



Oedogonium capillare (Linnaeus) (Kuetzing, 1845) como estrategia para purificar alimento vivo *Tubifex tubifex* (Müller, 1974) para peces

Oedogonium capillare (Linnaeus) (Kuetzing, 1845) as a strategy to purify live *Tubifex tubifex* (Müller, 1974) food for fish

Pilar Negrete Redondo*

Jorge Romero Jarero**
Enrique Guzmán López*

Sandra Cruz García*

Abstract

The sludge worm *Tubifex* sp is a good live food for aquatic species due to its high nutrimental content, short reproduction period, its broad range of habitats, and its fertility and reproductive capability in wide temperature range (0.5°C-30°C). It becomes a direct vector of bacteria such as *Salmonella*, *Shigella* and *E. coli*, also, in an obliged *Myxobolus cerebralis* host. Nevertheless, in controlled culture conditions "clean" population can be obtained. *Oedogonium capillare* alga possesses bactericide capacity against different bacterial genera. The present study has the objective to prove that *O. capillare* alga constitutes a good source to reduce the bacterial charge of the *Tubifex* worm. A 100 g of *Tubifex* were left free in five aquariums, all in similar conditions of: water temperature, aeration and water volume, four of these were experimental, one with *O. capillare* alga placed freely in the aquarium, and the other one contained within a mesh so it would not have contact with the worm; in two more aquariums, 2 g of two antibiotics for aquaculture use were mixed, one with kanamycin added, another with ampicillin, and a third with only water as control. Every seven days and during five weeks, a qualitative and quantitative analysis of the bacterial charge of each worm groups was carried out, this was identified according to the Merck Manual and the API-20E. A unilateral variance analysis was applied. It was proven that *O. capillare* significantly decreases the sludge worm's bacterial charge, by reducing the number of species from 15 to 4 and from 2×10^9 to 3×10^5 cfu/mL, in two weeks of treatment.

Key words: PURIFICATION, BACTERIAL CHARGE, *TUBIFEX*, *OEDOGONIUM CAPILLARE*, LIVE FOOD.

Resumen

El gusano de fango *Tubifex* sp es buen alimento vivo para especies acuáticas debido a su alto contenido nutrimental, corto periodo de generación, amplia gama de hábitats, fecundidad y por reproducirse en amplios intervalos de temperatura (0.5-30°C). Es vector directo de bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, y hospedero obligatorio de *Myxobolus cerebralis*. Sin embargo, en condiciones de cultivo controlado, pueden obtenerse poblaciones "limpias". El alga *Oedogonium capillare* posee capacidad bactericida contra diferentes géneros bacterianos. El presente estudio pretende probar que *O. capillare*, constituye un buen recurso para reducir la carga bacteriana del *Tubifex*. Se liberaron 100 g de *Tubifex* en cinco acuarios en iguales condiciones de aireación, temperatura y volumen de agua, en uno de ellos el alga se dejó libremente en el acuario, en el segundo, el alga fue sujeta con una red pequeña, para evitar que entrara en contacto directo con el gusano; en dos acuarios más, se mezclaron 2 g de dos antibióticos de uso en acuicultura, kanamicina y ampicilina; finalmente, se montó un último acuario, sólo con agua, el cual fue considerado como grupo testigo. Cada siete días, durante cinco semanas se llevaron a cabo los análisis cualitativo y cuantitativo de la carga bacteriana de cada grupo de gusanos, que se identificaron de acuerdo con el Manual de Merck, y el API-20E. Se aplicó análisis de varianza unilateral. Se probó que *O. capillare* reduce significativamente la carga bacteriana del gusano de fango, al disminuir el número de especies aisladas de 15 a 4 y de 2×10^9 a 3×10^5 ufc/mL, en dos semanas de tratamiento.

Palabras clave: PURIFICACIÓN, CARGA BACTERIANA, *TUBIFEX*, *OEDOGONIUM CAPILLARE*, ALIMENTO VIVO.

Recibido el 28 de septiembre de 2009 y aceptado el 26 de mayo de 2010.

*Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Canal Nacional 1100, Col. Villa Quietud, 04950, México, D. F. Tel.: (55) 54 83 71 59, Correo electrónico: jordiromeronegrete@hotmail.com

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

Introduction

Aquaculture production system success greatly depends on food availability, above all live food, essential during fish larval phase, since they feed only from very small organisms that contain the needed nutriment to reach commercial size in short time,¹ since if they are badly fed, they become more susceptible to diseases and less tolerant to environmental physiochemical variations where they grow.² Food must satisfactorily cover all metabolic needs of the body; that is, the correct food must be administered in correct amount and in the most economical way possible.³ As part of the cultured species diet, aquaculturists include live food, especially in the first development phases of the individuals, for its high nutrimental value,^{4,6} besides inert food.

Live food has qualities that inert food does not have, such as movement, which facilitates to be trapped by the predator; or color, that is attractive for its capture; and better nutritional quality, since organisms used for food by being cultivated, contain indispensable nutritional quality and quantity for the adequate growth of water species. Likewise, live food has the advantage of not affecting water quality, since it is consumed before it reaches bottom without causing any type of decomposition; unlike inert food, which will drop to bottom if it has no good floatability, where it decomposes and affects the environment, causing, sometimes, total mortality in the pond.⁷ Among these organisms the phytoplankton (microalgae), and zooplankton, such as rotifers, water fleas, copepods and amphipods; also other invertebrate species exist, such as the sludge worm (*Tubifex tubifex*), fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and earthworm.⁶

