

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



AISLAMIENTO DE *Lactobacillus* sp. DE “TRUCHA ARCO IRIS” *Oncorhynchus mykiss* CON POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE A *Yersinia ruckeri* EN PUNO.

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. WILSON REINALDO QUISPE GALLEGOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



AISLAMIENTO DE *Lactobacillus sp.* DE "TRUCHA ARCO IRIS" *Oncorhynchus mykiss* CON POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE A *Yersinia ruckeri* EN PUNO

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. WILSON REINALDO QUISPE GALLEGOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 15 DE SEPTIEMBRE DEL 2017

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE


: _____
Dr. BUENAVENTURA OPTACIANO CARPIO VASQUEZ

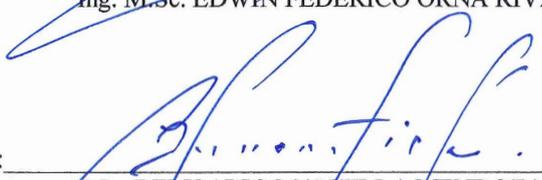
PRIMER MIEMBRO


: _____
Ing. M.Sc. JOSÉ DAVID VELEZVIA DIAZ

SEGUNDO MIEMBRO


: _____
Ing. M.Sc. EDWIN FEDERICO ORNA RIVAS

DIRECTOR / ASESOR


: _____
M.Sc. BELISARIO MANTILLA MENDOZA

ÁREA : CIENCIAS BIOMÉDICAS.
LÍNEA : ACUICULTURA.
TEMA : SANIDAD PESQUERA.

DEDICATORIA

A Nuestro Señor.

Por haberme dado la vida, salud, inteligencia y fortaleza en los momentos en que lo necesite; para seguir siempre adelante.

A mis padres

Don Víctor Quispe Bailón y

Doña Agustina Gallegos Vargas

A mis queridos hermanos

Gloxinia, Alidia e Iván

Por el apoyo, que solo cada quien sabe, en lo poco o mucho que me brindaron su ayuda cuando los necesite.

Con mucho cariño, les dedico este mi esfuerzo en reconocimiento a todo el sacrificio que hicieron por mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional del Altiplano, y a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas, por sus conocimientos, enseñanzas y consejos transmitido durante mi formación universitaria.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a mi director y asesores

M.Sc. Belisario Mantilla Mendoza

Dr. Mg. M. V. Alberto Ccama Sullca

Mg. M. V. Yessica Lisette Ortega Asencios

Mg. M. V. Nieves Sandoval Chaupe

Por la dirección, asesoría, amistad y apoyo durante el desarrollo de la Tesis.

A los miembros del Jurado Calificador

Por sus sugerencias y revisión del proyecto, borrador e Informe Final de Tesis.

A mis padrinos y familiares por su apoyo y buenos deseos hacia mi persona.

A mis amistades de toda la vida quienes de alguna u otra forma me apoyaron de forma incondicional y desinteresada. Por los buenos momentos compartidos, que hoy son bellos recuerdos. Y finalmente de manera muy especial a quien me alentó y apoyo para cerrar este círculo.

Es por ello mi eterna gratitud.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Hipótesis específicas	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. Trucha arco iris	15
2.1.1. Clasificación Taxonómica	15
2.1.2. Producción	16
2.1.2.1. Mundial	16
2.1.2.2. Nacional	16
2.2. <i>Yersinia ruckeri</i>	16
2.2.1. Etiología	16
2.2.2. Epidemiología	17
2.2.2.1. Especies susceptibles	17
2.2.2.2. Transmisión	17
2.2.2.3. Patogenia y Lesiones	18
2.2.3. Prevención y control	18
2.2.3.1. Uso de antibióticos	18
2.2.3.2. Uso de vacunas	18
2.3. Microbiota del tracto gastrointestinal de los peces	19

2.4. Probióticos.....	20
2.4.1. Definición.....	20
2.4.2. Mecanismo de acción	20
2.4.2.1. Producción de compuestos antagónicos:	20
2.4.2.2. Competencia por químicos o energía disponible.....	21
2.4.2.3. Competencia por hierro	21
2.4.2.4. Competencia por sitios de adhesión	21
2.4.2.5. Aumento de la respuesta inmune.....	21
2.4.2.6. Mejora de calidad de agua	22
2.4.2.7. Producción de nutrientes para el hospedador	22
2.4.3. Clases.....	22
2.4.4. Probióticos usados contra bacterias patógenas en “trucha arco iris”	23
III. MÉTODOS	25
3.1. Diseño del estudio	25
3.2. Lugar	25
3.3. Especímenes	26
3.4. Procedimiento	26
3.4.1. Aislamiento e identificación de bacterias del género <i>Lactobacillus</i> presentes en el intestino de “trucha arco iris”	26
3.4.1.1. Frecuencia y horario de muestreo.....	26
3.4.1.2. Descripción detallada de toma de muestra	26
3.4.1.3. Identificación y caracterización de las colonias	27
3.4.1.4. Variables que analizar	28
3.4.1.5. Aplicación estadística	28
3.4.2. Evaluación <i>in vitro</i> el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” <i>Oncorhynchus mykiss</i> frente a <i>Yersinia ruckeri</i>	28
3.4.2.1. Cepa de <i>Yersinia ruckeri</i>	28
3.4.2.2. Dilución de muestras y conteo de UFC	29

3.4.2.3. Evaluación <i>in vitro</i>	30
3.4.2.4. Variables analizadas	30
3.4.2.5. Aplicación estadística	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Aislamiento e identificación de bacterias del género <i>Lactobacillus</i> y <i>Bacillus</i> presentes en el intestino de “trucha arco iris”	31
4.1.1. Identificación y caracterización de las colonias	31
4.1.2. Análisis estadístico	33
4.2. Evaluación <i>in vitro</i> el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” <i>Oncorhynchus mykiss</i> frente a <i>Yersinia ruckeri</i>	33
4.2.1. Inhibición <i>in vitro</i> frente a <i>Yersinia ruckeri</i>	34
4.2.2. Análisis estadístico	34
V. CONCLUSIONES	37
VI. RECOMENDACIONES	38
VII. REFERENCIAS	39
VIII. ANEXOS	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Piscicultura CIPBS Chucuito- UNA y Laboratorio de Microbiología de FMVZ-UNA (Puno- enero 2017).....	25
Figura 2: Recolección de muestras. Alevines y juveniles (Puno- enero 2017).	26
Figura 3: Sección del intestino para la toma de muestra. FMVZ-UNA (Puno - febrero 2017).....	27
Figura 4: Cepa de <i>Yersinia ruckeri</i> (Puno - marzo 2017).....	28
Figura 5: Diluciones seriadas (fuente: elaboración propia).	29
Figura 6: Observación al microscopio (1000 X) <i>Lactobacillus</i> (izquierda) y <i>Bacillus</i> (derecha), (Puno - abril 2017).	32
Figura 7: Flujograma del aislamiento e identificación de bacterias del intestino de la trucha (fuente: elaboración propia).	49
Figura 8: Flujograma de la evaluación <i>in vitro</i> el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” <i>O. mykiss</i> frente a <i>Y. ruckeri</i> (fuente: elaboración propia).	50
Figura 9: Apertura de la cavidad celómica de la trucha, para la toma de muestra del intestino (Puno – enero 2017).	51
Figura 10: Observación macroscópica de las colonias obtenidas del intestino de la trucha (Puno - enero 2017).....	51
Figura 11: Tinción Gram, para la observación al microscopio de bacterias (Puno – enero 2017).....	52
Figura 12: Pesado(a), dilución (b), autoclavado (c) y enfriamiento (d), de medios de cultivos (Puno- febrero 2017).	52
Figura 13: cortes de los discos de inhibición de 9 mm (Puno – abril 2017).....	53
Figura 14: Lectura y medición del diámetro de los halos de inhibición (Puno – mayo 2017).....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Frecuencia BAL encontradas en laboratorio (Puno – agosto 2017).....	33
Tabla 2: Halos de inhibición de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bacillus</i> frente a <i>Yersinia ruckeri</i> (Puno – junio 20017).....	34
Tabla 3: Análisis de varianza y prueba de Tukey de halos de inhibición (Puno – agosto 2017).....	54

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RNIA	: Red Nacional Nacional de Información Acuícola
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FONDEPES	: Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero
DIREPRO	: Dirección Regional de la Producción
EEBR	: Enfermedad Entérica de la Boca Roja
WHO	: World Health Organization
BAL	: Bacterias Ácido Lácticas
LPS	: Lipopolisacárido
CIPBS	: Centro de Investigación y Producción de Bienes y Servicios
FMVZ	: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
UNA	: Universidad Nacional del Altiplano
MRS	: Man Rogosa Sharpe
FMV	: Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM	: Universidad Nacional Mayor de San Marcos
PCR	: Polymerase Chain Reaction
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias
ppm	: Partes por millón

RESUMEN

La “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) es la principal especie dulceacuícola cultivada en el Perú, siendo el departamento de Puno el primer productor. Sin embargo, su producción se ve mermada por los problemas de mortalidad. Principalmente, suscitados en la etapa de alevinaje. Siendo, *Yersinia ruckeri* la bacteria que se ha identificado con mayor frecuencia en brotes a nivel nacional. Para su control, los productores han usado diversos antimicrobianos y su uso indiscriminado ha generado rápida resistencia y contaminación del lago. Dentro de este contexto, el uso de probióticos surge como una alternativa viable frente a esta problemática. El objetivo de esta investigación fue Identificar bacterias nativas aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” con propiedades probióticas frente a *Yersinia ruckeri* en Puno. Se utilizaron 48 truchas sanas (alevín y juvenil), provenientes de la ecloserie CIPBS Chucuito-Puno; durante los meses de enero-abril 2017. Los peces fueron eutanasiados con una dosis letal de eugenol y, posteriormente se les extrajo el intestino de forma aséptica. Se realizó la apertura y raspado de la mucosa intestinal, para luego ser sembrado en agar MRS e incubadas a 30° C por 24-48 h en el Laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UNA (Puno). A continuación, las colonias fueron identificadas acorde a su morfología y, luego fue evaluado su efecto inhibitorio *in vitro* frente a una cepa de *Yersinia ruckeri*, aislada de un brote de mortalidad en Puno. Se identificaron tres aislados compatibles con los géneros *Lactobacillus*, y un aislado compatible con el género *Bacillus* Los cuatro aislados, mostraron inhibición frente a *Y. ruckeri*, con halos de inhibición superiores a 9 mm de diámetro. Estos resultados indican la presencia de bacterias nativas en el tracto intestinal de la “trucha arco iris”, con potencial probiótico. Así mismo, brindan una alternativa favorable y, amigable con el medio ambiente; frente al uso de antimicrobianos en la truchicultura peruana.

Palabras clave: Bacteria resistente, mortalidad, producción, sistema inmune, truchicultura.

ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is the main freshwater specie cultured in Peru, the department of Puno is the first producer. However, its production is diminished by the problems of mortality. Mainly, raised in the stage of fingerling. *Yersinia ruckeri* is the bacterium that has been most frequently identified in outbreaks nationwide. For its control, the producers have used various antimicrobials and its indiscriminate use has generated rapid resistance and contamination of the lake. In this context, the use of probiotics arises as a viable alternative against this problem. The objective of this research was to identify native bacteria isolated from the intestinal tract of rainbow trout with probiotic properties against *Y. ruckeri* in Puno. Forty - eight healthy trout (juvenile and juvenile) were used, from CIPBS hatchery in Chucuito-Puno; for the months January - April 2017. The fish were euthanized with a lethal dose of eugenol and subsequently the intestine was removed aseptically. The opening and scraping of the intestinal mucosa was performed. All the samples were placed onto MRS agar and incubated at 30 ° C for 24-48 h in the Laboratory of Microbiology from FMVZ-UNA (Puno). Subsequently the colonies were identified according to their morphology and was evaluated its inhibitory effect *in vitro* against to a strain of *Y. ruckeri*, isolated from an outbreak of mortality in Puno. Three isolates, compatible with the genus *Lactobacillus* (3) and one isolate compatible with the genus *Bacillus* (1), were identified. The four isolated showed inhibition against *Y. ruckeri*, with halos greater than 9 mm in diameter. These results indicate the presence of native bacteria in the intestinal tract of rainbow trout, with probiotic potential. They also provide a favorable and environmentally friendly alternative; against the use of antimicrobials in Peruvian trout farming.

Key words: Resistant bacteria, mortality, production, Immune system, truchiculture.

I. INTRODUCCIÓN

La “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) es la principal especie dulceacuícola cultivada en el Perú y los principales departamentos productores en el Perú son Puno, Huancavelica y Junín (RNIA, 2017). Dentro de ellos, Puno es la región que presenta las mejores condiciones para el desarrollo de esta actividad por poseer importantes recursos hídricos. Es así que, el cultivo en esta zona se desarrolla fundamentalmente en jaulas flotantes. En los primeros estadios de la acuicultura, como la etapa de alevinaje, es donde se encuentra más susceptible a las enfermedades y presentan alta mortalidad. Por lo tanto, su sistema inmune aún no es competente. Esto sumado a prácticas de manejo inadecuadas, como altas densidades de carga, transferencia al lago con pesos y tallas pequeñas, estrés, etc., favorecen el desarrollo de eventos mórbidos. Principalmente las de etiología bacteriana. *Yersinia ruckeri* es el agente bacteriano que se ha identificado más veces en brotes que generan alta mortalidad de peces en las regiones de Ancash, Junín, Huancavelica y Puno (Sandoval, 2015). Para su control, los productores han usado diversos antimicrobianos, sin previos diagnósticos de laboratorio.

La *Yersinia ruckeri* es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Afecta principalmente a salmónidos, siendo la especie más susceptible la trucha, además, genera elevadas tasas de mortalidad, con más del 50% en muchos países lo cual ocasiona importantes pérdidas económicas para este sector (Flores, 2013). Es por ello, que esta investigación es de suma importancia ya que permitió aislar e identificar bacterias nativas presentes en el tracto intestinal de la “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*) y se seleccionó aquellas con potencial probiótico (*Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp.), las cuales fueron evaluadas *in vitro* frente a *Y. ruckeri*. De esta forma se busca brindar una alternativa saludable y amigable con el ambiente, frente al uso de antimicrobianos. El cual, debido a su uso indiscriminado genera resistencia y contaminación del medio acuático.

Objetivo general

- Aislar *Lactobacillus sp.*, del tracto intestinal de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en Puno.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar bacterias del género *Lactobacillus* presentes en el intestino de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss*.
- Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* frente a *Yersinia ruckeri*.

Hipótesis específicas

Ho: Bacterias nativas aisladas de “trucha arco iris” no inhiben *in vitro* a *Yersinia ruckeri*.

Ha: Bacterias nativas aisladas de “trucha arco iris” inhiben *in vitro* a *Yersinia ruckeri*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Trucha arco iris

La trucha es una especie típica de aguas continentales, que vive en ambientes lóticos y lénticos, originaria de la vertiente del Océano Pacífico en Norteamérica (Huet, 1973). Se ha introducido en 1874 a las aguas en todos los continentes; salvo en la Antártida, con fines de pesca recreativa y de acuicultura (FAO, 2017).

La trucha es adaptable a los ambientes confinados, soporta altas densidades de carga, es un pez domesticado, resistente al manejo y se reproduce en cautiverio (FONDEPES 2004), en el Perú, la trucha fue la primera especie en el desarrollo de la acuicultura peruana, es así que en 1939 se importaron 50 000 ovas embrionadas procedentes de los Estados Unidos (Godoy, 2003 citado en Fernández, 2011).

2.1.1. Clasificación Taxonómica

DOMINIO	: Eucariota
REYNO	: Animalia
PHYLLUM	: <i>Chordata</i>
SUB PHYLLUM	: <i>Vertebrata</i>
GRUPO	: <i>Gnatostomata</i>
SUPER CLASE	: <i>Pisces</i>
CLASE	: <i>Osteichthyes</i>
SUB CLASE	: <i>Actinopterygii</i>
SUPER ORDEN	: <i>Clupeomorpha</i>
ORDEN	: <i>Salmoniformes</i>
SUB ORDEN	: <i>Salmonoidei</i>
FAMILIA	: <i>Salmonidae</i>
GÉNERO	: <i>Oncorhynchus</i>
ESPECIE	: <i>mykiss</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1792
NOMBRE COMÚN	: “trucha arco iris”

Fuente: Adaptado por Smith y Stearley de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos a través del Comité de nombres científicos de peces. Imarpe.

2.1.2. Producción

2.1.2.1. Mundial

Las truchas, junto con los salmones conforman el principal grupo de especies comercializadas mundialmente y el aumento de su producción ha ocasionado un crecimiento considerable en el consumo anual per cápita de especies de agua dulce (FAO, 2016).

2.1.2.2. Nacional

En el Perú, la producción de “trucha arco iris” ha ido en aumento en los últimos años. Registrando 3 111 t en el año 2003 y mayor a 52 000 t en el 2016. Asimismo, los principales departamentos productores del país son: Puno (43 290.02 t), seguido por Huancavelica (3 704.05 t) y Junín (2 262.96 t), dichos valores son los registrados en el año 2016 (RNIA, 2017). En la región Puno posee un enorme potencial de espejos de agua (354 lagunas, 316 ríos, 7 represas y 1 lago); De éstos, el Lago Titicaca es el más importante para el desarrollo de la acuicultura (AQUAHOY 2011). Principalmente el cultivo de “trucha arco iris” en jaulas flotantes, de amplia difusión y aceptación.

2.2. *Yersinia ruckeri*

2.2.1. Etiología

Yersinia ruckeri pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Toback, 2009) siendo un bacilo Gram negativo corto, entre 1.5-2.0 um por 0,5 um (Buller, 2014). Así mismo, es conocido como el agente causal de la enfermedad entérica de la boca roja, que afecta a salmónidos en todo el mundo (Kumar *et al.*, 2015), y fue aislada de “trucha arco iris” en 1952, en el valle Hagerman, Idaho - Estados Unidos (Ross *et al.*, 1966). Desde allí, se extendió a poblaciones salvajes de peces, de agua dulce en Europa, África, Norteamérica, Sudamérica, Asia y Australia (Toback, 2009).

Las cepas de *Y. ruckeri* se han clasificado sobre la base de serotipos, biotipos y proteínas de la membrana externa (Kumar *et al.*, 2015). Por tanto, se han dividido en 4 serotipos con diferentes subgrupos; serotipo O1 (serovar I y III), serotipo O2 (serovar II), serotipo O3 (serovar V) y serotipo 4 (serovar VI); Asimismo, existen 2 biotipos, biotipo I (móvil)

y el biotipo II (inmóvil) (Walter, 2012). En nuestro país, se han identificado ambos biotipos en los departamentos de Junín, Huancavelica y Ancash (Flores, 2013).

En el Perú, la yersiniosis representa un problema principal en los departamentos de Puno y Junín; zonas con mayor producción de truchas (Sandoval, 2015), consecuentemente se ha aislado y producido brotes de enfermedad en Chachapoyas, Huaraz, Huancavelica y Cajamarca produciendo rangos de mortalidad que oscilan entre 40 y 80 % (Sandoval, 2015). Adicionalmente, (Mamani, 2016) reporta el aislamiento de *Y. ruckeri* en el distrito de Pomata - Puno, con una frecuencia de 2.3%.

2.2.2. Epidemiología

2.2.2.1. Especies susceptibles

La yersiniosis ha sido descrita en diversas especies de peces (Kumar *et al.*, 2015). Sin embargo, los salmónidos y en especial la “trucha arco iris” es la especie más susceptible (Furones *et al.*, 1993; Bueno, 2012), de igual manera se han reportado brotes de la enfermedad en poblaciones de trucha común o marrón (*Salmo trutta*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), King salmon (*Oncorhynchus tshawytsch*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), Salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Dulin *et al.*, 1976; Bullock *et al.*, 1978).

2.2.2.2. Transmisión

Y. ruckeri se transmite de forma horizontal por contacto directo con animales enfermos o portadores (Walter, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Asimismo, este patógeno ha sido aislado en heces de peces portadores, dos meses después de un brote de EEER (Bueno, 2012). Además *Y. ruckeri* posee la capacidad de formar biofilms, asociado con superficies y sedimentos (Sandoval *et al.*, 2015), asimismo *Y. ruckeri* es capaz de sobrevivir y seguir siendo infeccioso en el medio acuático (Busch y Lingg, 1975).

La transmisión vertical hasta ahora no ha sido demostrada y probablemente no ocurra (Dulin *et al.*, 1976). Por otro lado, su transmisión ha sido relacionada también con otros vectores, tales como invertebrados acuáticos y aves (Villumsen *et al.*, 2014).

2.2.2.3. Patogenia y Lesiones

Tobback *et al.* (2010) realizaron varios estudios *in vivo*, estableciendo que las branquias (moco) son el principal lugar de adherencia para el patógeno *Y. ruckeri* también, se han encontrado niveles moderados de la bacteria en piel y tejido intestinal (Bueno, 2012 y Walter, 2012). Dado que, la diseminación sistémica de la bacteria es realizada debido a la alta vascularización que poseen las branquias (Fernández, 2011; Walter, 2012), debido a esta septicemia, se realiza la colonización de órganos internos del pez (Kumar *et al.*, 2015).

