTIBIOTICS, FISH PATHOGENIC BACTERIA.

Resumen

En el presente estudio se comprobó, *in vitro*, la capacidad del extracto que se obtuvo a partir del alga verde dulce acuícola, *Oedogonium capillare*, con el propósito de inhibir el crecimiento de 23 diferentes bacterias, tanto patógenas de humanos como de importancia ictiopatógena, pertenecientes a las familias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae y Vibrionaceae. Las diferentes cepas bacterianas silvestres se aislaron a partir de peces *Carassius auratus*, cultivados en granjas acuícolas en Morelos, México; después de su purificación se identificaron mediante la técnica API-20E y API-20NE. Las algas que se recolectaron de los estanques para su cultivo se instalaron en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas, en Xochimilco. Secas y homogeneizadas, las algas se sometieron a dos extracciones con hexano a temperatura de reflujo; la segunda extracción se realizó con una columna cromatográfica de sílica gel y cloroformo etílico. Con el fin de determinar la sensibilidad de las bacterias a la actividad del extracto, se instrumentó el sistema estandarizado de pruebas de difusión discos. Se impregnaron discos de papel filtro con el extracto obtenido del alga *O. capillare* y con antibióticos comerciales de mayor uso en la acuicultura: kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina. Se efectuó la técnica de lisis alcalina para la extracción de plásmidos-R a fin de determinar su presencia en las cepas. Todo el experimento se replicó mediante cepas bacterianas de la American Type Culture Collection. Se comparó el comportamiento como antibacteriano de *O. capillare* con cada uno de los antibióticos comerciales descritos, por medio de un análisis de correlación. Se obtuvieron altos coeficientes de correlación entre la forma de actuar del extracto del alga y los antibióticos empleados en este estudio. La actividad antibacteriana de *O. capillare* está más relacionada con la kanamicina que con los otros dos antibióticos. En todas las cepas de colección se registró mayor actividad antibacteriana del extracto, el promedio de los diámetros de los halos de inhibición de las especies de las cuatro familias bacterianas de este grupo fue mayor que los del grupo silvestre, posiblemente debido a la presencia de plásmidos-R en este último grupo.

Palabras clave: EXTRACTOS NATURALES, PLÁSMIDOS-R, ACUICULTURA, OEDOGONIUM CAPILLARE, ANTIBIÓTICOS, PATÓGENOS DE PECES, BACTERIAS.

Recibido el 10 de febrero de 2005 y aceptado el 22 de agosto de 2005.

*Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento El Hombre y su Ambiente, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04960, México, D. F.

**Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

From an economic perspective, fish farming is an activity that can be used as an effective method for increasing food production, for human as well as for animal consumption, in order to create new sources of income that allow the diversification of the regional economy.¹

The efficiency of a fish farm is determined based on diverse aspects such as: productivity, product quality, resistance to diseases and environmental factors, among others. Fish farming is frequently affected as a consequence of environmental variations, inadequate handling procedures, high population densities, indiscriminate use of antimicrobial agents, unfavorable water temperature and inadequate chemical quality of the water. All of these factors produce stress in fish which then creates important physiological alterations and decreases their defense mechanisms, making fish more susceptible to infectious diseases caused by opportunistic pathogens present in the environment. Infectious diseases are an important factor that considerably limits the productive and commercial potential of fish farms.²

Bacterial infections are responsible for high mortality in fish, both free living and in farms.³ These pathogens can be a part of the normal bacterial microbiota of water and individuals, or it could enter the organism through vertical or horizontal contagion from fish that are incorporated into the farm system without previous quarantine, or even through the water or feed.⁴

Several bacterial infections have been reported in fish, such as hemorrhagic septicemia caused by *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio fluvialis* and *Vibrio parahaemolyticus*, which can cause gastroenteritis when consumed by humans. Some of the pathogens that are part of the normal microbiota of fish can be harmful to humans, such as *Vibrio cholerae*.⁵ In order to prevent these infections fish farm owners indiscriminately use antibiotics both in the ponds, as well as in the feed. Furthermore, they are routinely used as growth promoters;^{6,7} nevertheless, when these are used indiscriminately, bacterial cells develop a resistance to the antibiotics through plasmids, which are extra-chromosome genetic elements known as R factors, that promote chromosome transfer and are considered to be important elements for the evolution of bacterial cells as they provide the capability to resist the toxic effects of antibiotics.⁸

Based on this, it is important to find new natural alternatives not only to prevent bacterial infection but also to prevent the use of antibiotics, and as a consequence the spread of plasmids that are responsible for antibiotic resistance. These alternatives have been con-

Introducción

El cultivo de peces, desde un enfoque económico, constituye una actividad que puede utilizarse como un eficaz método para incrementar la producción de alimento, tanto para consumo humano y animal como para crear nuevas fuentes de ingresos que permitan la diversificación de la economía regional.¹

La eficiencia de una granja acuícola se determina con base en diversos aspectos, como productividad, calidad del producto, resistencia a enfermedades y factores ambientales, entre otros. Con frecuencia el cultivo de peces se resulta afectado como consecuencia de variaciones ambientales, procedimientos inadecuados de manejo, alta densidad de poblaciones, uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, temperatura desfavorable e inadecuada calidad química del agua. Todos estos factores inducen estrés en los peces, que les ocasiona importantes alteraciones fisiológicas y disminución en sus mecanismos de defensa, los hace más susceptibles a enfermedades infecciosas ocasionadas por patógenos oportunistas presentes en el ambiente. Las enfermedades infecciosas constituyen un factor importante que limita considerablemente el potencial productivo y comercial de las empresas acuícolas.²

Las infecciones bacterianas son responsables de alta mortalidad de peces, tanto de vida libre como de cautiverio.³ Estos patógenos pueden ser parte de la microbiota bacteriana normal del agua y de los mismos organismos, o puede ingresar a los organismos mediante contagio, vertical y horizontal, de los peces que son incorporados al sistema de cultivo sin previa cuarentena y por medio del agua o del alimento.⁴

En peces se han registrado diferentes infecciones bacterianas, como la septicemia hemorrágica causada por *Seudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio parahaemolyticus*, que pueden provocar gastroenteritis durante su consumo por el humano. Algunos patógenos que forman parte de la microbiota normal de los peces pueden ser nocivos para el humano, como *Vibrio cholerae*.⁵ Para prevenir estas infecciones los acuicultores aplican de manera indiscriminada antibióticos, tanto en los estanques de cultivo como en el alimento para peces; asimismo, lo usan rutinariamente como factor de crecimiento;^{6,7} sin embargo, al ser usados indiscriminadamente, las células microbianas desarrollan resistencia a estos antibióticos a través de plásmidos, que son elementos genéticos extracromosomales llamados factor R, que promueven la transferencia cromosomal y son considerados elementos importantes para la evolución de las células bacterianas que les confieren la

sidered as practices that are non-aggressive towards the organisms.⁹

Medicinal plants, amongst them a great variety of fresh water and saltwater algae, are being used nowadays to prepare tinctures and extracts, or even as crude materials to obtain active substances. Herbal medicine has achieved satisfactory results as antibiotics, antiseptics and anti-malarial products, when the chemical and pharmacological components are prescribed.¹⁰