The sludge worm (*Tubifex tubifex*) is a good option, as live food, for the following reasons: *a*) generation time is shorter in comparison to other organisms (42 days); *b*) it can be produced in a wide range of habitats; *c*) has a high fertility, from 92 to 340 eggs; *d*) it reproduces in a temperature interval between 0.5-30°C.⁸ *Tubifex tubifex* (Müller) belongs to the Oligochaetae family, it is known as “tubi”, and because it gathers taste and nutritional characteristics required by aquatic animals (8.1% crude protein, 2% lipids, 1.9% free nitrogen extract, all these by weight), it has been traditionally used as food for ornamental fish, administered directly or as an ingredient of balanced feed.⁹

Tubifex is found in putrid swamp mud, where few organisms develop due to contamination; therefore, such worms turn into direct vectors of diseases that could infect culture organisms. *Tubifex* is carrier of bacteria such as *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli*,¹⁰ and obliged host of *Myxobolus cerebralis*, infectious agent of salmonids.¹¹ *Tubifex* would be an excellent alternative

Introducción

El éxito en la producción de los sistemas de cultivo acuático depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, sobre todo de alimento vivo, esencial durante la fase larvaria de los peces, ya que sólo pueden alimentarse de organismos muy pequeños que contengan los nutrimentos necesarios para alcanzar tallas comerciales en poco tiempo,¹ ya que si son mal alimentados se vuelven más susceptibles a las enfermedades y menos tolerantes a las variaciones en los factores fisicoquímicos del medio en donde se desarrollan.² El alimento debe cubrir satisfactoriamente todas las necesidades metabólicas del organismo; es decir, se debe suministrar el alimento adecuado, en la cantidad correcta y de la manera más rentable posible.³ Como parte de la dieta de las especies cultivadas, los acuicultores incluyen alimento vivo, sobre todo en las primeras fases del desarrollo de los individuos, por el alto contenido nutrimental que posee,^{4,6} además de alimento inerte.

El alimento vivo tiene cualidades que no posee un alimento inerte, como el movimiento, que facilita que sea atrapado por el predador; o el color, que es atractivo para su captura; y es de mejor calidad nutritiva, pues los organismos que se aprovechan como alimento, al ser cultivados, contienen la cantidad y calidad de nutrimentos indispensables para el adecuado crecimiento de las especies en el agua. Asimismo, el alimento vivo tiene la cualidad de no afectar la calidad del agua, debido a que es consumido antes de que llegue al fondo, sin causar tipo alguno de descomposición; a diferencia del alimento inerte, que si no tiene buena flotabilidad se irá al fondo, en donde se descompone y afecta al medio, causando, a veces, una mortalidad total en el estanque.⁷ Entre estos organismos se encuentran los fitoplanctónicos (microalgas), y los zooplanctónicos, como los rotíferos, pulgas de agua, copépodos y anfípodos; también existen algunas otras especies de invertebrados, como el gusano de fango (*Tubifex tubifex*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y la lombriz de tierra.⁶

El gusano de fango (*Tubifex tubifex*) es una buena opción, como alimento vivo, por las siguientes razones: *a*) el tiempo de generación es corto en comparación con otros organismos (42 días); *b*) se produce en una amplia gama de hábitats; *c*) tiene una alta fecundidad, de 92 a 340 huevos; y *d*) se reproduce dentro de un intervalo de temperatura entre 0.5-30°C.⁸ *Tubifex tubifex* (Müller) pertenece a la familia Oligochaetae, es conocido como “tubi”, que por reunir las características de sabor y nutrimentos que requieren los animales acuáticos (8.1% de proteína cruda, 2% de lípidos, 1.9% de extracto libre de nitrógeno, todos éstos por peso), se ha utilizado en

for feeding fish if it did not count with a bacterial flora constituted by high risk pathogens, either for cultures or for human being.¹² The aforementioned implies one of the main problems of aquaculture: the inadequate microbiologic quality of water and food, responsible for a high disease incidence, as well as lack of control and disorganization in use and selling of antibiotics and other medicines used in prevention and therapy of infectious diseases.¹³

On the other hand, clean populations can be obtained in controlled culture conditions.⁶ Worm purifying strategies, until this moment, were restricted to baths with antibiotics or drinking water, at best.¹⁴

The development of new antibiotics during the last 20 years has increased as a consequence of multiple factors, such as the need to provide more efficacious and of broader spectrum antibiotics.^{15,16} In spite of, the most frequently antibiotics used in aquaculture are tetracycline, oxolinic acid, flumequine and penicillins.¹³

Extracts obtained from different alga genera have shown potent effect against growth and survival of pathogen aquatic organisms, just like antibiotics.^{17,18} It has been experimentally proven that alga *Oedogonium capillare*, belonging to the Oedoniaceae (Chloropycophyta)¹⁹ family, inhibits *in vivo* and *in vitro* growth of important different ictiopathogenic bacteria species.

Based on the aforementioned, the present study has the objective to prove *O. capillare* alga as a strategy to reduce bacterial charge from the *T. tubifex* worm.

Material and methods

O. capillare specimens were collected in Centro de Investigaciones Biologicas y Acuaticas, in Xochimilco, when massive growth was present, they were collected with a spoon net and the most vigorous specimens were selected. Before sampling began, leaves and organic detritus were removed. Algae were identified in the Laboratorio de Ficologia of the Universidad Autonoma Metropolitana, Campus Xochimilco, based on Gauthier-Lievre descriptions.¹⁹

The aquariums were set up in the following way: aquariums with 40 L capacity were used, all were filled with 2 L of residual chlorine free water; in one of these, the alga was left free in the aquarium; on the second, the alga was sustained by a small net, to avoid being in direct contact with the worm; in two more aquariums, 2 g of two antibiotics used in aquaculture, kanamycin and ampicillin, were mixed; finally, a last aquarium was set, only with water, with the same volume and quality as the previous, considered as control group.