Los alevines son los más afectados con la EEER, presentando un cuadro agudo (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011) y, a medida que los peces son más grandes desarrollan la enfermedad crónica (Flores, 2013) y los signos clínicos incluyen melanosis, exoftalmia, hemorragias petequiales alrededor del ano, aletas, branquias, ojos y músculos laterales (Walter, 2012 y Kumar *et al.*, 2015), éstas también son observadas internamente en hígado, páncreas, ciegos pilóricos, vejiga e intestino (Flores, 2013), puesto que el intestino contiene un material mucoso o acuoso, de color amarillento (Bueno, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

2.2.3. Prevención y control

2.2.3.1. Uso de antibióticos

Se han utilizado varios antibióticos para el control de la EEER (Bueno, 2012), como la oxitetraciclina, sulfadiazina en combinación con trimetropim, florfenicol, ácido oxolínico, flumequina y amoxicilina (Flores, 2013; Kumar *et al.*, 2015). Existen un limitado espectro de antimicrobianos aprobados en acuicultura; éstos han generado resistencia rápidamente (Pandiyani *et al.*, 2013). Adicionalmente, pruebas *in vitro* han demostrado que *Y. ruckeri* desarrolla resistencia rápidamente contra ácido oxolínico, oxitetraciclina y sulfonamidas (Rodgers, 2001).

2.2.3.2. Uso de vacunas

Es una de las primeras enfermedades en peces que ha desarrollado una vacuna comercial efectiva (Kumar *et al.*, 2015). Sin embargo, las vacunas utilizadas son variadas; incluyendo monovalentes, bacterinas, bacterias vivas atenuadas, sub unidades de proteínas purificadas y recombinantes (Walter, 2012).

Villumsen *et al.* (2014) encontraron que la bacterina de *Y. ruckeri* serotipo O1, biotipo 1 provee buenos niveles de protección. Por otro lado, Deshmukh *et al.* (2012) desarrollaron una vacuna bivalente a partir de cepas de *Y. ruckeri* biotipo 1 y 2 inactivados con formalina; la cual ha brindado buena protección contra el biotipo 2, consecuentemente el desarrollo de nuevas vacunas basadas en la proteasa Yrp1, gen aroA, producto extracelular y lipopolisacárido han brindado buena protección contra *Y. ruckeri* biotipo 1 (Temprano *et al.*, 2005; Ispir y Dorucu, 2010; 2014), no obstante las cepas del biotipo 2 son difíciles de combatir y son las responsables de brotes de enfermedad en peces que han sido vacunados contra cepas del biotipo 1 (Austin *et al.*, 2003; Arias *et al.*, 2007).

En el Perú, dadas las características de los criaderos y los procedimientos de manejo utilizados, es difícil la erradicación del agente en las producciones peruanas (Bravo y Kojagura, 2004), complicando el control la ausencia de vacunas comerciales disponibles (Fernández, 2011; Bueno, 2012). Sin embargo, Cueva *et al.* (2016) han desarrollado una vacuna elaborada con aislados de *Y. ruckeri* en nuestro país; la cual ha tenido muy buenos resultados *in vitro*.

2.3. Microbiota del tracto gastrointestinal de los peces

Las bacterias que están presentes en el tracto gastrointestinal de los peces, provienen del medio acuático (Bidhan *et al.*, 2013; Muthukumar y Kandeepan, 2015). El tracto digestivo de los peces es un ambiente de cultivo favorable para estos microorganismos (Muthukumar y Kandeepan, 2015). Por consiguiente, el extraer microorganismos autóctonos de los peces, favorece su utilización como probióticos (Burbank *et al.*, 2012; Henríquez, 2013). Dado que, tienen un gran potencial de exclusión competitiva con los patógenos, debido a la adaptación del mismo nicho ecológico (Bidhan *et al.*, 2013). Por lo que, existe un consenso general que probióticos autóctonos pueden tener mayor probabilidad de colonizar el tracto digestivo, establecerse y multiplicarse en el intestino del hospedador y, de esta forma conferir beneficios al huésped (Henríquez, 2013; Muñoz, 2015).

2.4. Probióticos

Es una de las alternativas que puede disminuir la dependencia de la industria acuícola hacia los antibióticos (Berdasco, 2016; Zorriehzahra *et al.*, 2016). Puesto que, el suministro de una dieta enriquecida con microorganismos probióticos proporciona una mejora del sistema inmune, la asimilación de nutrientes y el desarrollo normal del pez, evitando así una infección por patógenos en situaciones de estrés, muy comunes al manipular peces en condiciones de cautividad (Walter, 2012; Berdasco, 2016).

2.4.1. Definición

Etimológicamente el término probiótico es originado de la palabra en latín “*pro*”, que significa “por” y la palabra griega “*bios*”, que significa “vida” (Cordero *et al.*, 2014) por ese motivo son definidos como microorganismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios saludables para el huésped (FAO y WHO, 2001). Acorde a esta definición, sus beneficios potenciales son múltiples, incluyendo la producción acuícola; que enfrenta problemas; principalmente por infecciones bacterianas y/o virales (Cordero *et al.*, 2014). Más aún, considerando que la terapia convencional para enfermedades bacterianas es el uso de antimicrobianos; los cuales generan rápida resistencia antimicrobiana frente a los patógenos (Bidhan *et al.*, 2013), de tal manera que, los probióticos tienen un beneficio económico significativo, dado que reducen la demanda de antimicrobianos (Schubiger *et al.*, 2015).

2.4.2. Mecanismo de acción

2.4.2.1. Producción de compuestos antagónicos:

Los probióticos producen una variedad de compuestos químicos de amplio espectro (Bidhan *et al.*, 2013). Por ello estos incluyen la producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, proteasas, peróxido de hidrógeno, alteración del pH por la producción de ácidos orgánicos (Sihag y Sharma, 2012; Bidhan *et al.*, 2013). De esta forma, constituyen una barrera contra los patógenos oportunistas (Strom-Bestor y Wiklund, 2011; Sihag y Sharma, 2012).

2.4.2.2. Competencia por químicos o energía disponible

Dentro del intestino, microorganismos patógenos como benéficos coexisten en el mismo ecosistema y, utilizan los mismos nutrientes (Sihag y Sharma, 2012, Sommer y Backhed, 2013). Este ecosistema microbiano en ambientes acuícolas es generalmente dominado por heterótrofos, compitiendo por sustancias orgánicas; como fuente de carbono y energía (Sihag y Sharma, 2012).

2.4.2.3. Competencia por hierro

Todos los microorganismos requieren hierro para el crecimiento (Bidhan *et al.*, 2013). Sin embargo, los sideróforos son agentes quelantes específicos de ión férrico de bajo peso molecular, los cuales pueden disolver hierro precipitado y hacerlo disponible para el crecimiento microbiano (Bidhan *et al.*, 2013). Los patógenos bacterianos “exitosos” son capaces de competir eficazmente por el hierro en ambientes altamente estresados de hierro de los tejidos y fluidos corporales del huésped (Sihag y Sharma, 2012). Además, las bacterias benéficas que producen sideróforos pueden ser usadas como probióticos para competir con otras patógenas, cuya patogenicidad es debida a la producción de sideróforos (Sihag y Sharma, 2012).

2.4.2.4. Competencia por sitios de adhesión

Es otro de los mecanismos para prevenir la adhesión de patógenos al intestino o superficie de los tejidos (Sihag y Sharma, 2012; Pandiyan *et al.*, 2013). Dado que, la habilidad para adherirse a la mucosa entérica y a la pared de la superficie es necesaria para que la bacteria llegue a establecerse en los intestinos de los peces (Pandiyan *et al.*, 2013). Ya que la adhesión puede no ser específica; sino a través de adhesinas y receptores moleculares sobre la superficie (García *et al.*, 2015).

2.4.2.5. Aumento de la respuesta inmune

Los inmunoestimulantes son compuestos químicos que activan el sistema inmune de los animales y proveen más resistencia frente a infecciones, causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos (Abasolo, 2015). Sin embargo, las larvas de peces, camarones y otras especies acuícolas tienen sistemas inmunes menos desarrollados que peces adultos, por lo que dependen primariamente de respuestas inmunes no específicas (Sihag y Sharma,

2012; Bidhan *et al.*, 2013). Dado que, la suplementación de bacterias probióticas en el alimento o en alguna fuente de inclusión pueden estimular el componente celular y humoral del sistema inmune en varias especies de peces y moluscos, incluyendo salmónidos y camarones (Bidhan *et al.*, 2013). Por ejemplo, peces tratados con probióticos aumentaron, significativamente, la actividad fagocítica de los macrófagos presentes en el riñón anterior. Además, incrementó la actividad de la lisozima en el suero y moco del intestino (Walter *et al.*, 2012).

2.4.2.6. Mejora de calidad de agua

Varios estudios reportan que la adición de *Bacillus* spp mejora la calidad de agua, dado que es un excelente purificador (Sihag y Sharma, 2012; Badinah *et al.*, 2013). Estas bacterias son más eficientes convirtiendo materia orgánica en CO₂, que las bacterias Gram negativas (Hariati *et al.*, 2011). Por lo que, mantener estas bacterias Gram positivas en la producción de estanques y/o granjas puede minimizar el desarrollo de carbón orgánico y disuelto durante el ciclo de cultivo, promoviendo el incremento de algas fitoplancton, a través del incremento de CO₂ (Sihag y Sharma, 2012).

2.4.2.7. Producción de nutrientes para el hospedador

Los probióticos tienen un efecto directo sobre el crecimiento del hospedador al mejorar su nutrición por el suministro de nutrientes, tales como ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos esenciales (Muñoz, 2015). Merrifield *et al.* (2010), demostraron que ejemplares de “trucha arco iris” alimentadas con *B. subtilis* y *B. licheniformis* durante 10 semanas presentaban mejores índices de conversión y crecimiento. Por otro lado, las bifidobacterias son capaces de bajar el pH del intestino y crear un ambiente no habitable para bacterias patógenas, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta (Sihag y Sharma, 2012). Finalmente, Bifidobacterias, Streptococcus y Enterococcus producen vitamina K (Sihag y Sharma, 2012).

2.4.3. Clases

Las especies usadas comúnmente como probióticos incluyen las del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Carnobacterium*, *Eubacterium* y cepas de *Bacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*,

Staphylococcus, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Psychrobacter*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Altermonas*, *Tetraselmis*, *Roseobacter*, *Weissella* y *Aspergillus* (Balcázar *et al.*, 2006; Nayak, 2010; Lakshmi *et al.*, 2013; Tuan *et al.*, 2013; Lazado *et al.*, 2015).

2.4.4. Probióticos usados contra bacterias patógenas en “trucha arco iris”

La mayoría de los probióticos propuestos para el uso en acuicultura pertenecen a las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*), *Bacillus*, *Pseudomonas* y a los géneros *Vibrio* (Forouhandeh *et al.*, 2010; Newaj *et al.*, 2014). Las bacterias ácido lácticas (BAL) es un grupo de bacilos o cocos Gram positivos (Buller, 2014). Son microorganismos usados generalmente como probióticos, aplicados de forma segura en veterinaria (Rauta *et al.*, 2013). Por otro lado, *Bacillus* spp., son bacterias Gram positivas, formadoras de esporas (Adineh *et al.*, 2013).