Sea algae from different genera and species have been demonstrated to have high bactericidal effects against *Alteromonas macleodii*, *A. rubra*, *A. undina*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* spp *Pseudomonas* spp and *Vibrio* spp.¹¹

Other extracts obtained from these algae have been shown to have a potent effect on growth and survival of fish, as well as antimicrobial properties against pathogens of aquatic organisms. Immanuel *et al.*¹² have demonstrated the antibiotic capacity of *Sargassum wightii* and *Ulva lactuca* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. The latter algae together with the green sea algae: *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; brown algae: *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; and red algae: *Gelidium* sp, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia* sp, *Hyphenia museoformis* and *Galaxuara rugosa* also possess antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. As for activity against *Escherichia coli*, the following fresh water green algae have shown antimicrobial capability: *Spirogyra* sp, *Chara* and *Cladophora*.^{13,14}

Wiffels *et al.*¹⁵ reported that some species of the algae genus *Laurencia*, such as *L. majuscula* and *L. obtusa*, have potent activity against human pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* sp.

The macrandrous and dioecious algae, *Oedogonium capillare*, belongs to the *Oedoniaceae* family (*Chlorophyta*), and it is formed by cylindrical vegetative cells of 36-38 µm in diameter and 36-210 µm long. The oogonium is solitary and cylindrical with a pore opening of 30-50 µm in diameter and 45-75 µm long. The oospore is globular and ovoid with an opaque wall 30-40 µm in diameter and 35-64 µm long. The antheridium is 30-48 µm long.¹⁶⁻¹⁸

The object of this study was to test *in vitro* the antibacterial capacity, the ability of a naturally derived substance to induce death or stop the growth of bacteria,^{19,20} of *O. capillare* against several species of bacteria, both wild as well as collection strains, that are pathogenic to humans and aquatic organisms.

Material and methods

The samples of *O. capillare* were collected from frog farm ponds located at the "Center of Biological

capacidad de resistir lo efectos tóxicos de los antibióticos.⁸

Con base en lo anterior, es importante buscar de nuevas alternativas naturales no sólo para prevenir las infecciones bacterianas sino también para prevenir su uso, así como con el fin de evitar la proliferación de plásmidos que son responsables de la resistencia a antibióticos. Estas alternativas han sido consideradas como prácticas no agresivas para los organismos.⁹

Actualmente las plantas medicinales, entre ellas gran variedad de algas tanto de agua dulce como de ambientes marinos, se emplean para preparar tinturas y extractos, o como materia cruda para obtener sus principios activos. La medicina herbolaria ha obtenido resultados satisfactorios como antibióticos, antisépticos y antimalariales, al dosificar los componentes químicos y farmacológicos.¹⁰

Se ha demostrado que algas marinas de diferentes géneros y especies poseen alto efecto bactericida contra las bacterias: *Alteromonas macleodii*, *A. rubra*, *A. undina*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* spp *Pseudomonas* spp y *Vibrio* spp.¹¹

Otros extractos obtenidos de estas algas han demostrado potente efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia, así como propiedades antimicrobianas contra patógenos de organismo acuáticos. De esta forma Immanuel *et al.*¹² han comprobado la capacidad antibiótica de *Sargassum wightii* y *Ulva lactuca* contra *Vibrio parahaemolyticus* en camarón, esta última al igual que las algas verdes marinas *Sphaerococcus coronopifolus*, *Enteromorpha linza*, *Cladophora coelothrix*, *Oodium tomesitosum*; algas cafés: *Colopomenia sinuosa*, *Padina pavonica*; algas rojas: *Gelidium* sp, *Laurencia obtusa*, *Polisiphonia* sp, *Hyphenia museoformis* y *Galaxuara rugosa*, también poseen actividad antimicrobial contra *Staphylococcus aureus*. Contra *Escherichia coli*, enteropatógeno de humanos, registraron actividad las algas verdes, dulce acuícolas: *Spirogyra* sp, *Chara* y *Cladophora*.^{13,14}

Por su lado, Wijffels *et al.*¹⁵ notifican en diferentes especies del alga *Laurencia*: *L. majuscula* y *L. obtusa*, potente actividad contra bacterias patógenas de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp.

El alga *Oedogonium capillare* pertenece a la familia *Oedoniaceae* (*Chlorophyta*), es macrandrous y dioecious y está constituida de células vegetativas cilíndricas de 36-38 µm de diámetro y 36-210 µm de longitud. El oogonium es solitario y cilíndrico, abierto en la parte superior por un poro de 30-50 µm de diámetro y 45-75 µm de longitud. La oospora es globoide y ovoide, con pared opaca de 30-40 µm de diámetro y 35-64 µm de longitud. El anteridio tiene 30-48 µm de longitud.¹⁶⁻¹⁸

Con base en lo anterior, el presente estudio

and Aquaculture Researches”, located in Xochimilco, Mexico.

When the algae presented a full bloom they were collected with a spoon type net and the most vigorous individuals were selected. Leaves and organic detritus were removed from the surface of the water before sampling was carried out. The algae were identified in the Phycology laboratory of the Metropolitan Autonomous University in Xochimilco, based on the descriptions by Gauthier and Lievre,¹⁶ Hin¹⁷ and Tiffany.¹⁸

A total of 45 kg of wet weight of algae were collected. They were washed under a constant water flow removing all foreign materials; they were then subjected to three washes by centrifuging at 30 g/s for 5 min each in order to remove any microorganisms. The material was observed in a dissection microscope in order to determine and verify their health and cleanliness status. The samples were dried in darkness at 18°C in order to avoid any degradation of pigments by effect of solar light and avoid any loss of their properties.

The algae were homogenized with an electric homogenizer. The product that was obtained (2 kg) was subjected to two consecutive extractions with 1 L of hexane at reflux temperature for 5 hours. The hexane extract was concentrated in a speedvac and a final 150 g of crude extract were obtained, which was used to carry out the preliminary tests on its antibiotic activity. The second extraction was carried out with a chromatographic column with silica gel with ethylchloroform ether (4:1 v/v) as the solvent; from this, six fractions were obtained for the microbiological analysis.