Six hundred g of live food for fish were obtained (*Tubifex tubifex*) at the Mixhuca fish market, in Mexico

forma tradicional como alimento para peces de ornato, ya sea suministrado directamente o como ingrediente de los alimentos balanceados.⁹

Tubifex se encuentra en lodos cenagosos de aguas putrefactas, donde pocos organismos se desarrollan debido a la contaminación, por lo que dichos gusanos se convierten en vectores directos de enfermedades que podrían infectar a los organismos en cultivo. El gusano *Tubifex* es portador de bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*,¹⁰ y hospedero obligado de *Myxobolus cerebralis*, agente infeccioso de salmónidos.¹¹ *Tubifex* se constituiría en excelente alternativa de alimentación para peces si no contara con la flora bacteriana formada por patógenos de alto riesgo, tanto para los cultivos como para el ser humano.¹² Lo anterior implica uno de los principales problemas de la acuicultura: el inadecuado control de la calidad microbiológica del agua y de los alimentos, responsables de alta incidencia de enfermedades, así como la falta de control y desorganización en la venta y uso de los antibióticos y otros fármacos empleados en la prevención y terapia de las enfermedades infecciosas.¹³

En cambio, en condiciones de cultivo controlado se pueden obtener poblaciones limpias.⁶ Las estrategias de purificación del gusano, hasta el momento, estaban restringidas a baños con antibióticos o de agua potable, en el mejor de los casos.¹⁴

El desarrollo de nuevos antibióticos durante los últimos 20 años se ha incrementado como consecuencia de múltiples factores, como la necesidad de disponer de antibacterianos más eficaces y de más amplio espectro.^{15,16} Pese a ello, los antibióticos más frecuentemente utilizados en la acuicultura son la tetraciclina, el ácido oxolínico, la flumequina y las penicilinas.¹³

Los extractos obtenidos de diferentes géneros de algas han mostrado potente efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia, también propiedades antimicrobianas contra patógenos de organismos acuáticos.^{17,18} Se ha comprobado experimentalmente *in vivo* e *in vitro* que el alga *Oedogonium capillare*, perteneciente a la familia Oedoniaceae (Chloropycophyta),¹⁹ inhibe el crecimiento de diferentes especies de bacterias de importancia ictiopatógena.

Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo probar el alga *O. capillare* como estrategia para reducir la carga bacteriana del gusano *T. tubifex*.

Material y métodos

Los especímenes de *O. capillare* fueron recolectados de estanques en el Centro de Investigaciones Biológicas

City, and were transported to the laboratory to be processed. Initial bacterial charge was qualitative and quantitatively determined from the sample of *T. tubifex*, which was considered as initial bacterial charge. The 600 g of this sample were distributed between five aquariums, placing 100 g of *Tubifex* in each one. It was left for eight days and a bacteriological analysis was carried out over again, as follows.

Ten grams of *Tubifex* were extracted from each of the five aquariums with a sterile net, they were weighed and homogenized,* during three minutes, with 90 mL of sterile distilled water. One thousand μL were extracted with an automatic pipette and 1/100 dilutions from 10^{-1} to 10^{-7} were done; in the same way, from each dilution flask 100 μL were extracted with an automatic pipette and seeded in agar plates of eosin methylene blue (EMB) specific mediums, *Salmonella-Shiguelia* (S-S), thiosulfate-citrate bile salts (TCBS), and agar brain-heart (ABH). The inoculate was smeared in each one of the plates of culture medium with a glass rod, all boxes were incubated for 24 h at 35.5°C. After that time, a colony forming unit (cfu/mL) count was performed, with a colony counter.** The qualitative analysis of the bacterial charge from the samples was done extracting, with an automatic pipette, 1 000 μL from the original homogenized mix flask and was transferred to tubes with lactose broth, peptone water and tetrathionate broth; in this last, 1 000 μL of iodine-iodide (IKI) were added, all was incubated for 24 h at 35.5°C. Afterwards, the colonies that grew were re-seeded in agar plates of EMB, TCBS and S-S, respectively and incubated over again under the same conditions.²⁰ Later, the colonies were re-seeded successively in agar plates of the same selective mediums, until obtaining pure strains; the last until obtaining homogenous growth of the colonies or box morphology, confirmed by observing cellular homogeneity through phase contrast microscope. Afterwards, Gram staining was performed.²⁰ Later on, the G(-) strains were identified following the Merck Manual criteria;²¹ finally, the strain identification was confirmed with biochemical tests of the API-20E commercial system.²²

This same procedure was carried out each week with the five groups. Once the species that formed the bacterial charge of the *Tubifex* were identified and quantified, the aquarium changes of each trial were done weekly, for five weeks. The isolated species identification procedure was carried out with collection strains: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Aeromonas caviae* (ATCC154), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178), *Escherichia coli* (ATCC11775) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13833).

In the different groups, experimental as well as control, unilateral analyses of variance of Levin and Levin²³ were applied.

y Acuáticas, en Xochimilco, cuando presentaron crecimiento masivo, se recolectaron con red de cuchara y se seleccionaron los ejemplares más vigorosos. Antes de efectuarse el muestreo se removieron las hojas y desechos orgánicos. Las algas fueron identificadas en el Laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco, basándose en las descripciones de Gauthier-Lievre.¹⁹

Los acuarios se montaron de la siguiente forma: se utilizaron acuarios con capacidad de 40 L, todos se llenaron con 2 L de agua libre de cloro residual; en uno de ellos, el alga se dejó libremente en el acuario; en el segundo, el alga fue sujeta con una red pequeña, para evitar que entrara en contacto directo con el gusano; en dos acuarios más, se mezclaron 2 g de dos antibióticos de uso en acuicultura, kanamicina y ampicilina; finalmente, se montó un último acuario, únicamente con agua, con el mismo volumen y calidad que los anteriores, que fue considerado como grupo testigo.