Lactobacillus lactis y *Lactobacillus fermentum* demostraron ser antagonistas de *Y. ruckeri*; dado que redujeron la adhesión del patógeno al moco del pez. Así mismo, encontraron que el 60% de 12 bacterias ácido lácticas mostraron exclusión competitiva contra *Y. ruckeri*. Similarmente, Panigrahi *et al.* (2007) reportaron el aumento de la inmunidad innata en truchas, alimentadas con tres probiontes liofilizados *Lactococcus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus subtilis*. Asimismo, otros estudios reportan el efecto positivo de varios probióticos (*Lactococcus lactis*, *L. casei*, *Leuconostoc mesenteroides*) sobre la actividad fagocítica del riñón anterior y la actividad del complemento del suero y menor proliferación del patógeno *Aeromonas salmonicida* en el intestino (Balcázar *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2009).

Diversos estudios reportan que, el uso de *Bacillus* spp., como probiótico; dado que promueven el crecimiento y la eficiencia alimentaria de larvas de trucha (Adineh *et al.*, 2013). Por ejemplo, la administración oral de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformes* protege a la trucha contra infecciones subsecuentes de *Y. ruckeri* (Palíková *et al.*, 2015). Asimismo, Abbass *et al.*, 2010 inyectaron componentes de la pared celular de cepas del probiótico de *Bacillus subtilis* y componentes de la membrana externa, incluyendo LPS de *Aeromonas sobria*; siendo también efectivo para el control de yersiniosis en trucha. Por otro lado, Capkin y Altinok (2009) demostraron que el uso concomitante de *Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis* como suplemento alimenticio es beneficioso

para la trucha, protegiendo al pez contra la yersiniosis y aumentando la digestibilidad y utilización del alimento. En adición, Ghosh *et al.* (2002) indicaron que *Bacillus circulans*, *B. pumilus* y *B. cereus* tuvieron un rol importante en la eficiencia alimenticia de peces cultivados.

Burbank *et al.* (2012) encontró que el tratamiento con *Bacillus* sp., redujo la mortalidad de 80% a 0% y, el tratamiento con *Aeromonas sobria* la redujo en 6%; administradas como suplemento en la dieta de peces infectados del patógeno *Y. ruckeri*. Por otro lado, Burbank *et al.* (2012) identificaron 16 bacterias aisladas del tracto gastrointestinal de la “trucha arco iris” con potencial probiótico, las cuales inhibieron el crecimiento de *Flavobacterium psychrophilum*.

III. MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

El diseño del estudio es transversal. Se seleccionaron un total de 48 truchas sanas, entre los estadios de alevín y juvenil, provenientes de la eclosería del CIPBS Chucuito-Puno de la UNA. Los peces fueron trasladados vivos al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ - UNA. Posteriormente, fueron sacrificados con una dosis letal de eugenol, y se procedió a la necropsia de acuerdo al protocolo sugerido por Ferguson (2006).

Para el aislamiento de bacterias se tomó asépticamente muestras de la mucosa del intestino, las cuales fueron sembradas en agar MRS. Los aislados identificados y caracterizados como *Lactobacillus sp.*, y *Bacillus sp.*, fueron afrontados *in vitro* contra *Y. ruckeri*, considerándose inhibitorio aquellos halos superiores a los discos de 9 mm de diámetro.

3.2. Lugar

Las truchas provinieron de la piscicultura del CIPBS ubicada en el distrito de Chucuito, provincia de Puno, departamento de Puno (S 15° 53' 49", O 69° 53' 65"), a una altitud de 3931 msnm. Mientras que, el procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno. El estudio fue realizado durante los meses de enero - mayo del 2017 (Figura 1).



Figura 1: Piscicultura CIPBS Chucuito- UNA y Laboratorio de Microbiología de FMVZ-UNA (Puno-enero 2017).

3.3. Especímenes

Se utilizaron 48 truchas de los estadios de alevín y juvenil, con un peso promedio de 4 g y 90 g y con talla promedio de 6 cm y 18.5 cm respectivamente (Figura 2).



Figura 2: Recolección de muestras. Alevines y juveniles (Puno- enero 2017).

3.4. Procedimiento

3.4.1. Aislamiento e identificación de bacterias del género *Lactobacillus* presentes en el intestino de “trucha arco iris”

3.4.1.1. Frecuencia y horario de muestreo

Se recolectaron de 3 a 5 peces por semana, generalmente los días lunes de 7 a 8 am (en ayunas), del CIPBS Chucuito UNA – Puno.

3.4.1.2. Descripción detallada de toma de muestra

Los peces, fueron tomados con la ayuda de un chingullo. Procurando la identificación de peces sanos, sin signo clínicos de enfermedad. Los seleccionados, fueron situados en un envase acondicionado con tecnopor y una bolsa de polietileno gruesa, conteniendo agua; en la proporción de 1/3 de agua por 2/3 de aire; siendo así trasladados vivos, al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UNA. Posteriormente los peces fueron eutanasiados con eugenol, a una concentración de 40-60 ppm (Keeme *et al.*, 1998) y, se realizó el corte medular con la ayuda de un bisturí, causando así la muerte del pez. Luego, se procedió a la apertura por el lado izquierdo de las truchas, a partir de la línea lateral y el poro anal; de acuerdo con Ferguson (2006). Para descubrir la cavidad celómica del pez y ubicar el tracto intestinal con una pinza (Figura 3).

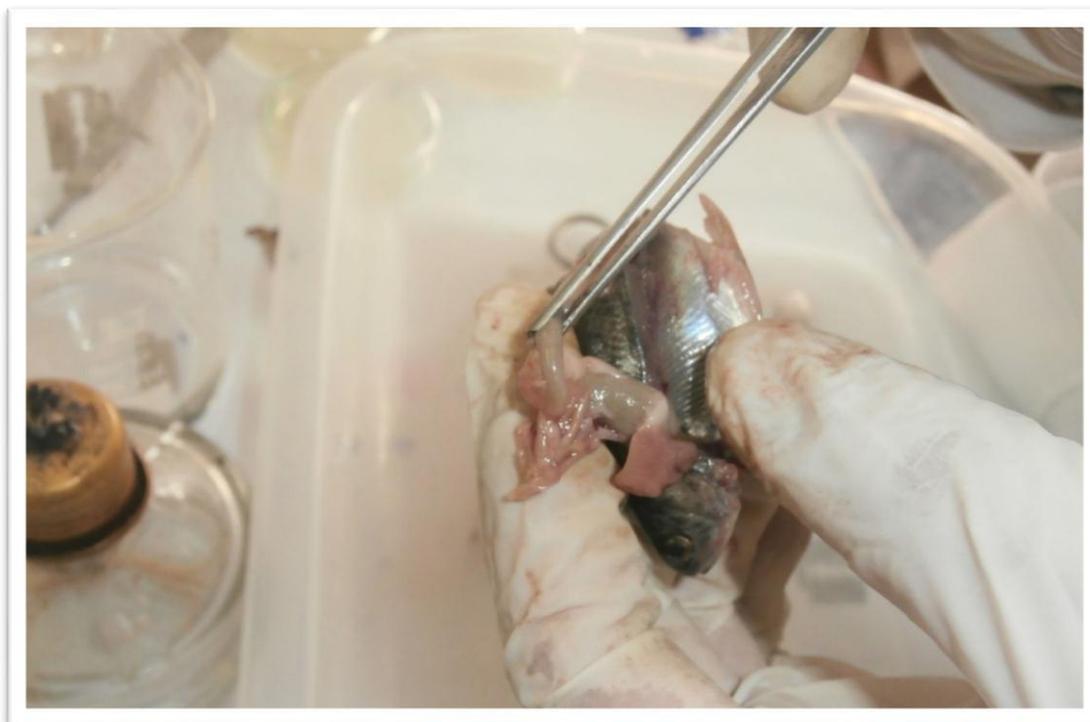


Figura 3: Sección del intestino para la toma de muestra. FMVZ-UNA (Puno - febrero 2017).

En la recolección de la muestra microbiológica, se realizó un corte en condición aséptica del intestino delgado, en la porción media posterior y se procedió a realizar un raspado en la mucosa del intestino con un ansa estéril. Posteriormente se realizó el sembrado por agotamiento en placa Petri con agar MRS (de 2 a 5 placas), las cuales fueron incubadas a 28 - 30° C por un tiempo de 24 a 48 horas en una estufa (marca Memmert, modelo IN 110).

3.4.1.3. Identificación y caracterización de las colonias

Transcurrido las 48 horas de incubación, se procedió a la observación macroscópica de las placas Petri (2 a 5 placas). Fueron seleccionadas aquellas colonias con características de *Lactobacillus* (colonias pequeñas, blanquecinas cremosas) y *Bacillus* (colonias rizoides cremosas irregulares). Posteriormente, se procedió a realizar la tinción Gram, para luego observar su morfología; al microscopio de luz óptica (marca Leica, modelo ICC50 HD). Siendo seleccionadas aquellas colonias Gram positivas, de forma bacilar; compatible con el género *Lactobacillus* y del género *Bacillus*. Dichas colonias seleccionadas fueron re-incubados nuevamente a 28 - 30° C por un tiempo de 24 a 48 horas, para obtener colonias puras.

3.4.1.4. Variables que analizar

Las variables, para el primer objetivo es cualitativo las cuales son, la presencia o ausencia de bacterias nativas del género *Lactobacillus* y *Bacillus* en el tracto intestinal de la “trucha arco iris”.

3.4.1.5. Aplicación estadística

Se utilizó frecuencia para determinar el porcentaje de la presencia o ausencia de bacterias nativas del género *Lactobacillus* y *Bacillus* en la “trucha arco iris”.

3.4.2. Evaluación *in vitro* el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* frente a *Yersinia ruckeri*

Para la evaluación *in vitro* se utilizó el método de discos de inhibición, acorde a lo descrito por Henríquez, 2013.

3.4.2.1. Cepa de *Yersinia ruckeri*

La cepa de *Y. ruckeri* fue aislada de un brote de mortalidad en el Lago Titicaca por el Laboratorio de Histopatología, Embriología y Patología Veterinaria - Sección Ictiopatología de la FMV-UNMSM; a través del análisis microbiológico y confirmada molecularmente por PCR. Para este estudio la cepa fue reactivada y sembrada en agar TSA; posteriormente fue trasladada en menos de 24 h al Laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UNA. (Figura 4).