Wild-strain bacteria (Table 1) were obtained from 30 *Carassius auratus* fish located in farms within the state of Morelos, Mexico, that presented signs and lesions of bacteriosis: exophthalmia, skin ulcers, hemorrhagic fins, furuncles, altered swimming patterns and mouthing in the surface of the water, among others.²¹

Infected fish were removed from the farming ponds with a spoon net, placed in a tub with water and were anesthetized with tricaine sulphomethane (0.1 g/L). The skin surface of each of the fish was disinfected with alcohol and, after euthanasia was practiced, dissections were done by making a cut above the lateral line along the length of the body from the operculum to the anus, exposing the kidney.^{3,21,22} The kidney samples from each fish were extracted with a sterile bacteriological loop and spread in tubes with alkaline peptone water (pH 9) and incubated* at 20°C for 24 hours. Later they were spread into saccharose-bile salts-citrate-thio-sulfate agar plates (SBCT) and heart-brain infusion plates (HBI), and incubated at ambient temperature for 24 h.

The colonies that were obtained were subjected

tiene como objetivo probar *in vitro* la capacidad antibacterial, sustancia derivada de un ser vivo capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de una población bacteriana,^{19,20} del alga *O. capillare* contra diferentes especies de bacterias, tanto silvestres como de colección, que son patógenas para especies acuáticas y para el humano.

Material y métodos

Los especímenes de *O. capillare* fueron recolectados de estanques de cultivo de ranas, en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuáticas, en Xochimilco, Ciudad de México.

Cuando las algas presentaron crecimiento masivo, se recolectaron con red de cuchara y se seleccionaron los ejemplares más vigorosos. Las hojas y desechos orgánicos fueron removidos de la superficie del agua antes de efectuar el muestreo. Las algas fueron identificadas en el Laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, con base en las descripciones de Gauthier y Lievre,¹⁶ Hin¹⁷ y Tiffany.¹⁸

Se recolectaron 45 kg peso húmedo del alga, que se lavaron bajo flujo constante de agua limpia, removiéndose de esta forma toda la materia extraña, se sometieron a tres lavados por centrifugación a 30 g/seg durante 5 min cada uno con el fin de remover microorganismos. El material se observó con microscopio de disección para determinar y verificar su estado de salud y completa limpieza. Las muestras se secaron en la oscuridad a 18°C para evitar la degradación de los pigmentos por efecto de la luz solar y evitar la pérdida de sus propiedades.

Las algas fueron homogeneizadas con un homogeneizador eléctrico. El producto obtenido (2 kg) fue sometido a dos extracciones consecutivas con 1 L de hexano, a temperatura de reflujo durante 5 h. El extracto con hexano se concentró en un rotovapor de vacío y se obtuvo finalmente 150 g de este extracto crudo, que fue empleado para efectuar las pruebas preliminares de su actividad antibiótica. La segunda extracción se llevó a cabo mediante una columna cromatográfica de sílica gel, y éter de cloroformo etílico (4:1 v/v) como eluyente con lo cual se obtuvieron seis fracciones para el análisis microbiológico.

Las bacterias silvestres (Cuadro 1) se obtuvieron de 30 peces *Carassius auratus* cultivados en granjas de Morelos, México, que presentaron signos y lesiones de bacteriosis: exoftalmia, úlceras en la piel, aletas hemorrágicas, forúnculos, patrones alterados de nado y boqueo en la superficie del agua, entre otras.²¹

Los peces infectados se extrajeron de los estanques de cultivo con una red de cuchara y se colocaron en una tina con agua y fueron anestesiados con

to a purification process by successive spread in agar plates with the same medium as many times as needed depending on the strain. When the homogeneity of the cellular morphology was obtained, gram staining was carried out. Finally, the gram-negative strains were identified through API-20 E and API-20 NE^{23,24} commercial test sets, as well as complementary biochemical tests according to the criteria set out by Dalsgaard *et al.*,²⁵ Altwegg *et al.*,²⁶ Colwell,²⁷ Lee *et al.*,²⁸ Furniss *et al.*,²⁹ Cowan,³⁰ Brenner *et al.*,³¹ and Holt *et al.*³²

The collection bacteria were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Table 2), and spread in agar plates (HBI). According to each species they were incubated at ambient temperature or 35 °C for 24 h. This group was denominated “collection” for the purposes of the present study.

From the obtained cultures, both the wild strains as well as the collection ones were spread into tubes containing Möller and Hinton broth (M-H) until a turbidity of Mc Farland's 0.5 was obtained. Later on, each strain was spread using a sterile swab into agar plates with the same medium used before. Petri dishes had previously been divided into four equal sections, and 15 minutes after the strains had been spread into the M-H agar plates, a 0.5 cm diameter filter disc was placed in each of the sections. These had been previously sterilized and one impregnated with 30 µg/mL of the extract obtained from the algae, while the other three had been impregnated with 30 µg/mL of commercial antibiotics widely used in aquaculture such as: kanamycin, chloramphenicol and tetracycline. They were later incubated at ambient temperature or 35°C, depending on the strain, for 24 h. The resulting inhibition halos were measured with a micrometer including the diameter of the discs (Table 1 and 2).³³⁻³⁵ Halos greater than 7 mm were considered to be indicative of susceptible response (SANOFI).

In order to determine if the wild strains had plasmids that conferred resistance against antibiotics, we carried out their extraction using the alkaline lysis technique with the protocol that follows. All of the strains were spread in Luria-Bertani agar (LB) plates and incubated at 30°C for 24 h. They were then transferred into 5 mL tubes with LB broth and incubated in a water bath with a stirrer at 30°C for 24 h. A total of 2 mL of the culture were transferred into a sterile 2 mL Eppendorf tube, centrifuged at 14 000 *g/s* for 30 s, and the supernatant was removed. The remaining pellet was re-suspended into 100 µL of lysozyme solution by a 1 min vortex. After that it was incubated on ice for 30 min, 200 µL of duodecyl sodium sulfate were added and softly mixed by inversion and incubated for 5 min on ice. Later 150 µL of 3M sodium acetate were added, softly mixed by inverting the tube and incubated for 60 min. The tubes were then centrifuged at

sulfometano de tricáina (0.1 g/L), la superficie del cuerpo de cada uno de los peces se desinfectó con alcohol, después de practicada la eutanasia se efectuaron las disecciones haciendo un corte por arriba de la línea lateral y a lo largo del cuerpo, desde el opérculo y hasta el ano, exponiendo de esta manera el riñón.^{3,21,22} Las muestras de riñón de los peces se extrajeron con una asa bacteriológica estéril, se sembraron en tubos con agua peptonada alcalina (pH 9) y se incubaron* a 20°C durante 24 h. Posteriormente se sembraron en placas de agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS) y infusión cerebro-corazón (ICC) y se volvieron a incubar a temperatura ambiente durante 24 h.