Se adquirieron 600 g de alimento vivo para peces (*Tubifex tubifex*) en el mercado de peces Mixhuca, en la Ciudad de México, y se trasladaron al laboratorio para ser procesados. Se determinó cuantitativa y cualitativamente la carga bacteriana inicial de la muestra de *T. tubifex*, la cual se consideró como carga bacteriana inicial. Los 600 g de esta muestra se distribuyeron entre los cinco acuarios, colocando 100 g de *Tubifex* en cada uno, se dejó durante ocho días, al cabo de los cuales se efectuó nuevamente el análisis bacteriológico de la siguiente forma.

Con una red estéril se extrajeron diez gramos de *Tubifex* de cada uno de los cinco acuarios, se pesaron y homogeneizaron,* durante tres minutos, con 90 mL de agua destilada estéril. Con una pipeta automática se extrajeron 1000 μL y se efectuaron diluciones a la centésima desde 10^{-1} y hasta 10^{-7} ; de cada frasco de dilución se extrajeron, igualmente, con una pipeta automática 100 μL y se sembraron en placas con agar de medios específicos de eosina azul de metileno (EMB), *Salmonella-Shiguelia* (S-S), tiosulfato-citrato de sales de bismuto (TCBS), y cerebro-corazón (ABH). El inóculo se esparció en cada una de las placas de los medios de cultivo con una varilla de vidrio acodada, todas las cajas se incubaron durante 24 h a 35.5°C. Después de ese tiempo, se efectuó el conteo de unidades formadoras de colonias (ufc/mL), con un cuentacolonias.** El análisis cualitativo de la carga bacteriana de las muestras se efectuó extrayendo, con una pipeta automática, 1 000 μL de la mezcla del frasco con el homogeneizado original, y se transfirió a tubos con caldo lactosado, agua peptonada y caldo tetratiónato, en este último se agregaron 1 000 μL

*Homogeneizador marca Virtix, Estados Unidos de América.

** Tipo Quebec, marca Fisher, Estados Unidos de América.

Results

On the bacterial charge lodged in the *Tubifex* worm, previously identified, in control group as well as in the replicate, 15 different species were recorded: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* I (ATCC11775), *Escherichia coli* II (ATCC23716), *Escherichia coli* III (ATCC194), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia plymuthica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, and *Aeromonas hydrophila*. The total bacteria average count of this lot was of 2×10^9 cfu/mL. The species *S. plymuthica* and *Pseudomonas putida* were isolated and identified in the last two weeks of the trial.

Twenty seven per cent of the originally identified species decreased from the initial bacterial charge of the worm after its first week of water baths, surviving eight out of 11 species to treatment. The presence of *Klebsiella* spp, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, nor *Vibrio* genera: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* and *Aeromonas hydrophila* were not recorded. The average amount of quantified bacteria decreased to 1×10^6 cfu/mL after the second week with the same treatment, the bacterial diversity slowly decreased and by the end of the fifth week only five species were recorded: *E. cloacae*, *E. coli* I, II, III and *Klebsiella pneumoniae*; quantitatively, the bacterial charge finally lowered to 2×10^5 cfu/mL.

In the *Tubifex* group treated with kanamycin, the bacterial charge as to the diverse species identified at the first week of treatment also showed a 27% decrease, with only four species, 2×10^6 cfu/mL of average bacteria. From the second week of treatment with the same antibiotic, a considerable decrease in species diversity (seven species) was recorded, 54% less of the original bacterial charge; and in average quantity of 4×10^6 cfu/mL. From the third week, and after a slight decrease, qualitative as well as quantitative, the bacterial charge was kept constant until the end of the treatment, when only six species were recorded, *E. coli* I, II, III, *S. typhimurium* and *S. flexneri*; and a quantification of 1×10^5 cfu/mL of average bacteria.

In the group treated with ampicillin, at the first week of treatment, the diversity of species only decreased 20% (three species), and twelve of the species identified at the beginning remained. A decrease of 1×10^6 cfu/mL of average bacteria was quantitatively recorded. During the second and third week of treatment, a 46% decrease in the seven species was recorded. The average quantity of these was quantified in 2×10^6 cfu/mL. From the third week on, another important decrease was recorded, qualitatively, only four species were recorded, *E. coli* I, II, III and *K. pneumoniae*, 26% of the recorded species at the beginning; and quantitatively, 1×10^6 cfu/mL. On the fifth week an increase of four

de yodo-yoduro (IKI), todo se incubó durante 24 h a 35.5°C. Después, las colonias que crecieron se sembraron en placas con agar de EMB, TCBS y S-S, respectivamente y se incubaron de nuevo bajo las mismas condiciones.²⁰ De manera ulterior, las colonias se sembraron en forma sucesiva en placas con agar de los mismos medios selectivos, hasta obtener cepas puras; lo anterior hasta obtener crecimiento homogéneo de las colonias o morfología de caja, que se confirmó mediante observación al microscopio de contraste de fase, por homogeneidad celular. Después se efectuó tinción de Gram.²⁰ Posteriormente, las cepas G(-) se identificaron siguiendo los criterios del Manual de Merck,²¹ finalmente, se confirmó la identificación de las cepas con las pruebas bioquímicas del sistema comercial API-20E.²²

Este mismo procedimiento se efectuó cada semana con los cinco grupos. Los cambios de acuarios de cada experimento se hicieron semanalmente, durante un periodo de cinco semanas, una vez identificadas y cuantificadas las especies que conformaron la carga bacteriana del *Tubifex*. El procedimiento de identificación de las especies aisladas se llevó a cabo con cepas de colección: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Aeromonas caviae* (ATCC154), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178), *Escherichia coli* (ATCC11775) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13833).

En los diferentes grupos, tanto experimentales como testigo, se aplicaron los análisis de varianza unilateral de Levin y Levin.²³

Resultados

En la carga bacteriana alojada en el gusano *Tubifex*, que se identificó inicialmente, tanto en el grupo testigo como en la réplica, se registraron 15 diferentes especies: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* I (ATCC11775), *Escherichia coli* II (ATCC23716), *Escherichia coli* III (ATCC194), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia plymuthica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis*, y *Aeromonas hydrophila*. El conteo promedio de bacterias totales de este lote fue de 2×10^9 ufc/mL. Las especies *S. plymuthica* y *Pseudomonas putida* se aislaron e identificaron en las dos últimas semanas del experimento.