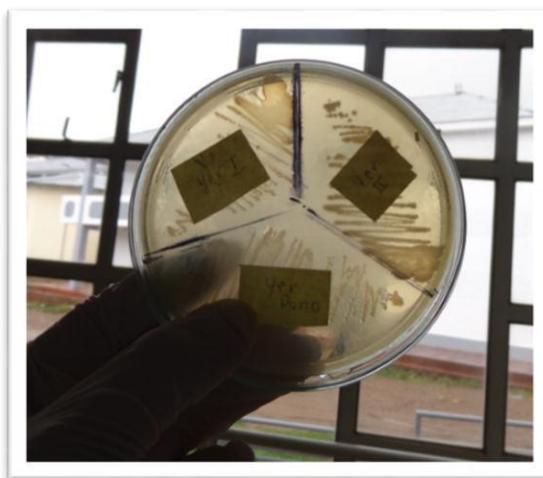


Figura 4: Cepa de *Yersinia ruckeri* (Puno - marzo 2017)

3.4.2.2. Dilución de muestras y conteo de UFC

De cada colonia aislada, fueron incubadas en tubos de ensayo conteniendo caldo MRS a una temperatura de 28 – 30° C por un tiempo de 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó las diluciones seriadas, para lo cual se tomó 0.1 mL de caldo de MRS conteniendo las colonias aisladas y se diluyó en 0.9 mL de agua destilada estéril. Luego en un segundo tubo, se homogeniza y se toma 0.1 mL de muestra y se diluye en un tercer tubo con 0.9 mL de agua destilada estéril. De esta forma se realizó las 8 repeticiones secuenciales (Figura 5). Posteriormente, de cada uno de los 8 tubo de ensayo se tomó una muestra para ser sembrado en 8 placas Petri, conteniendo Agar Plate Count (una placa Petri por cada tubo de ensayo) para luego ser incubadas en la estufa a una temperatura de 28 - 30° C por 24 a 48 horas. Trascurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar el conteo de colonias macroscópicamente, seleccionando aquella donde se encontró entre 25 a 50 colonias por placa. Para llegar a la concentración 1×10^7 UFC. De la misma forma, se realizó la dilución de muestra y conteo de UFC para la cepa *Y. ruckeri*; acorde a lo descrito por Henríquez, 2013.

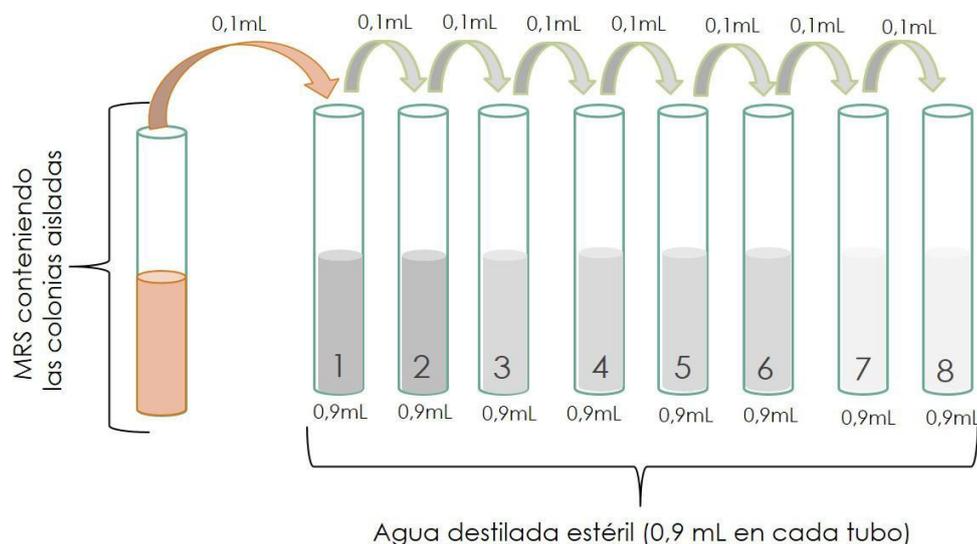


Figura 5: Diluciones seriadas (fuente: elaboración propia).

3.4.2.3. Evaluación *in vitro*

Se sembraron los inóculos en agar MRS e incubados a 28 - 30° C por 24 a 48 horas; luego del cual se retiraron discos de inhibición realizando un corte de 9 mm de diámetro del medio de cultivo MRS; utilizando un tubo de ensayo estéril. Dichos discos de inhibición fueron sobrepuestos en el medio de cultivo de agar Mc Conkey; recién sembrados con la cepa de *Y. ruckeri* (2.7×10^7 UFC) e incubadas a 28 - 30° C por 24 a 48 horas. Se realizaron tres repeticiones por cada bacteria nativa aislada. Siendo considerados inhibitorios los discos que presentaron formaciones de halos mayores a 9 mm de diámetro.

3.4.2.4. Variables analizadas

Cualitativa: Inhibe / No inhibe

Cuantitativa: Diámetro halos de inhibición

3.4.2.5. Aplicación estadística

Se utilizó el Análisis de Varianza de 1 vía (ANOVA) para la verificación si las bacterias nativas aisladas de la trucha inhiben a *Y. ruckeri* (Ha) o no inhiben a *Y. ruckeri* (Ho).

Adicionalmente de haber inhibición, se utilizará un test post ANOVA, LSD Fisher, el cual permitirá establecer entre cuáles existe variabilidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La truchicultura en el Perú, específicamente en el departamento de Puno es una actividad promisoriosa. Sin embargo, las enfermedades bacterianas son la principal causa que merma la producción, por los índices elevados de mortalidad; sobre todo en la etapa de alevinaje. Siendo el principal agente causal, *Y. ruckeri*.

Dentro de este marco, la presente investigación busca brindar una nueva alternativa que, permita combatir a este patógeno, mediante el uso de microorganismos nativos. Además, de no provocar daños al medioambiente ni a la población consumidora de esta importante especie íctica; por el uso habitual e indiscriminado de antibióticos; lo cual genera resistencia. La resistencia a antibióticos puede ser inducida por su elevado uso en la industria. Siendo, demostrado que el uso de antibacterianos en centros de cultivo incrementa la frecuencia de resistencia en la microflora bacteriana de los peces, como es reportado por Wittwer (2012). Por ejemplo, estudios realizados en “trucha arco iris” demostraron incremento en la resistencia a ácido oxolínico y oxitetraciclina en bacterias intestinales (Austin y Al-Zahrani, 1988).

4.1. Aislamiento e identificación de bacterias del género *Lactobacillus* y *Bacillus* presentes en el intestino de “trucha arco iris”

El uso de probióticos en acuicultura es una práctica nueva, comparada con otras especies de animales ya que poco se conoce sobre las especies de microorganismos con capacidad probiótica en la truchicultura. Se requieren de estudios de este tipo, que permitan conocer cuáles son las cepas con posible capacidad probióticas, aisladas de las mismas especies que se verán beneficiadas y así implementar trabajos de investigación que permitan dar solución a problemas sanitarios en la truchicultura y al cuidado del medio (García *et al.*, 2015). Por otro lado, Henríquez (2013) menciona que los probióticos más comunes que han sido utilizados en acuicultura son bacterias ácido lácticas.

4.1.1. Identificación y caracterización de las colonias

Se obtuvo un total de cuatro aislados microbianos. Los cuales fueron identificados como tres aislados del género *Lactobacillus* y un aislado del género *Bacillus* (figura 6). Dichos resultados son congruentes con lo reportado por Muthukumar y Kandeepan (2015) que reportaron cinco aislados (dos *Bacillus* spp., dos *Lactobacillus* y una *Macrocooccus* spp.);

de la microflora de peces de agua dulce, con un alto potencial para adherirse al mucus de los peces, con habilidad para inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*. Asimismo, con los resultados reportado por Balcázar *et al.* (2007) y Wittwer (2012); quienes manifiestan que los principales grupos de bacterias aisladas del tracto gastrointestinal de salmónidos son bacterias ácido lácticas, como es el caso de *Lactobacillus*. Asimismo, Henríquez (2013) reportó el aislamiento de *Lactobacillus* spp., y *Bacillus* spp en heces de salmones. Del mismo modo, Muthukumar y Kandeepan (2015) reportaron que bacterias aisladas de peces, como *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., y *Macrococcus* spp., pueden tener alto potencial para adherirse a la mucosa de los peces. En adición, mostraron alta habilidad para inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*.

Por otro lado, Pond *et al.* (2006) describieron que la microbiota intestinal de la “trucha arco iris” estaba compuesta principalmente por *Clostridium* y *Aeromonas*, lo cual es congruente con Kim *et al.* (2007) quienes reportaron que *Clostridium* era la bacteria dominante. Es importante mencionar que, la composición microbiana del tracto intestinal de los peces, depende principalmente de su ambiente y la composición bioquímica de su dieta; según lo señalado por Wittwer (2012). En el estudio las muestras, fueron tomadas de un centro de cultivo (estanques); cuya fuente de agua proviene de un manantial y administran una dieta comercial.

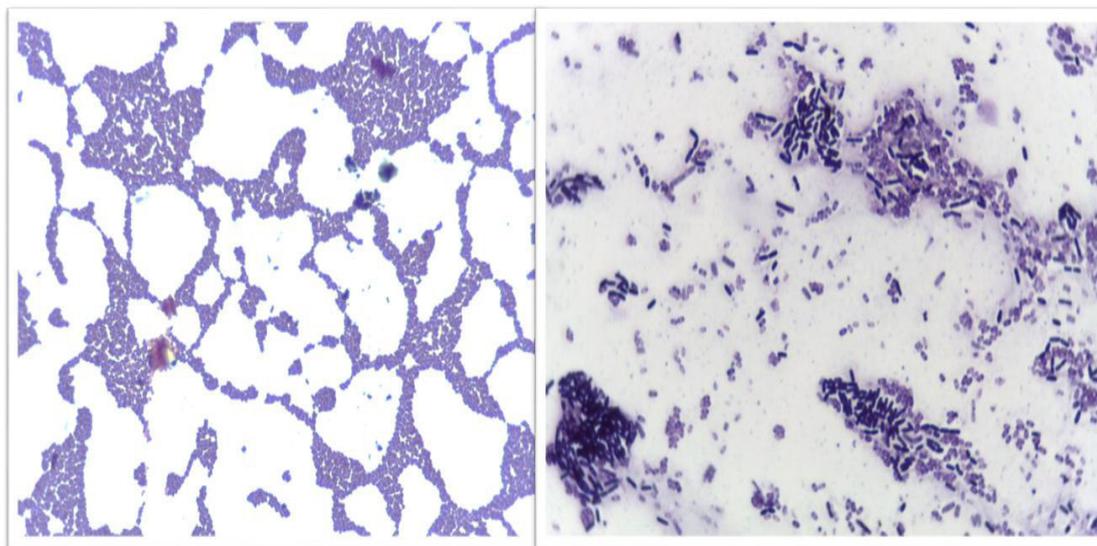


Figura 6: Observación al microscopio (1000 X) *Lactobacillus* (izquierda) y *Bacillus* (derecha), (Puno - abril 2017).