Las colonias obtenidas fueron sometidas al proceso de purificación por medio de resiembras sucesivas en placas agar del mismo medio de cultivo, tantas veces como fue necesario dependiendo de la cepa y hasta obtener la homogeneidad en la morfología celular se efectuó la tinción gram. Finalmente las cepas gramnegativas fueron identificadas mediante galerías comerciales API-20 y API-20E^{23,24} y pruebas bioquímicas complementarias de acuerdo con los criterios de Dalsgaard *et al.*,²⁵ Altwegg *et al.*,²⁶ Colwell,²⁷ Lee *et al.*,²⁸ Furniss *et al.*,²⁹ Cowan,³⁰ Brenner *et al.*³¹ y Holt *et al.*³²

Las bacterias de colección se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) (Cuadro 2), se sembraron en placas de agar (BHI); según la especie las cepas de colección se incubaron a temperatura ambiente o a 35°C durante 24 h. Este grupo fue llamado de “colección” para propósitos del presente estudio.

A partir de los cultivos obtenidos, tanto las cepas “silvestres” como de “colección, se sembraron en tubos con caldo de Möller y Hinton (M-H) hasta obtener turbidez 0.5 de Mc Farland; después cada cepa se sembró en placas de agar del mismo medio usando un hisopo estéril. Previamente las cajas de Petri se dividieron en cuatro secciones iguales, después de 15 min de ser sembradas las cepas en las placas de agar de M-H; en cada una de las secciones se colocó un disco de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, previamente esterilizado e impregnado con 30 µg/mL del extracto obtenido a partir del alga, y tres más impregnados con 30 µg/mL de los antibióticos comerciales de mayor uso en acuicultura: kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina. Posteriormente fueron incubados a temperatura ambiente o a 35°C, dependiendo de la cepa, durante 24 h. Por último, los halos de inhibición se midieron con un micrómetro, incluyendo el diámetro de los discos³³⁻³⁵ (Cuadros 1 y 2). Para aceptar como

*230-400 mesh-Merck.

14 000 *g/s* for 5 min and the supernatant was transferred into another sterile Eppendorf tube. A total of 1000 μL of ice-cold ethanol were added, incubated for 30 min and then centrifuged once more at 14 000 *g/s* for 30 min the supernatant was removed and the remaining pellet was dissolved with 100 μL of a solution of 0.1M sodium acetate and 0.05 μM pH 8 tris. This was later precipitated with 300 μL of ice-cold ethanol.

The supernatant was eliminated and 10 μL of a 5x sample buffering solution were added (25% saccharose, 5 μM sodium acetate, 0.05% bromophenol blue and 0.1% SDS).³⁶ The extractions were treated with I-AS type bovine pancreatic RNase at a concentration of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated in a water bath at 60°C for 10 min.

A total of 10 μL of the obtained samples were placed in the wells of 0.6% agarose gels for electrophoresis together with a molecular weight ladder marker: GENER RULER TM 1 Kb DNA LADDER. The gels were prepared with 0.5x TB borate running buffer and 0.6x agar. The gels were run at 70 V, 250 W for 45 minutes and stained with a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide solution in distilled water. Once the gels were stained, they were washed with water for 30 s to remove the excess of ethidium bromide and placed in a short wave UV ray transilluminator. The gels were photographed with an instant Polaroid camera with 667 film cartridges, fitted to a transilluminator.

The experiment was mirrored with the collection strains obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), corresponding to: a) *Alcaligenes faecalis* (ATCC 35655) and *Flavobacterium marinoto* (ATCC 9200); b) of the Enterobacteriaceae family: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Serratia plymuthica* (ATCC 35656); c) of the Seudomonadaceae family: *Seudomonas cepaciae* (ATCC9056) and *Seudomonas aureginosa* (27853 ATCC); d) of the Aeromonadaceae family: *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654); and e) of the Vibrionaceae family: *Vibrio alginolyticus* (17802 ATCC).*

The experiment was repeated three times, both for the wild strains, as well as for the collection strains. Tables 1 and 2 report the average diameter of the halos obtained for each species. We compared the antibacterial behavior of *O. capillare* with each of the following antibiotics: kanamycin, chloramphenicol and tetracycline with correlation coefficients for bacterial family.

Results

The wild strains used for the *in vitro* tests were isolated from *Carassius auratus* fish and were identified as: a) from the Enterobacteriaceae family: *Enterobacter*

respuesta sensible, se consideraron los halos mayores a 7 mm (SANOFI).

Con el propósito de determinar si las cepas silvestres portaban plásmidos resistentes que les conferían resistencia contra los antibióticos se efectuó su extracción, para lo que se empleó la técnica de lisis alcalina, se procedió de la siguiente forma: Todas las cepas se sembraron en placas con agar de Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 30°C durante 24 h, posteriormente las colonias crecidas se resembraron en tubos con 5 mL de caldo de LB, se incubaron a baño María con agitación a 30°C durante 24 h. Se transfirieron 2 mL del cultivo a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 14 000 *g/seg* durante 30 seg, y se removió el sobrenadante. La pastilla que permanece en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 μL de solución de lisosima, esto se resuspendió agitándose con un vórtex durante 1 min; posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregaron 200 μL de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después se añadieron 150 μL de acetato de sodio 3 M, nuevamente se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó durante 60 min, otra vez se centrifugó durante 5 min a 14 000 *g/seg*, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril, se añadieron 1 000 μL de etanol frío y se incubó 30 min para posteriormente centrifugarse 30 min a 14 000 *g/seg*, se removió el sobrenadante, la pastilla se disolvió con 100 μL de acetato de sodio 0.1 M y tris 0.05M pH 8, y se reciprecipitó en 300 μL de etanol frío.

El sobrenadante se eliminó y se agregaron 10 μL de solución amortiguadora de muestra 5x (sacarosa al 25%, acetato de sodio 5 mM, azul de bromofenol al 0.05% y SDS al 0.1%).³⁶ Las extracciones se trataron con RNasa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubaron a baño María a 60°C durante 10 min.

Se aplicaron 10 μL de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. Los geles se prepararon con amortiguador de borato TB de corrida al 0.5x y 0.6x de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70 V de voltaje, 250 W de poder. Los geles se tiñeron durante 45 min y se revelaron con solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez revelados los geles, se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio y se colocaron en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles se tomaron con transiluminador con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667.