Al ser sometido el gusano únicamente a baños de agua, después de la primera semana, en la carga bacteriana original que portaba, disminuyeron 27% de las especies identificadas originalmente, sobrevivieron al tratamiento ocho de las 11 especies. No se registró ya la presencia de *Klebsiella* spp, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, ni los géneros de *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*,

species was recorded, two of them not identified at the beginning: *S. plymuthica* and *P. putida*, but the total average bacteria decreased to 2×10^5 cfu/mL.

The experimental lot treated with *O. capillare*, placed as a whole into the aquarium and separated from the worm with the help of a net, by the end of the first week decreased to ten species (66%), of all initial bacterial charge identified and with an average of 5×10^5 cfu/mL. Afterwards, on the second week of treatment, the bacterial diversity decreased again to four species, 26% of the initially present species, with an average bacteria quantity of 2×10^5 cfu/mL, condition that was kept in this way until the third week and that in the fourth week recorded an increase of two species, not identified initially: *P. putida*, *S. plymuthica*, the count to 7×10^5 also increased; nevertheless, it decreased again by the fifth week of treatment to four species, with 3×10^5 cfu/mL. The species *E. coli* I, II, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium* sustained their presence.

When direct contact of the alga was allowed with the worm, as substrate of this, it was recorded that during the first week the number of species that constituted the original bacterial charge decreased to nine; that is, 60% of the initial diversity, and in a quantity of 2×10^6 cfu/mL; during the second week it decreased to four species (26%), and in average quantities of 1×10^5 cfu/mL. Finally, during the fifth week, diversity increased in one species, *S. plymuthica*, which was not isolated in the control record, with final average bacteria counts of 3×10^5 cfu/mL.

The different present species of the genus *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*, as well as the *Aeromonas hydrophila* species that were isolated and identified in the bacterial charge of the control groups of each treatment, were isolated and identified for the second and last time until the first week of all treatments.

S. plymuthica and *P. putida* were not isolated and identified at the initial bacterial charge of any group; however, its presence was recorded until the fourth week in treatments with water, ampicillin and in the two varieties of treatment with *O. capillare*, and until the fifth week in the experimental lot with kanamycin.

The obtained calculi by performing the unilateral analysis of variance to the samples taken from the five experimental groups: water, kanamycin, ampicillin, *Oedogonium* and free *Oedogonium*, recorded in a significant rate that for $g_{I_b(\text{between})} = 5$ and $g_{I_i(\text{inside})} = 25$, and for confidence level $P_{.05}$ it must be at least 2.6 and for confidence level $P_{.01}$ it must be equal or higher than 3.9; therefore, the calculated and obtained F rate for all the possible combinations between data of the five sampled groups, the alternative was to reject H_0 : ($\mu_{\text{water}} = \mu_{\text{kanamycin}} = \mu_{\text{ampicillin}} = \mu_{\text{oedogonium 1}} = \mu_{\text{oedogonium 2}}$) and attribute the obtained difference between the mean

V. alginolyticus, *V. fluvialis* y *Aeromonas hydrophila*. La cantidad promedio de bacterias cuantificadas, disminuyó a 1×10^6 ufc/mL, después de la segunda semana con el mismo tratamiento, la diversidad bacteriana disminuyó lentamente, y a finales de la quinta semana sólo se registraron cinco especies: *E. cloacae*, *E. coli* I, II, III y *Klebsiella pneumoniae*; cuantitativamente, la carga bacteriana bajó finalmente a 2×10^5 ufc/mL.

En el grupo de *Tubifex* tratado con kanamicina, la carga bacteriana en cuanto a diversidad de especies identificadas a la primera semana del tratamiento, también registró disminución del 27%, con sólo cuatro especies, 2×10^6 ufc/mL de bacterias promedio. A partir de la segunda semana de tratamiento con el mismo antibiótico, se registró una disminución considerable en la diversidad de especies (siete especies), 54% menos de la carga bacteriana original; y en cantidad promedio de 4×10^6 ufc/mL. A partir de la tercera semana, y después de una ligera disminución, tanto cualitativa como cuantitativa, la carga bacteriana se mantuvo constante hasta el final del tratamiento, cuando únicamente se registraron seis especies, *E. coli* I, II, III, *S. typhimurium* y *S. flexneri*; y una cuantificación de 1×10^5 ufc/mL de bacterias promedio.

En el grupo tratado con ampicilina, a la primera semana de tratamiento, la diversidad de especies sólo disminuyó 20% (tres especies), y permanecieron doce de las especies identificadas al inicio. Cuantitativamente se registró disminución a 1×10^6 ufc/mL de bacterias promedio. Durante la segunda y tercera semanas de tratamiento, se registró una disminución de 46% en las siete especies. La cantidad promedio de éstas se cuantificó en 2×10^6 ufc/mL. A partir de la tercera semana se registró otra importante disminución, cualitativamente, sólo se registraron cuatro especies, *E. coli* I, II, III y *K. pneumoniae*, 26% de las especies registradas al inicio; y cuantitativamente, 1×10^6 ufc/mL. En la quinta semana se registró incremento de cuatro especies, dos de ellas no identificadas inicialmente: *S. plymuthica* y *P. putida*, pero el promedio total de bacterias disminuyó a 2×10^5 ufc/mL.