4.1.2. Análisis estadístico

De los 48 especímenes de “trucha arco iris”, utilizados en este estudio se reporta que el 8.4 % presentaron las bacterias benéficas del género *Lactobacillus* y *Bacillus* en su tracto intestinal mientras que el 91.6 % no se encontró bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus* en su intestino, para este estudio (Tabla 1).

Tabla 1: Frecuencia BAL encontradas en laboratorio (Puno – agosto 2017).

Xi	hi	Frecuencia relativa	
		decimal	porcentaje
no	44	0,916	91,6
si	4	0,084	8,4
	48		

4.2. Evaluación *in vitro* el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” *Oncorhynchus mykiss* frente a *Yersinia ruckeri*

El uso de probióticos en la industria acuícola ha ganado amplio terreno en los últimos años, ya que se ha demostrado las características benéficas sobre el huésped (exclusión competitiva de bacterias patógenas, mejoran la calidad del agua, aumentan la respuesta inmune), de ahí a que actualmente en países del primer mundo, sean implementados en todas las etapas de la producción piscícola (García *et al.*, 2015).

Tal y como lo señalaron Henríquez (2013) y Maji *et al.* (2016), existe un consenso general sobre el beneficio de utilizar probióticos nativos, extraídos de peces; dado que se adhieren muy bien a la pared intestinal y compiten con los patógenos. Además, son capaces de sobrevivir, colonizar y proteger a los peces. De la misma forma, Wittwer (2012) indicó que es importante comprender los aspectos de la ecología microbiana en los sistemas de cultivo acuícola, como una estrategia para prevenir la infección por patógenos o mejorar la nutrición de los peces.

4.2.1. Inhibición *in vitro* frente a *Yersinia ruckeri*

Se realizaron 3 repeticiones por cada bacteria encontrada en el tracto intestinal de la trucha (en el laboratorio, se les dió un código a las muestras de bacterias del género *Lactobacillus* 1, 2 y 3 con LP, LG y LD; respectivamente y, el código de BS para la bacteria del género *Bacillus*). En la Tabla 2 se observan los resultados de los halos de inhibición frente a *Y. ruckeri*. Cada celda indica los diámetros de los halos en mm por cada aislado; considerando que existe inhibición del patógeno con halos mayores a 9 mm de diámetro. Como se puede observar, se obtuvieron halos de 19.7, 18.0, 19.0 y 15.0 mm; para las cepas aisladas LP, LG, LD y BS; respectivamente.

Tabla 2: Halos de inhibición de *Lactobacillus* y *Bacillus* frente a *Yersinia ruckeri* (Puno – junio 20017).

AISLADOS	<i>Yersinia ruckeri</i>				\bar{x}
	Repetición	1ra	2da	3ra	
	Identificación	Halos de inhibición (mm)			
<i>Lactobacillus sp.</i>	LP	19	20	20	19,7
	LG	17	19	18	18,0
	LD	18	17	19	18,0
<i>Bacillus sp.</i>	BS	15	13	17	15,0

4.2.2. Análisis estadístico

F calculada (0.05) = 7.16, grados de libertad = 3; probabilidad es 0.0118.

Considerando que $p < 0.05$ (0.0118), se rechaza la hipótesis nula. Por tanto, podemos concluir con la hipótesis alterna, la cual indica que: Bacterias nativas aisladas de “trucha arco iris” inhiben *in vitro* a *Y. ruckeri*.

Las cepas del género *Lactobacillus* (LP, LG y LD) son las que presentaron los mayores halos de inhibición; mientras que la cepa del género *Bacillus*; presentó antagonismo; pero con un espectro más reducido. La inhibición que produjo las cepas del género *Lactobacillus*, puede ser explicada, dado que las bacterias lácticas (BAL) tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), H_2O_2 o en algunos

casos bacteriocinas, como lo indicado por Maji *et al.* (2016). De esta forma, pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, como es el caso de *Y. ruckeri*.

Por otro lado, *Bacillus* poseen capacidades de adhesión e inmunoestimulación. Además, son capaces de producir péptidos antibióticos, aminoácidos, vitamina K y B₁₂ y enzimas (Bagheri *et al.*, 2008 y Gisbert *et al.*, 2014). Esto puede explicar el mecanismo por el cual, las cepas del género *Bacillus* inhibieron el crecimiento del patógeno *Y. ruckeri*. Por otro lado, Bagheri *et al.* (2008) y Adineh *et al.* (2013) reportaron que la suplementación con un probiótico comercial a base de *Bacillus* es beneficioso, sobre el crecimiento y sobrevivencia en alevines de trucha; pues estimula la maduración del sistema digestivo.

Abbass (2010) menciona que los probióticos o componentes de los probióticos son beneficiosos para el huésped para la protección contra la enfermedad, así mismo que los peces inoculados con probióticos, eran altamente resistentes a infección clínica por *Y. ruckeri*. Existen diversos reportes que señalan los efectos benéficos de administrar probióticos, como las bacterias aisladas en este estudio; para cultivo de peces. Por otra parte, Capkin y Altinok (2009), suministraron dietas con dos cepas probióticas (*Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis*) a “trucha arco iris” durante 60 días. Habiendo observado que la ingesta de bacterias probióticas se asociaba con la protección frente a una infección por el patógeno *Y. ruckeri*, adicionado en el agua el día 20 del ensayo, se observó que los peces tratados con los probióticos mostraron mortalidades menores al 1%, mientras en el grupo control la mortalidad alcanzó el 65%. Así mismo, Vendrell *et al.* (2008), trató a truchas arco iris durante 01 mes con dietas suplementadas de bacterias probióticas, utilizaron dietas con *Leuconostoc mesenteroides* o *Lactobacillus plantarum* y comparó con una dieta sin bacterias. Luego del tratamiento, realizó un desafío infectando las truchas por cohabitación con el patógeno *Lactococcus garviae*. La mortalidad de los peces disminuyó desde 78% para el grupo control, a 54 % para el grupo tratado con *L. mesenteroides*, y 46% para el grupo tratado con *L. plantarum*.

Vásquez *et al.* (2005), evaluaron la respuesta de cuatro patógenos comunes del lenguado (*Scophthalmus maximus*); los cuales pertenece al género *Vibrio*. Éstos fueron desafiados con nueve potenciales probióticos, y demostraron que los ácidos láctico y acético; y no las bacteriocinas, fueron capaces de inhibir estos patógenos. Por otro lado, Robertson *et al.* (2000), lograron la inhibición de la multiplicación de los siguientes patógenos *Aeromona hydrophyla*, *A. salmonicida*, *F. psychrophilum*, *P. damsela*, *S. milleri*, *V.*

anguillarum y *V. ordalii*, lo cual concuerda con resultados que obtuvieron Jöborn *et al.* (1997), en donde una cepa de *Carnobacterium*, fue capaz de inhibir a *A. salmonicida* y *V. anguillarum*.

Esta investigación es el primer estudio en nuestro país en aislar bacterias nativas del intestino de “trucha arco iris” (*O. mykiss*) y evaluar *in vitro* su potencial probiótico, contra el patógeno *Y. ruckeri*. Por lo descrito en el este trabajo, se encontraron buenos resultados. Lo cual, nos brinda una alternativa saludable y amigable con el medioambiente, frente al uso de antimicrobianos. Sin embargo, se requiere continuar con los estudios para conocer la microbiota presente en el tracto digestivo de la trucha, cultivada bajo las condiciones de nuestra región y de esta forma, aplicar la manipulación de la misma, en beneficio de la protección de nuestros alevines.

V. CONCLUSIONES

- Desde el tracto intestinal de la “trucha arco iris” (alevines y juveniles) se logró aislar bacterias nativas, que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*.
- Los tres aislados de *Lactobacillus* sp., (LP, LG, LD) inhibieron *in vitro* a *Y. ruckeri*, con halos promedios de inhibición de 19.7, 18.0 y 18.0 mm, respectivamente.
- El aislado de *Bacillus* sp., inhibió *in vitro* a *Y. ruckeri*, con un halo de inhibición de 15 mm.
- Se proyecta que la utilización de estos probióticos nativos, podrían mejorar la condición sanitaria de las truchas y, constituir una alternativa frente al uso de los antibióticos en la truchicultura peruana. Mejorando de esta forma, la inocuidad del producto final.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la prueba molecular confirmatoria, para identificar los aislados a nivel de especie.
- Evaluar otras características para ser consideradas cepas probióticas, tales como inocuidad, tolerancia a la bilis y pH entre otras.
- Realizar con estos aislados, el estudio *in vivo*, buscando estandarizar dosis, forma y tiempo de suplementación; sobre todo en alevines de “trucha arco iris”.
- Impulsar y promover estudios de investigación sobre la microbiota de “trucha arco iris”. De esta forma se podrá identificar bacterias y/o levaduras nativas con potencial probiótico que, brinden una alternativa de solución frente a los índices elevados de mortalidad en la truchicultura de la región. Además, se podrá disminuir el uso de antimicrobianos y sus efectos negativos en el medio ambiente y/o sistema de producción.

VII. REFERENCIAS

- Abasolo, F. (2015). *Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (Nodipenten subnodusus) y de la concha nácar (Pteria sterna) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos* (tesis doctoral). Centro de Investigaciones Biológicas del Noreeste, S. C., Baja California Sur, México.
- Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M., & Austin, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33, 31–37.
- Adineh, H., Jafaryan, H., Sahandi, J., & Alizadeh, M. (2013). Effect of *Bacillus* spp. probiotic on growth and feeding performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 16(1), 29-36.
- Arias, C. R., Olivares-Fuster, O., Hayden, K., Shoemaker, C. A., Grizzle, J. M., & Klesius, P. H. (2007). First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the U.S.A. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19, 35–40.
- AQUAHOY. (2011). Desarrollo de la acuicultura en el Lago Titicaca (Perú). portal de información en acuicultura. Recuperado de <http://www.aquahoy.com/156-uncategorised/14833-desarrollo-de-la-acuicultura-en-el-lago-titicaca-peru>.
- Austin, B., & Al-Zahrani, A. M. J. (1988). The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal Fish Biology*, 33, 1-14.
- Austin, D. A., Robertson, P. A., & Austin, B. (2003). Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 127–131.
- Bagheri, T., Hedayati, S., Yavari, V., Alizade, M., & Farzanfar, A. (2008). Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic during the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 43-48.