Las extracciones de las cepas aisladas se corrieron

agglomerans, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, and *Serratia plymuthica*; b) from the Seudomonadaceae family: *Seudomonas aeuroginosa*, *Seudomonas cepacia*, *Seudomonas diminuta*, *Seudomonas fluorescens*, *Seudomonas maltophilia*, *Seudomonas putida*, and *Seudomonas vesicularis*; c) from the Aeromonadaceae family: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sal. achromogenes*, and *Aeromonas sal. masoucida*; and d) of the Vibrionaceae family: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* (non-toxigenic), *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, as well as *Flavobacterium odoratum*.

The diameters of the inhibition halos obtained for each of the strains, both wild and collection, are reported in Tables 1 and 2. The extract of *O. capillare* algae showed antibacterial activity in both groups.

In all of the bacterial families there was greater bactericidal activity when the algae extract was used. The Vibrionaceae and Seudomonadaceae showed the greatest inhibition halo diameters, followed by the Enterobacteriaceae and Aeromonadaceae families.

Fifty percent of wild strain enterobacteria showed sensitivity to the extract; specifically *E. agglomerans* showed a higher sensitivity to the extract than to the commercial antibiotics. *C. freundii* had the highest sensitivity both to the extract as well as to the three commercial antibiotics used. When the activity of the extract and that of the commercial antibiotics was correlated we found that the activity of *O. capillare* had an antibacterial effect against enterobacteria, while the activity of the commercial antibiotics was not as high.

Of the *Seudomonas* strains approximately 57% was sensitive to the natural extract. *Seudomonas aerofaciens*, *Seudomonas fluorescens*, *Seudomonas maltophilia* and *Seudomonas putida* had a higher sensitivity to the natural extract than to any of the commercial antibiotics. On the other hand, *Seudomonas diminuta* and *Seudomonas vesicularis* were more sensitive to these antibiotics. It is evident, that in this group, *Seudomonas cepaciae* was equally sensitive to the natural algae extract as to the three antibiotics.

In this case the antibacterial activity of the *O. capillare* extract was more related to the activity of kanamycin than to the activity of the other two antibiotics.

The correlation coefficient of the activity of the extract, when confronted against the *Aeromonas* family of bacteria, was negative in relation to the bactericidal activity of the three commercial antibiotics used. Nevertheless, it showed a high bactericidal power due to the fact that 65% of the species in this group had a higher sensitivity to the algae extract. *Aeromonas caviae* was the most sensitive of all of the strains, as it had the inhibition halo with the largest diameter, even when compared to that of species of other families. The average inhibition halo diam-

en gel simultáneamente con el marcador de peso molecular conocido: GENE RULER TM 1kb DNA LADDER.

El experimento fue replicado con cepas de colección de la American Type Culture Collection (ATCC), cepas de: a) *Alcaligenes faecalis* (ATCC 35655) y *Flavobacterium marinoto* (ATCC 9200); b) de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Serratia plymuthica* (ATCC 35656); c) de la familia Seudomonadaceae: *Seudomonas cepaciae* (ATCC9056) y *Seudomonas aureginosa* (27853 ATCC); d) de la familia Aeromonadaceae: *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654); y e) de la familia Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus* (17802 ATCC).*

El experimento se repitió tres veces, tanto para las cepas silvestres como para las cepas de colección, en los cuadros 1 y 2 se notificó el promedio de la longitud de los halos obtenidos por especie. Se comparó el comportamiento como antibacterial de *O. capillare* con cada uno de los antibióticos kanamicina, cloranfenicol y tetraciclina usados en el presente estudio, por medio del coeficiente de correlación para cada familia bacteriana.

Resultados

Las cepas silvestres usadas para efectuar las pruebas *in vitro* se aislaron de peces *Carassius auratus* y fueron identificadas: a) de la familia Enterobacteriaceae: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, *Serratia plymuthica*; b) de la familia Seudomonadaceae: *Seudomonas aeuroginosa*, *Seudomonas cepacia*, *Seudomonas diminuta*, *Seudomonas fluorescens*, *Seudomonas maltophilia*, *Seudomonas putida*, *Seudomonas vesicularis*; c) de la familia Aeromonadaceae: *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sal. achromogenes*, *Aeromonas sal. masoucida*; y d) de la familia Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* (no toxigénico), *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, también se identificó la especie *Flavobacterium odoratum*.

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de cada una de las cepas, tanto silvestres como de colección, se encuentran registrados en los cuadros 1 y 2, en donde se puede observar que el extracto del alga *O. capillare* presentó actividad antibacterial en ambos grupos.

En todas las familias bacterianas se presentó mayor actividad bactericida cuando se usó el extracto del alga, las familias Vibrionaceae y Seudomonadaceae presentaron halos de inhibición de mayor diámetro,

*Rockville, MD, USA.

eter for *Aeromonas*, when treated with the extract, is greater than that of the halos obtained with the three commercial antibiotics.

From the Vibrionaceae family, 65% of the strains had a higher sensitivity to the extract when compared to the commercial antibiotics, which showed a relationship with the antibiotic activity of kanamycin with a correlation coefficient of 0.73. The species of this family that were found to be the most notably sensitive to the extract were *Vibrio fluvialis*, *V. alginolyticus*, and *V. hollisae*.

The *O. capillare* extract had a greater activity in all of the collection strains when compared to the wild strains. High correlation coefficients were obtained between the type of action of the extract and the antibiotics. The average diameter of the inhibition halos for the species in the four bacterial families was greater than those present in the wild strains; specifically, in the cases where same species comparisons could be made between wild and collection strains such as in: *E. coli*, *S. plymuthica*, *P. cepacia*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* (Table 1), we recorded inhibition halos in the wild strains smaller than those of their collection counterparts (Table 2). Based on these results we proceeded to extract the plasmids in order to confirm their presence in wild strains, which would alter the results by conferring resistance to antibiotics to the strains that have them. We found that all of the wild strains had R-plasmids, while all of the collection strains did not have them.

Discussion

As far as health is concerned, whatever the destination of aquaculture products, fish farming centers are not always operating at optimum conditions. In many cases the official health standards are not fulfilled in terms of the requirements for importing and exporting individuals for farming, quarantines, balanced and live feed, as well as critical points.³⁷⁻⁴⁰

The farm where the samples were taken from fish that had infection signs was found in these sanitary conditions for handling and production. From these, the isolated bacterial species were denominated "wild group" and belonged to the four main bacterial families: Enterobacteriaceae, Seudomonadaceae, Aeromonadaceae and Vibrionaceae, which include fish pathogen species of the greatest importance (Tables 1 and 2). The etiology relationship of some of them with their carriers has already been established as opportunistic pathogens;^{41,42} nevertheless, others such as *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Seudomonas aerofasciens*, *Seudomonas malthophilia*, *Seudomonas vesicularis*, *Seudomonas aeurogenosa*, *Proteus vulgaris* and *Bacillus subtilis*,

seguidas por las familias Enterobacteriaceae y Aeromonadaceae.