El lote experimental tratado con el alga *O. capillare*, colocada completa dentro del acuario y separada del gusano con ayuda de una red, al final de la primera semana disminuyó a diez especies (66%); de toda la carga bacteriana identificada de inicio y con 5×10^5 ufc/mL promedio. Después, en la segunda semana de tratamiento, se redujo de nuevo la diversidad bacteriana a cuatro especies, 26% de las especies presentes inicialmente, con una cantidad bacteriana promedio de 2×10^5 ufc/mL, condición que se mantuvo de esta forma hasta la tercera semana y que en la cuarta semana registró incremento de dos especies, que no se identificaron inicialmente: *P. putida*, *S. plymuthica*,

samples, on the difference of species number and quantity of cfu/mL, to the treatments, more than to possible experimental errors.

Likewise, when applying the unilateral analysis of variance for each one of the different species isolated and identified between and inside each treatment applied: water, kanamycin, ampicillin, *Oedogonium* and free *Oedogonium*, in a significant ratio that for $g_{I_b(\text{between})} = 5$ and $g_{I_i(\text{inside})} = 25$, and for confidence level of $P_{.05}$ it must be, at least, 2.6 and for confidence level $P_{.01}$ it must be equal or higher than 3.9; therefore, calculated and obtained F rate for possible combinations between the five group data, consisted in rejecting H n: ($\mu_{\text{water}} = \mu_{\text{kanamycin}} = \mu_{\text{ampicillin}} = \mu_{\text{oedogonium 1}} = \mu_{\text{oedogonium 2}}$) for species *E.coli* I,II, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* spp, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. flexneri*, and accepted by *E. cloacae* and *E.coli* III, and attribute the differences between and inside of the mean samples, by the difference of isolate and identified species number of each one of them to the administered treatment, more than to possible experimental errors. However, when carrying out the same analysis to the same samples in equal conditions than in the latter analysis for possible combinations between cfu/mL data recorded in the five sampled groups, calculated and obtained F rate accepts H n: ($\mu_{\text{water}} = \mu_{\text{kanamycin}} = \mu_{\text{ampicillin}} = \mu_{\text{oedogonium 1}} = \mu_{\text{oedogonium 2}}$) for all and each one of the species, and attribute the difference between and inside the mean samples on the difference of the quantified number of cfu/mL of each isolated and identified species, to the effect on the administered treatments, more than to possible experimental errors.

Discussion

It was proven that *O. capillare* significantly decreases bacterial charge of the sludge worm, decreasing the number of isolated species from 15 to 4 and from 2×10^9 to 3×10^5 cfu/mL, at two weeks of treatment.

The initially isolated and identified bacterial charge of the sludge worm *Tubifex*, was constituted by bacteria of three main bacterial families: Enterobacteriaceae, Vibrionaceae and Aeromonadaceae. The identification of different species coincided with other authors that have recorded the presence of enterobacteria, such as: *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, and *S. flexneri* and *P. vulgaris*, species known to be pathogens for human beings, recent experimental studies on the infectious capacity of *E. coli* and *S. Arizona*, have proven to be bacteria that under low environmental stress conditions can behave as opportunistic pathogens of culture aquatic species, such as the angelfish.²⁴ Species of the *Vibrio* and *Aeromonas* genera behave either as human or aquatic organism pathogens, and cause great losses in

también se incrementó el conteo a 7×10^5 ufc/mL; sin embargo, disminuyó otra vez durante la quinta semana de tratamiento a cuatro especies, con 3×10^5 ufc/mL. Manteniendo su presencia las especies *E. coli* I, II, *K. pneumoniae* y *S. typhimurium*.

Cuando se permitió el contacto directo del alga con el gusano, a manera de sustrato de éste, se registró que en la primera semana el número de especies que conformó la carga bacteriana original disminuyó a nueve; esto es, 60% de la diversidad inicial, y en cantidad de 2×10^6 ufc/mL; en la segunda semana disminuyó a cuatro especies (26%), y a cantidades promedio de 1×10^5 ufc/mL. Finalmente, en la quinta semana se incrementó la diversidad en una especie, *S. plymuthica*, que no fue aislada en el registro testigo, con conteos de bacterias promedio finales de 3×10^5 ufc/mL.

Las diferentes especies presentes del género *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, así como la especie *Aeromonas hydrophila* que se aislaron e identificaron en la carga bacteriana de los grupos testigo de cada tratamiento, se volvieron a aislar e identificar por segunda y última ocasión hasta la primera semana de todos los tratamientos.

Las especies *S. plymuthica* y *P. putida* no fueron aisladas e identificadas dentro de la carga bacteriana inicial en ningún grupo; sin embargo, se registró su presencia hasta la cuarta semana en los tratamientos con agua, ampicilina y en las dos variedades de tratamiento con *O. capillare*, y hasta la quinta semana en el lote experimental con kanamicina.

Los cálculos obtenidos al aplicar el análisis de varianza unilateral a las muestras tomadas de los cinco grupos experimentales: agua, kanamicina, ampicilina, *Oedogonium* y *Oedogonium* libre, registraron en una razón significativa que para $g_{I_e(\text{entre})} = 5$ y $g_{I_d(\text{dentro})} = 25$, para nivel de confianza de $P_{.05}$ debe ser de por lo menos 2.6 y para nivel de confianza $P_{.01}$ debe ser igual o mayor que 3.9, por lo que la razón F calculada y obtenida para todas las posibles combinaciones entre los datos de los cinco grupos muestreados la alternativa fue rechazar la H n: ($\mu_{\text{agua}} = \mu_{\text{kanamicina}} = \mu_{\text{ampicilina}} = \mu_{\text{oedogonium 1}} = \mu_{\text{oedogonium 2}}$) y atribuir la diferencia obtenida entre las medias muestrales, sobre la diferencia del número de especies y cantidad de ufc/mL a los tratamientos, más que posibles errores experimentales.