- Balcázar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, *114*, 173-186.
- Balcázar, J. L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., & Múzquiz, L. (2007). Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, *30*, 111–118.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., & Múzquiz, J. L. (2009). Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* Infection in Brown Trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology* *17*, 153–157.
- Berdasco, H. M. (2016). *Aislamiento y caracterización de cepas bacteriana productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura* (tesis de pregrado). Universidad de Oviedo, Gijon, Asturias.
- Bidhan, C., Meena, D. K., Behera, B. K., Pronob, D., Das Mohapatra, P. K., & Sharma, A. P. (2013). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-51.
- Bravo, S. & Kojagura, V. (2004). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, *24*(2), 104-108.
- Bueno, H. C. (2012). *Caracterización fenotípica y molecular de cepas de Yersinia ruckeri aisladas de Oncorhynchus mykiss, del centro piscícola “El Ingenio” – Huancayo*. (tesis de pregrado). Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and Fungi from fish and other aquatic animals*. Bentley, Australia: CABI.
- Bullock, G. L., Stuckey, H. M., & Shotts, E. B. (1978). Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *Journal of Fish Diseases*, *1*, 351-356.

- Burbank, D. R., LaPatra, S. E., Fornshell, G., & Cain, K. D. (2012). Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 1-8.
- Capkin, E., & Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1147-1153.
- Cordero, H., Ángeles, M., Cuesta, E., & Cuesta, A. (2014). Use of Probiotic Bacteria against Bacterial and Viral Infections in Shellfish and Fish Aquaculture. *INTECH. Sustainable Aquaculture Techniques*, 239-265.
- Cueva, V., Vargas, M., Mesías, F., Junis, J., Manchego, A., & Sandoval, N. (Noviembre 2016). Role of melano-macrophages in experimental vaccine-induced immunity against *Yersinia ruckeri* in *Oncorhynchus mykiss*. En L. M. Juarez (Presidencia), *LAQUA 16*, Lima, Perú.
- Deshmukh, S., Raida, M. K., Dalsgaard, I., Chettri, J. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2012) Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145, 379–385.
- Dulin, M. P., Huddleston, T., Larson, R. E., & Klontz, G. W. (1976). Enteric redmouth disease. *Univ. of Idaho, College of Forestry, Wildlife. and Range Sciences*, 8, 1-20.
- FAO y WHO. (2001). *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>.
- FAO. (2016). Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>

- FAO. (2017). Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Recuperado de http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es.
- Fernández, C. (2011). *Determinación de Yersinia ruckeri y sus características lesionales anatomo - histopatológicas en truchas Arco iris (Oncorhynchus mykiss) en etapa precomercial en una piscigranja de la región Junín* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Flores, K. (2013). *Determinación de la diversidad fenotípica de Yersinia ruckeri en aislados de truchas arco iris (Oncorhynchus mykiss) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica* (tesis de pregrado). Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Perú
- FONDEPES. (2004). *Manual de cultivo de "trucha arco iris" en jaulas flotantes*. Recuperado de http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manua_trucha_jaulas.pdf.
- Forouhandeh, H., Vahed, S. Z., Hejazi, M. S., Nahaei, M. R., & Dibavar, M. A. (2010). Isolation and phenotypic Characterization of *Lactobacillus* species from various dairy products. *Current Research in Bacteriology*, 3, 84-88.
- Furones, M. D., Rodgers, C. J., & Munn, C. B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 105-125.
- García, R., Gutierrez, L., & David, C. (2015). El uso de los probióticos en la industria acuícola. *Revista Alimentos Hoy*, 23(36), 165-178.
- Ghosh, K., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Characterization of Bacillus isolated from the gut of rohu, *Labeo rohita*, fingerlings and its significance in digestion. *Applied Aquaculture*, 12, 33-42.
- Gisbert, E., Castillo M., Skalli A., Andree, K. B., & Badiola, I. (2014). *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal Animal Science*, 91, 2766-2774.

- Hariati, A. M., Sudirdjo, Aulanni'am, Soemarno, & Marsoedi (2011). *The Effect of Consortia Bacteria on Accumulation Rate of Organic Matter in Tiger Shrimp, Penaeus Monodon Culture. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 1(12), 592- 596.*
- Henríquez, C. P. (2013). *Caracterización de propiedades probióticas de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos* (tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Huet, M. (1973). *Tratado de Piscicultura*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Ispir, U., & Dorucu, M. (2010). Effect of immersion booster vaccination with *Yersinia ruckeri* extracellular products (ECP) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *International Aquatic Research, 2, 127–130.*
- Ispir, U., & Dorucu, M. (2014). Efficacy of lipopolysaccharide antigen of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout by intraperitoneal and bath immersion administration. *Research in Veterinary Science, 97, 271–273.*
- Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, L. P. & Kjelleberg, S. (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *The Journal of Fish Diseases, 20(5), 383-392.*
- Keeme, J. L., Noakes, D. L., Moccia, R. D., & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research, 29, 89-101.*
- Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish y Shellfish Immunology, 21(5), 513–524.*
- Kumar, G, Menanteau-Ledouble, S, Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research, 46(103), 1-10.*

- Lakshmi, B., Viswanath, B., & Gopal, S. (2013). Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. *Journal of Pathogens*, 1-14.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. & Estante, E. G. (2015). Prospects of host associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol*, 45(1), 2-12.
- Maji, U., Mohanty, S., Mahapatra, A., Maiti, N. (2016). Diversity and Probiotic Potentials of Putative Lactic Acid Bacteria for Application in Freshwater Aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16, 805-818.
- Mamani, D. (2016). *Evidencia de Piscirickettsia salmonis y Yersinia ruckeri en truchas arco iris (Oncorhynchus mykiss) en cultivo de balsa jaula en el lago Titicaca en el distrito de Pomata departamento de Puno (Perú)* (tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2010). Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquaculture Nutrition*, 16, 496-503.
- Muñoz, E. (2015). *Caracterización y evaluación in vitro e in vivo de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (Scophthalmus maximus L.)* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Muthukumar, P., & Kandeepan, C. (2015). Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Organisms From Intestine of Fresh Water Fishes. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 4(3), 607-616.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553–1573.
- Newaj-Fyzula, A., Al-Harbi, A. H. & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture, *Aquaculture*, 431, 1-11.

- Palíková, M., Navrátil, S., Navrátil L., & Mareš J. (2015). Preventive and prophylactic measures in intensive salmonid fish breeding – A review. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 63(154), 1409-1416.
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, E. G. J., Subramaniyan, K., Manikkam, S., & Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture (review). *Drug Invent Today*, 5(1), 55–59.
- Panigrahi, A., & Azad, I.S. (2007). Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, 429-440.
- Pond, M., Stone, D., & Alderman, D. (2006) Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 261 (1):194–203.
- Rauta, P., Dhupal, M., & Nayak B. (2013) Screening and Characterization of Potential Probiotic Lactic bacteria isolated from vegetable waste and fish intestine. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 2(8), 234-244.
- RNIA. (2017). *Áreas prioritarias. Estadística y mercados. Producción*. Recuperado de http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=79.
- Robertson, P.A., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams, P., & Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185, 235–243.
- Rodgers, C.J. (2001). Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents *in vitro*. *Aquaculture*, 196, 325–345.
- Ross, A. J., Rucker, R. R., & Ewing, W. H. (1966). Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology*, 12, 763–770.
- Sandoval, N. (2015, Octubre). ¿Cuáles son los principales problemas sanitarios y de crianza en las especies acuícolas de piscigranjas del Perú? Mensual. Recuperado de <http://www.cmvl.pe/wp-content/uploads/2015/11/Revista-CMVL3.pdf>

- Schubiger, C. B., Orfe, L. H., Sudheesh P. S., Cain K. D., Shah D. H. & Call D. R. (2015). Entericidin Is Required for a Probiotic Treatment (*Enterobacter* sp. Strain C6-6) To Protect Trout from Cold-Water Disease Challenge. *Journals.ASM.org*, 81(2), 655-665.
- Sihag, R., & Sharma, P. (2012). Probiotics: The New Ecofriendly Alternative of Disease Control for Sustainable Aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(2), 72-10.
- Sirvas-Cornejo, S., Sánchez-Robinet, C., y Peña-Domínguez, C. (2011). Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 349-353.
- Sommer, F., & Backhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Review Microbiology*, 11, 227–238.
- Strom-Bestor, M., & Wiklund, T. (2011). Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *Journal of Fish Diseases*, 34, 255–264.
- Temprano, A., Riano, J., Yugueros, J., Gonzalez, P., de Castro, L., Villena, A., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2005). Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 28, 419–427.
- Tobback, E. (2009). *Early pathogenesis of Yersinia ruckeri infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum)* (tesis doctoral). Ghent University, Ghent, Belgium.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Van den broeck, W., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2010). *In vitro* markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, 33, 197-209.
- Tuan, T.N, Duc, P. M., & Hatai, K. (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 3(3), 89-97.
- Vásquez, J., González, M. P., & Murado, M.A. (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245, 149-161.

- Vendrell, D., Balcázar, J. L., de Blas I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., & Muzquiz, J. L. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 337–345.
- Villumsen, K. R., Neumann, L., Ohtani, M., Strm, H. K., & Raida, M. K. (2014). Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth disease (ERM) in rainbow trout. *PLOS One*, 9(4), 1-10.
- Walter, C. (2012). *Molecular studies on the fish pathogen Yersinia ruckeri* (tesis doctoral). Heriot Watt University, Edinburgh, Scotland.
- Wittwer, G. (2012). *Caracterización bacteriana de intestino de salmón del atlántico adulto* (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Zorriehzahra, M., Delshad, S., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., & Lazado, C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*. 1-15.