El 50% de las cepas del grupo silvestre de las enterobacterias presentó sensibilidad al extracto; específicamente *E. agglomerans* presentó mayor sensibilidad al extracto que a los antibióticos comerciales. *C. freudii* presentó mayor sensibilidad, tanto al extracto como al cloranfenicol, que a la kanamicina y a la tetraciclina. Al establecer la correlación de la actividad del extracto con cada uno de los antibióticos comerciales se obtuvo que el extracto *O. capillare* presentó actividad antibacteriana contra las enterobacterias; de forma semejante, la relación con la kanamicina, la tetraciclina y el cloranfenicol no fue tan alta.

De las cepas de *Seudomonas*, 57% presentó sensibilidad al extracto natural; *Seudomonas aerofaciens*, *Seudomonas fluorescens*, *Seudomonas maltophilia* y *Seudomonas putida* registraron mayor sensibilidad para el extracto del alga que para cualesquiera de los otros tres antibióticos. En contraparte, *Seudomonas diminuta* y *Seudomonas vesicularis* fueron más sensibles a estos antibióticos. Es evidente que en este grupo, *Seudomonas cepaciae* fue igualmente sensible tanto para el extracto de alga como para los tres antibióticos.

La actividad antibacteriana del extracto de *O. capillare* está más relacionada con la actividad de la kanamicina que con la de los otros dos antibióticos.

El coeficiente de correlación de la actividad del extracto contra las especies de la familia de bacterias de las *Aeromonas* fue negativo en relación con la actividad bactericida de los tres antibióticos usados; sin embargo, mostró poder más efectivo como bactericida dado que 65% de las especies de este grupo presentó mayor sensibilidad al extracto algal; en especial, *Aeromonas caviae* fue más sensible que todas las cepas, al formar el halo de inhibición de mayor diámetro, incluso que las especies de las demás familias. El promedio de los tamaños de los halos de inhibición para las *Aeromonas* es mayor que para los halos obtenidos con los otros tres antibióticos.

De las cepas de la familia de *Vibrios*, 65% registró mayor sensibilidad al extracto que a los antibióticos comerciales, mostrando relación con la actividad antibiótica de la kanamicina al registrar coeficiente de correlación de 0.73; *Vibrio fluvialis*, *V. alginolyticus*, y *V. hollisae* fueron notoriamente las especies de esta familia más sensibles al extracto.

En todas las cepas de colección se presentó mayor actividad en el extracto *O. capillare* que en las cepas silvestres. Se obtuvieron altos coeficientes de correlación entre la forma de actuar del extracto y los antibióticos. El promedio de los diámetros de inhibición de las especies de las cuatro familias bacterianas fueron mayores que las del grupo silvestre,

that are considered pathogenic for humans, have an unknown effect on aquatic farming. This gives further relevance to the activity of the extract under study, due to the fact that it not only showed activity against aquatic pathogens but also has an effect against human

específicamente para los casos en que se compararon las mismas especies tanto silvestres como de colección: *E. coli*, *S. plymuthica*, *P. cepacia*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (Cuadro 1), registraron halos de inhibición de menor diámetro

Cuadro 1

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA (mm) DE *Oedogonium capillare* Y ANTIBIÓTICOS COMERCIALES (KANAMICINA, CLORAMFENICOL Y TETRACICLINA) CONTRA CEPAS BACTERIANAS SILVESTRES
ANALYSIS OF CORRELATION BETWEEN THE ANTIBIOTIC ACTIVITY (mm) OF *Oedogonium capillare* AND THE COMMERCIAL ANTIBIOTICS (KANAMYCIN, CHLORAMPHENICOL AND TETRACYCLINE) AGAINST WILDBACTERIAL STRAINS

Wild strains	Extract				Comercial antibiotics				% correlation		
	<i>O. capillare</i>	<i>Kn</i>	<i>Cl</i>	<i>Tc</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>	<i>O. capillare</i>
					and <i>Kn</i>	and <i>Cl.</i>	and <i>Tc</i>				
Enterobacteriaceae											
<i>Citrobacter freundii</i>	24	16	24	20	1	0.34	0.34				
<i>Enterobacter agglomerans</i>	40	27	0	0							
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0							
<i>Serratia plymuthica</i>	24	16	24	20							
<i>Salmonella spp</i>	0	0	0	0							
Pseudomonadaceae											
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	40	30	20	20	0.79	0.11	0.45				
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	45	45	45							
<i>Pseudomonas diminuta</i>	22	24	23	24							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	40	30	20	20							
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	45	31	11	12							
<i>Pseudomonas putida</i>	20	21	11	0							
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	14	23	30	14							
Aeromonadacea											
<i>Aeromonas caviae</i>	50	18	12	0	(-) .07	(-) .71	(-) .99				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	24	27	35	19							
<i>Aeromonas sal.</i>	16	17	35	21							
<i>Achromogenes</i>											
<i>Aeromonas sal. masoucida</i>	21	17	12	20							
Vibrionaceae											
<i>Vibrio alginolyticus</i>	45	24	0	0	0.6	0.05	0.42				
<i>Vibrio cholerae</i>	15	20	21	9							
<i>Vibrio fluviales</i>	45	22	25	26							
<i>Vibrio hollisae</i>	45	30	12	9							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19	24	9	0							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20	19	0	0							
General					0.73	0.13	0.26				

Kn- kanamycine, Cl- chloramphenicol, Tc- tetracycline

pathogens.

In view of the constant risk of epizooties, fish farmers of the farm visited, in order to avoid economic losses, are indiscriminately using antibiotics such as kanamycin, chloramphenicol, oxytetracycline and tetracycline, in order to prevent and control infections in their facilities by incorporating them into the diets⁵ and systematic administration. These antibiotics are administered without first establishing the bacterial species that has infected their production, the spe-

que sus homólogos de colección (Cuadro 2). Con base en estos resultados se efectuó la extracción de plásmidos para comprobar si la presencia de este factor podría estar presente en las cepas silvestres, alterando los resultados y confiriendo resistencias a las cepas que los portan contra los antibióticos. Como resultado del anterior procedimiento se obtuvo que todas las cepas silvestres portaron plásmidos-R, de manera contraria en las cepas de colección no se registró la presencia de plásmidos en ningún caso.