De la misma forma, al aplicar el análisis de varianza unilateral para cada una de las diferentes especies aisladas e identificadas entre y dentro de cada uno de los tratamientos aplicados: agua, kanamicina, ampicilina, *Oedogonium* y *Oedogonium* libre, en una razón significativa que para $g_{I_e(\text{entre})} = 5$ y $g_{I_d(\text{dentro})} = 25$, y para nivel de confianza de $P_{.05}$ debe ser de, por lo menos, 2.6 y para nivel de confianza $P_{.01}$ debe ser igual o mayor a 3.9, por lo que la razón F calculada

the production of culture species.

In regard to species considered as organism aquatic pathogens, such as: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* and *A. hydrophila* that were isolated as part of the bacterial charge that initially carried the analyzed *Tubifex* sample, were no longer isolated in none of the treatments, probably due to the fact that as these are species of marine origin, they need high saline concentration environments, or were sensitive to the administered antibiotics. This result coincides with the trials carried out by Lopez *et al.*,¹⁸ when comparing the effect of *O. capillare* on bacteria of *Vibrio* genus.

The increase of not initially identified new genera as *S. plymuthica* and *P. putida*, until the fourth and fifth weeks of treatment, is probably due to the fact that growth of the latter was inhibited by the presence of dominant bacteria, such as enterobacteria that when decreasing by effect of the different treatments, allowed their growth and development.

Although water bath treatments result efficacious, it is considered that from the ecological and economic point of view, its use in massive production would result expensive, since great volumes of water are required.

Treating live food with antibiotics (kanamycin and ampicillin) showed an important decrease in the number of bacterial charge species; nevertheless, it should be considered, on one side, the high cost that implies the supply of these chemicals, and, on the other hand, not less important, it would imply environmental pollution because of the way it is administered directly into the water of the containers with the treatment lots that would eventually be discharged into the waste water flows; finally, the bacterial resistance caused by the use of antibiotics that would be incorporated to the environment at the moment of disposing the treatment containers' water.

The two ways of treatment based on *O. capillare* alga resulted efficacious when decreasing the bacterial charge of the worm up to 74%. The way of using the alga, allowing contact with the worm, resulted more efficacious because it achieved the maximum bacteria decrease in less time, probably because the worm feeds on it.

Even though the proposed treatment resulted efficacious, the fact that the alga *O. capillare* behaves as an antibiotic poses the doubt of its capacity to provoke that the bacteria that survive to treatment generate resistance to R plasmids, as antibiotics of common use. Based on the aforementioned, before implementing the treatment, studies must be done on alga behavior as antibiotic: dosage, route and time of administration.

y obtenida para las posibles combinaciones entre los datos de los cinco grupos, consistió en rechazar la H n: ($\mu_{\text{agua}} = \mu_{\text{kanamicina}} = \mu_{\text{ampicilina}} = \mu_{\text{oedogonium 1}} = \mu_{\text{oedogonium 2}}$) para las especies, *E. coli* I, II, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* spp, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. flexneri*, y aceptarla para las especies *E. cloacae* y *E. coli* III, y atribuir las diferencias entre y dentro de las medias muestrales, por la diferencia del número de especies aisladas e identificadas de cada una de ellas al efecto de los tratamientos aplicados, más que a posibles errores experimentales. Sin embargo, al aplicar el mismo análisis para las mismas muestras en iguales condiciones que en el análisis anterior para las posibles combinaciones entre los datos de las ufc/mL registradas en los cinco grupos muestreados, la razón F calculada y obtenida acepta la H n: ($\mu_{\text{agua}} = \mu_{\text{kanamicina}} = \mu_{\text{ampicilina}} = \mu_{\text{oedogonium}} / \mu_{\text{oedogonium 2}}$) para todas y cada una de las especies, y atribuye la diferencia entre y dentro de las medias muestrales sobre la diferencia del número ufc/mL cuantificada de cada especie aislada e identificada, al efecto de los tratamientos aplicados, más que a posibles errores experimentales.

Discusión

Se probó que *O. capillare* reduce significativamente la carga bacteriana del gusano de fango, al disminuir el número de especies aisladas de 15 a 4 y de 2×10^9 a 3×10^5 ufc/mL, a las dos semanas de tratamiento.

La carga bacteriana inicialmente aislada e identificada del gusano de fango *Tubifex*, se conformó de bacterias de tres importantes familias bacterianas: Enterobacteriaceae, Vibrionaceae y Aeromonadaceae. La identificación de las diferentes especies coincidió con diferentes autores que han registrado la presencia de enterobacterias como *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* sp, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. flexneri* y *P. vulgaris*, especies que si bien son reconocidas como patógenas para el humano, recientes estudios experimentales sobre la capacidad infecciosa de *E. coli* y *S. arizona*, han comprobado ser bacterias que bajo condiciones de estrés ambiental pueden comportarse como patógenos oportunistas de especies acuáticas en cultivo como el pez ángel.²⁴ Las especies de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* se comportan tanto como patógenas de humano como de organismos acuáticos, y provocan graves pérdidas en la producción de especies en cultivo.

En cuanto a las especies consideradas patógenas de organismos acuáticos, como *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *A. hydrophila*, que se aislaron como parte de la carga bacteriana que portaba originalmente la muestra de *Tubifex* analizada, no se volvieron a aislar, en ninguno de los tratamientos, debido probablemente a que estas especies al ser