Cuadro 2

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA, ENTRE EL EXTRACTO DE *Oedogonium capillare* Y LOS ANTIBIOTICOS KANAMICINA, CLORAMFENICOL Y TETRACICLINA CONTRA CEPAS BACTERIANAS DE LA AMERICAN TYPE COLLECTION (ATCC)

ANALYSIS OF CORRELATION BETWEEN THE ANTIBIOTIC ACTIVITY, THE *Oedogonium capillare*'s EXTRACT AND THE ANTIBIOTICS KANAMYCIN, CHLORAMPHENICOL AND TETRACYCLINE, AGAINST BACTERIAL STRAINS OF THE AMERICAN TYPE COLLECTION (ATCC)

Wild strains	Extract				% correlation		
	<i>O. capillare</i>	Kn	Cl	Tc	<i>O. capillare and Kn</i>	<i>O. capillare and Cl.</i>	<i>O. capillare and Tc</i>
Enterobacteriaceae							
<i>Alcaligenes faecalis</i>	56	0	20	0	0.3	0.1	0.06
<i>Escherichia coli</i>	46	20	17	0			
<i>Preotus vulgaris</i>	45	45	45	45			
<i>Serratia vulgaris</i>	36	11	15	0			
Pseudomonadaceae							
<i>Pseudomonas cepacia</i>	45	0	11	13	1	1	1
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	58	24	20	26			
Aeromonadacea							
<i>Aeromonas caviae</i>	45	45	45	45	1	1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	45	45	45	45			
Vibrionaceae							
<i>Vibrio algynolyticus</i>	45	2	11	16	0.56	0.71	0.8
<i>Vibrio campelli</i>	0	0	0	0			
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45	40	40	40			
Incerta sedis							
<i>Flavobacterium marino</i>	17	19	0	16			
Grampositives							
<i>Bacillus subtilis</i>	56	22	19	10			
General					0.3	0.5	0.3

Kn- kanamycine, Cl- chloramphenicol, Tc- tetracycline

cific antibiotic that has to be used against their bacterial problem or the required dose. Therefore, the wild strain bacteria included in this study, in contrast to those from collection strains, had plasmids conferring resistance to the aforementioned antibiotics; a situation that could be adding resistance to the antibacterial activity of the algae.

The presence of R-plasmids isolated from the meat of fish destined for human consumption, for use in aquariums or as pets represent a public health problem, due to the fact that these plasmids could be transmitted by the bacteria to human pathogens that could develop resistance to antibiotics. In this study, the difference between the diameters of the inhibition halos between the wild and collection species was primarily due to the presence of R-plasmids which conferred resistance against the antibiotics used in the experiment, possibly including the extract.

Based on this, the proposed alternative of using the extract obtained from *O. capillare* is a good option for aquaculture, due to the fact that the greater antibacterial activity was shown against bacteria belonging to several species of the *Aeromonas* and *Vibrio* genus, which are strains of fresh and sea water origin. The extract also showed a potential effect against human pathogenic bacteria, at least against those studied here, even gram-positive ones.

The use of this resource as a strategy against infections in fish farms represents a viable investment in Mexico because this algae is produced naturally and during the most part of the year in water systems such as the Xohimilco canals, which would reduce the costs of production.

Future studies shall have to test if the *O. capillare* extract has the capacity to generate resistance plasmids. The extract of *O. capillare*, as it is obtained from nature, is biodegradable; and therefore, cannot be considered an environmental pollutant.

Nevertheless, *in vivo* experiments have to be carried out in order to establish if it is possible to use the antibiotic obtained from *O. capillare* in live organisms. If possible, the administration path must be established, as well as dosage and innocuousness to live organism.

Acknowledgments

We thank the help provided by Rosa Martha Perez Gutierrez of the Superior School of Extractive Industries of the National Polytechnique Institute in the procedures for extracting the natural product used in this study.

Referencias

1. Wheaton E. Acuicultura y construcción de sistemas. México: AGT editor, 1982.

Discusión

Cualquiera que sea el destino de los productos de la acuicultura, los centros de producción acuícola no siempre se encuentran operando en óptimas condiciones, desde el punto de vista de la sanidad acuícola muchas veces no cumplen con las normas oficiales sanitarias, en cuanto a los requisitos para la importación y exportación de individuos para cultivo, cuarentenas, alimento balanceado y vivo, así como de puntos críticos.³⁷⁻⁴⁰

En estas condiciones sanitarias de manejo y producción se encontró la granja en donde fueron tomadas las muestras de los peces con signos de infección a partir de los cuales se aislaron las especies estudiadas, registradas como "grupo silvestre", pertenecientes a las cuatro principales familias bacterianas: Enterobacteriaceae, Seudomonadaceae, Aeromonadaceae y Vibrionaceae que incluyen especies de mayor importancia ictiopatógena (Cuadros 1 y 2). La relación etiológica de algunas de ellas con sus portados ha sido ya establecida experimentalmente como patógenos oportunistas;^{41,42} sin embargo, otras como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Seudomonas aerofasciens*, *Seudomonas malthophilia*, *Seudomonas vesicularis*, *Seudomonas aeuroginosa*, *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*, que se consideran hasta el momento patógenas para el humano, se desconoce el efecto que puedan tener para los cultivos acuáticos. Lo anterior viene a darle mayor importancia a la actividad del extracto estudiado, ya que no solamente presentó capacidad contra patógenos de organismos acuáticos sino que también ofrece efecto contra las bacterias patógenas humanas

Ante el constante riesgo de epizootias, los acuicultores en la granja visitada, para evitar las pérdidas económicas, están haciendo uso de antibióticos, como kanamicina, cloranfenicol, oxitetracilina y tetraciclina, para prevenir y controlar infecciones en sus instalaciones, incorporándolos a las dietas⁵ y administrándolos sistemáticamente. Estos antibióticos son administrados sin establecer previamente la especie de bacteria que ha infectado a la producción, el antibiótico específico que debe de ser usado contra la bacteria problema ni la dosificación requerida, por lo que las bacterias silvestres incluidas en el presente estudio, a diferencia de las cepas de colección, portaron plásmidos resistentes a los antibióticos mencionados, situación que podría estar agregando resistencia a la actividad antibacteriana del alga.