Referencias

1. LIM LC. Recent development in the application of live feeds in the Freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture* 2003; 2: 246-251.
2. LIÑAN CM. Caracterización de los cuadros ambientales durante la reproducción inducida y obtención de postlarvas de *P. vannamei*, bajo diferentes regímenes alimenticios. Universidad de Colima: Facultad de Ciencias Marinas, 2003.
3. STEFFENS W. Principios fundamentales de la alimentación de los peces. Barcelona: Ed. Acribia, 1987.
4. ESPINOSA MJ, LABARTA U. Nutrición en acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. Programa Especial de Acuicultura. Argentina: Plan de Formación de Técnicos Superiores, 1987.
5. LIÑAN CMA. Caracterización de los cuadros ambientales durante la reproducción inducida y obtención de postlarvas de *P. vannamei*, bajo diferentes regímenes alimenticios. Colima (Colima) México. Universidad de Colima. Facultad de Ciencias Marinas, 1995.
6. MUÑOZ E. Alimento vivo para peces. Bogotá Colombia: Universidad Militar de Nueva Granada: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 2006; 2: 43-63.
7. CASTRO BT, LARA R, CASTRO G, CASTRO J, MALPICA A. Alimento vivo en la acuicultura. *Contactos* 2003; 48: 27-33.
8. MARIAN J, PANDIAN T. Culture and harvesting techniques for *Tubifex tubifex*. *Aquaculture* 1984; 42: 303-315.
9. PÉREZ GRM. Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Rev Mex Cien Farmacéuticas*, 2005; 36: 5-10.
10. NEGRETE RP, MONROY DC, ROMERO JJ. Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Vet Méx* 2008; 39: 255-268.
11. KERANS BL, STEVENS RI, LEMMON JC. Water temperature affects a host-parasite interaction: *Tubifex tubifex* and *Myxibolus cerebialis*. *J Aquat Anim Health* 2005; 17:216-221.
12. MONROY DC, NEGRETE RP, ROMERO JR, TORRES LP. Evaluación de *Escherichia coli* y *Salmonella arizona* como patógenos oportunistas en el cultivo de pez ángel (*Pterophyllum scalare*). *Rev Soc Mex Hist Nat* 2007;1: 35-44.
13. CABELLO FG. Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev Méd Chile* 2004; 132:1001-1006.
14. WOLFF M. Uso y abuso de antibióticos. Momento de su evaluación más allá del ser humano. *Rev Méd Chile*, 2004; 132: 909-911.
15. JUAN MFJ. Uso actual de las penicilinas clásicas. *Rev Med Clín* 2000; 2: 78-121.
16. ALÓS I, CARNICERO M. Consumo de antibióticos y resistencia bacteriana a los antibióticos: "algo que te concierne". *Med Clín* 1997; 109: 264-270.
17. IMMANUEL G, VINCYBAI VC, SIVARAM V, PALAVESAM A, MARIAN MP. Effect of butanolic

de origen marino requieren ambientes de alta concentración salina, o bien a que fueron sensibles a los antibióticos empleados, este resultado coincide con los experimentos efectuados por López *et al.*,¹⁸ al comprobar el efecto de *O. capillare* sobre bacterias del género *Vibrio*.

El incremento de nuevos géneros no identificados inicialmente, como *S. plymuthica* y *P. putida*, hasta la cuarta y quinta semanas de tratamiento, probablemente se deba a que el crecimiento de estas últimas se encontraba inhibido por la presencia de bacterias dominantes, como las enterobacterias, que al disminuir por efecto de los diferentes tratamientos, permitió su crecimiento y desarrollo.

Si bien el tratamiento con baños de agua resulta efectivo, se considera que desde el punto de vista ecológico y económico, su uso en una producción masiva resultaría costoso, ya que se requiere de grandes volúmenes de agua.

El tratar el alimento vivo con antibióticos (kanamicina y ampicilina), presentó una reducción importante en el número de especies de la carga bacteriana; sin embargo, habría que considerar, por un lado, el alto costo que implica el suministro de estos químicos, y, por otro, no menos importante, el que implicaría contaminación ambiental debido a la forma de administración directa al agua de los contenedores de los lotes en tratamiento, que finalmente será desechada a los flujos de agua de desecho; por último, la resistencia bacteriana que genera el uso de antibióticos, que serían incorporados al ambiente al momento de desecharse el agua de los contenedores propios a los de tratamientos.

Las dos formas de tratamiento a base del alga *O. capillare* resultaron efectivas, al reducir la carga bacteriana del gusano hasta en 74%. La forma de usar el alga permitiendo que ésta entre en contacto con el gusano resultó más efectiva porque logró la máxima reducción de bacterias en menor tiempo, probablemente debido a que el gusano se alimenta de ella.

A pesar de que el tratamiento propuesto resultó efectivo, el hecho de que el alga *O. capillare* se comporte como antibiótico plantea la duda de su capacidad para provocar que las bacterias que sobreviven al tratamiento generen resistencia a plásmidos-R, al igual que los antibióticos de uso común. Con base en lo anterior, antes de instrumentar el tratamiento se deben de efectuar estudios sobre el comportamiento del alga como antibiótico: dosificación, forma y tiempo de administración.

extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 2004; 236: 553-556.

18. LÓPEZ SR, NEGRETE RP, ROMERO JJ. Comprobación *in vivo* de la capacidad antibacterial de *Oedogonium capillare* contra *Vibrio fluvialis* en pez dorado *Carassius auratus*. 2006; 36:209-221.
19. GAUTHIER-LIEVRE L. *Oedogoniacees africaines*. 2nd ed. Berlin, Germany: J. Cramer, 1963.
20. APHA. Standard methods for examination of water and waste water. 17th ed. Washington DC: American Public Health Association, 1992.
21. MERCK. Manual de medios de cultivo Darmstadt. Alemania: Ed. Merck, 1994.
22. ANALYTICAL PROFILE INDEX. API20E Enterobacteriaceae and other Gram Negative Bacteria. 4th ed. France, Paris: BioMerioux, 1997.
23. LEVIN J, LEVIN WC. Fundamentos de estadística en la investigación social. México D F: Oxford University Press, 1999.
24. NEGRETE RP, ROMERO JJ, ARREDONDO FJL, LÓPEZ SR, FIGUEROA G. Comprobación *in vivo* de la capacidad antibacterial de *Oedogonium capillare* contra *Vibrio fluvialis* en pez dorado *Carassius auratus*. Vet Méx 2005; 37:209-222.