La presencia de plásmidos-R aislados de carne de pescado para consumo humano o con fines de acuarofilia o como animales de compañía representan un problema de salud pública, debido a que los

2. Torroella J J. Aspectos generales de patología infecciosa: En Patología en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura Madrid, España: Ed CATACYT, 1998.
3. Roberts R J. Patología de los peces. España: Ed Mundi-prensa, 1981.
4. Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens disease in farm and wild fish. London: Ellis Horwood Ltd, 1999.
5. Lamothe R. Importancia de la parasitología en el desarrollo de la acuicultura. México: Instituto de Biología UNAM. Hidalgo. 1991.
6. Romero J J, Salas T A. Estudio de frecuencia de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aislados en ambientes marinos. Memoria del V. Congreso Nacional de Biotecnología 1993 septiembre 7-16. Pto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Biotechnology y Bioingenierie, A C, 1993:3-4
7. Mandigan T M, Martinko M J, Parker J B. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice- Hall, 2000.
8. Tórtora G F, Funke B R, Case C I L. Biología de los microorganismos 3ª ed. España: Acriba, 1995.
9. Austin B, Baudet E, Stobie M. Inhibition of bacterial fish pathogen by *Tetraselmis suecica*. J Fish Diseases 1992;15:553-556.
10. Lima F J, Carvalho A F, Freitas S M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. Braz J Microbiol 2002;33:311-314.
11. Austin B, Billaud A C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of *Planococcus* recovered from sea water. J Fish Diseases 1990;13 :553-556
12. Immanuel G, Vincybai V C, Sivaram V, Palavesam A, Marian M P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles Aquaculture 236 (1/4), 2004:553-556
13. Mesmar M N, Abussaud, M The antibiotic activity of some aquatic plants and algal extracts. Jordan Qatar University Sci J 1991; 11:155-160
14. Samira Etahiri, Bultel-Ponce V, Caux C, Guyot M. New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. J Natural Prod 2001;64:1024-1027
15. Wijffels R H, Barbosa M, Janssen M, Wessels H S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). Biomol Eng 2003; 20: 255-259
16. Gauthier-Lievre L. Oedogoniacees Africaines. 2nd ed. Germany: J. Cramer, 1963.
17. Hirn K T. Monographie der Oedogoniaceen. H.R. Engelman, editor. New York: J. Cramer, Wihildon & Wesley, 1960.
18. Tiffany L H, Britton M E. The algae of Illinois. 2nd ed. Chicago: The University of Chicago, 1952.
19. Arista V A. Uso y abuso de antibióticos. Hosp Gral Mex Perinat. 2005;1-22.
20. Negrete R P, Perez G R, Vargas S R, Figueroa T

plásmidos pueden ser transmitidos mediante la bacteria que los portan, y provocan en los patógenos humanos resistencia a los antibióticos. En este trabajo, la diferencia entre los diámetros de los halos de inhibición entre las especies del grupo silvestre y de colección se debió a presencia de plásmidos-R que le confirieron resistencia también contra los antibióticos usados en el experimento, incluyendo el extracto.

Con base en lo anterior, la alternativa propuesta del extracto obtenido a partir del alga *O. capillare* presenta una buena alternativa para la acuicultura, ya que la mayor actividad antibacteriana se manifestó contra las bacterias pertenecientes a las diferentes especies de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, cepas que son de origen dulce acuícola y marinas. El extracto presentó también, potencial efecto contra las bacterias, al menos para las estudiadas en el presente estudio, patógenas para el humano, aun contra las grampositivas.

El uso de este recurso como estrategia contra infecciones en los cultivos acuícolas, representa una inversión viable en México, ya que esta alga se produce de forma natural y durante gran parte del año en los cuerpos de agua, como son los canales de Xochimilco, reduciéndose los costos de producción.

Futuros estudios deberán probar si el extracto de *O. capillare* tiene la capacidad de generar plásmidos resistentes.

El extracto de *O. capillare*, al ser de origen natural, cuenta con la bondad de ser biodegradable, por lo que no se puede considerar agente contaminante del ambiente.

Sin embargo, se deben efectuar los experimentos *in vivo* necesarios para establecer si es posible usar el antibiótico obtenido a partir de *O. capillare* en organismos vivos. De ser así, se deben establecer: su vía de administración, dosificación e inocuidad para organismos vivos.

Agradecimientos

Se agradece la ayuda de Rosa Martha Pérez Gutiérrez de la Escuela Superior de Industrias Extractivas del Instituto Politécnico Nacional, para los procedimientos de la extracción del extracto natural.

G, Gamboa S. Antimicrobial activity of *Oedogonium capillare*. Rev Lat Quim 2001;29:AP-10.

21. Michel C. Development of bacteria in fish and in water during a standardized experimental infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. In: Roberts R J, editor. Microbiological diseases of fish. London: Academic Press, 1982.
22. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases

- of fishes. In: Roberts R J, editor. Microbiol diseases of fish. London: Academic Press, 1982: 131-149
23. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria. 4th ed. France: Edition BioMerioux, 1997
 24. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria 2th. France: Ed. BioMerioux 1989.
 25. Dalsgaard I, Gudmundsdottir BK, Helgason S, Hoies S, Thoresen OF, Wichardt T *et al.* Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: Interlaboratory Evaluation and harmonization of methods. J Appl Microbiol 1998; 84:999-1006
 26. Altewegg M, Steigerwalt A G, Altwegg-Bissig R, Luthy-Hottenstein J, Brenner D J. Biochemical Identification of *Aeromonas Genospecies* Isolated from Humans. Am Soc Microbiol 1990; 28:258-264.
 27. Colwell RR, Mc Donnell M T, De Ley J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae. Fam Nov Int J Syst Bacteriol 1986; 36: 473-477
 28. Lee J V, Shread P, Furniss A L, Bryant T N. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F Vibrios Ef6). J Appl Bacteriol 1981; 50: 73-94
 29. Furniss A L, Lee J V, Donovan T S. Group F, a new Vibrio? Lancet II 1977; I: 565-566
 30. Cowan S T. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1974.
 31. Brenner D J, Hichman-Brenner F W, Lee J V, Steigerwalt A G, Fanning G R, Hollis G G, *et al.* *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. J Clin Microbiol 1983; 18: 816-821.
 32. Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, Dtalley J T, Williams T S. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. Baltimore Md: Williams & Wilkins, 1994.
 33. Barry A I, Thornsberry C. Susceptibility test by diffusion test procedures. In: Lennette, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1985:978-979.
 34. Giono C S. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectología 1983; III: 7:325.
 35. Stanley R S, Lynch S Medical Laboratory Technology. Washington: WB Saunders, 1986; 434-240
 36. Birnboim H C, Dolly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7: 1513-1523
 37. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México NOM-10 PESCA-1994. México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Federación, 1994
 38. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México NOM-11-PESCA-1994. México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Federación, 1994
 39. Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México. NOM-121. PESCA-1994. México: SEMARNAP. Diario Oficial de la Federación, 1995
 40. Negrete R P, Romero J J. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Rev Hidrobiol 1998; 8 : 43-54.
 41. Kinkelin P, Michelin Ch, Ghittino P. Tratado de las enfermedades de los peces. 3ra ed. Zaragoza: Ed Acribia, 1985.
 42. Negrete R P, Romero J J. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio* con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. Rev Hidrobiol 1998b; 8 : 1-10
 43. Negrete R P, Romero J J, Arredondo F J. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*). Vet Mex 2004; 35: 31-43.