ANEXOS

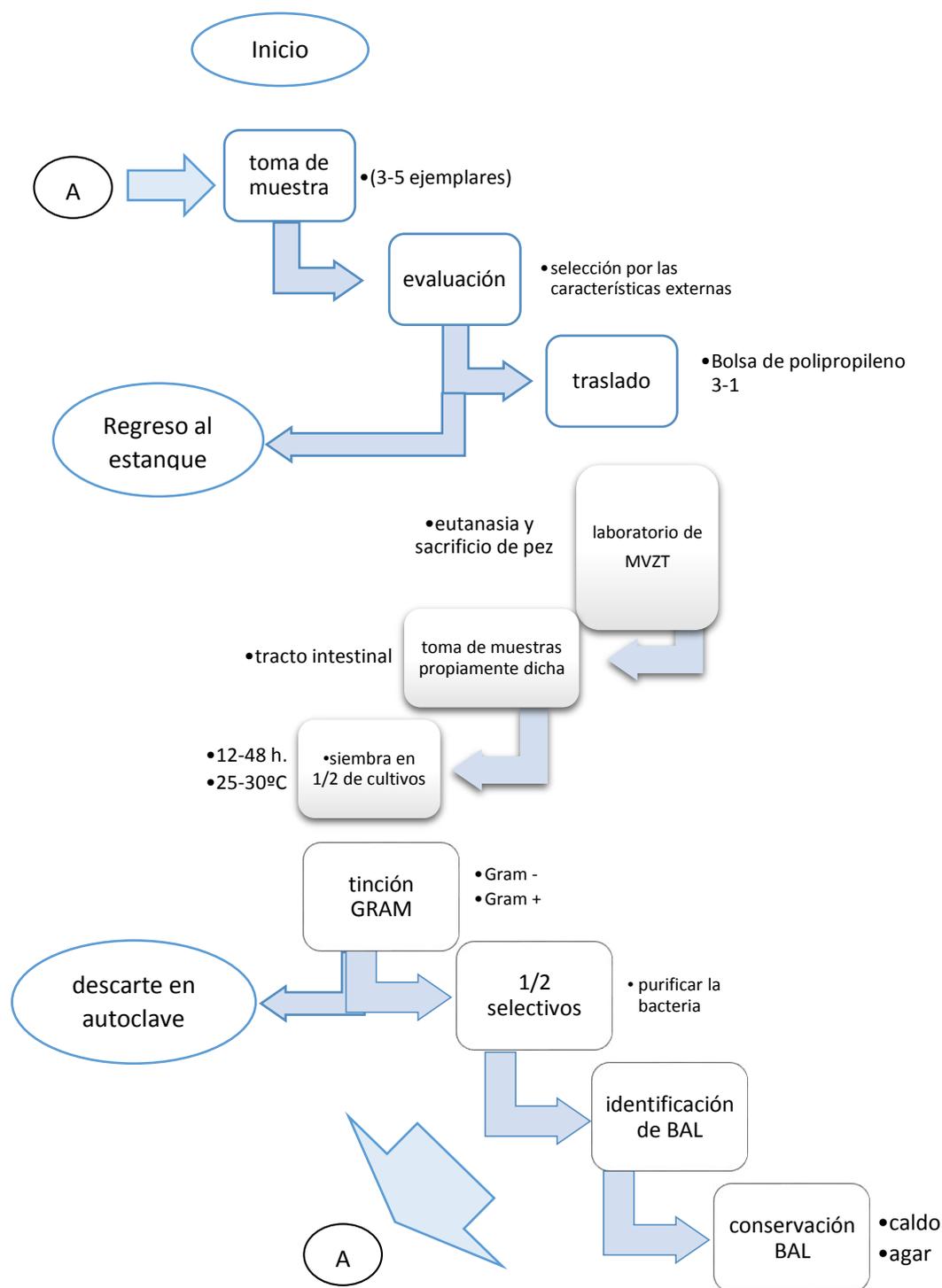


Figura 7: Flujograma del aislamiento e identificación de bacterias del intestino de la trucha (fuente: elaboración propia).

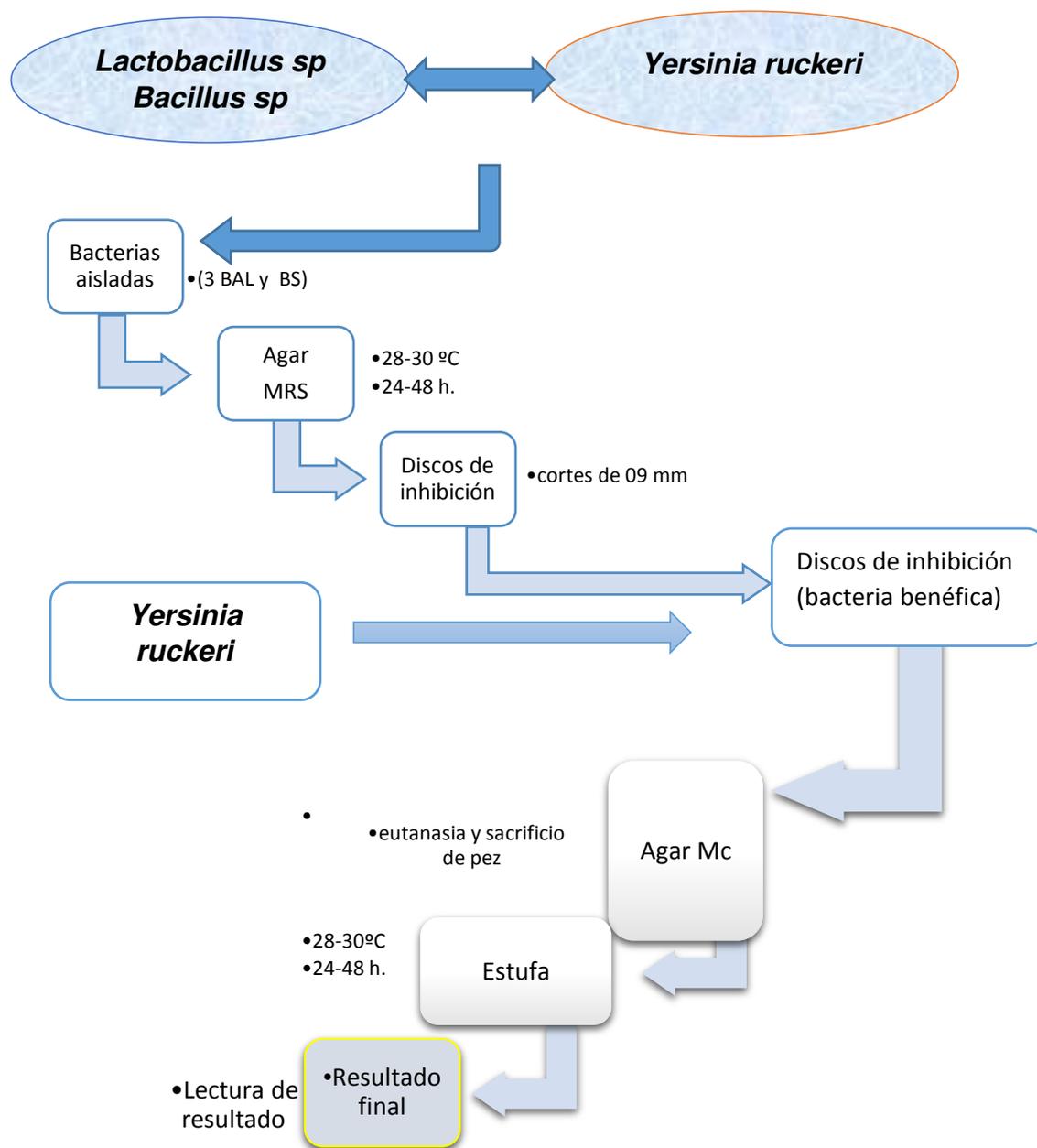


Figura 8: Flujograma de la evaluación in vitro el efecto inhibitorio de las bacterias aisladas del tracto intestinal de “trucha arco iris” *O. mykiss* frente a *Y. ruckeri* (fuente: elaboración propia).



Figura 9: Apertura de la cavidad celómica de la trucha, para la toma de muestra del intestino (Puno – enero 2017).



Figura 10: Observación macroscópica de las colonias obtenidas del intestino de la trucha (Puno - enero 2017).



Figura 11: Tinción Gram, para la observación al microscopio de bacterias (Puno – enero 2017)

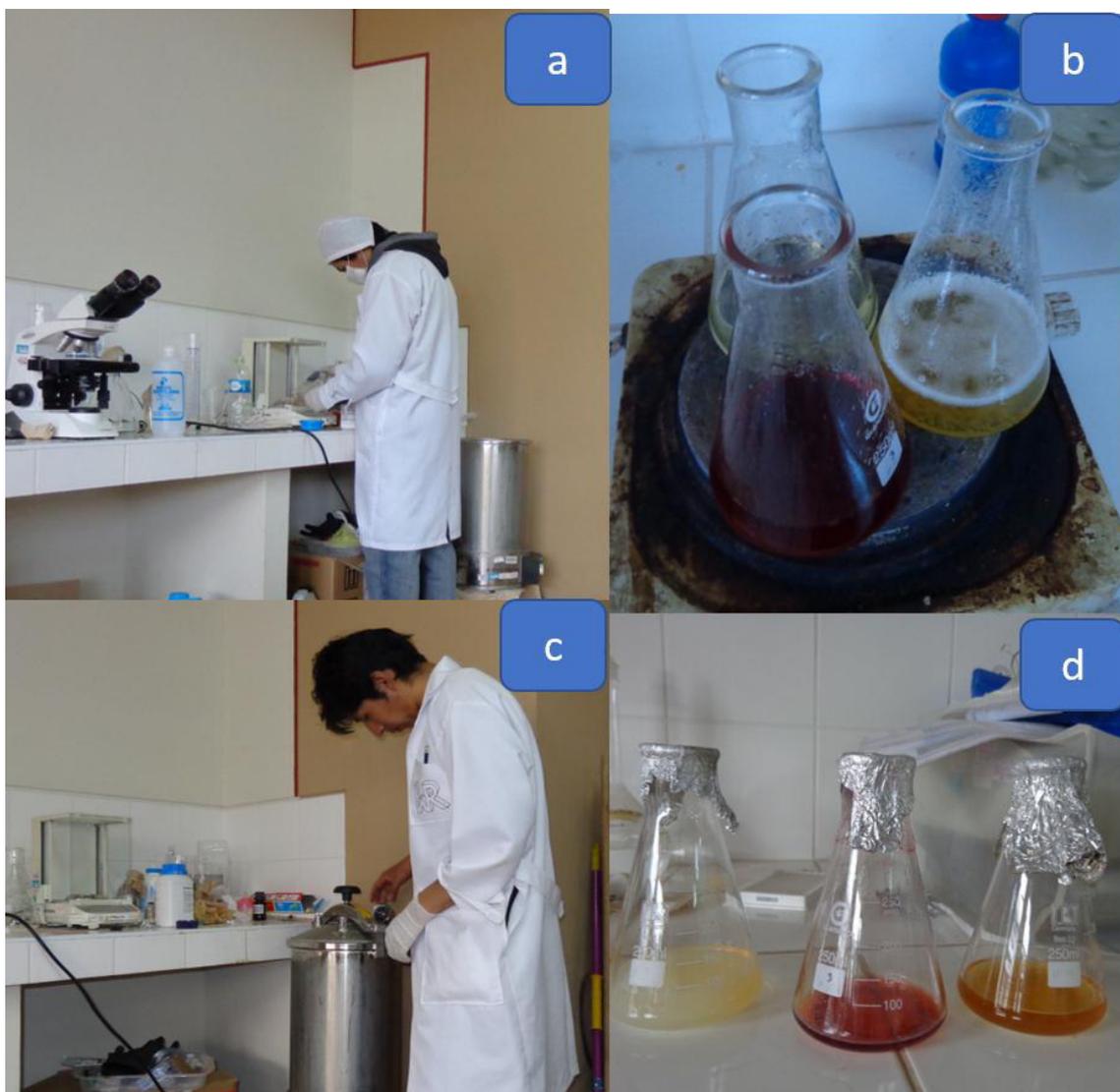


Figura 12: Pesado(a), dilución (b), autoclavado (c) y enfriamiento (d), de medios de cultivos (Puno-febrero 2017).



Figura 13: cortes de los discos de inhibición de 9 mm (Puno – abril 2017)

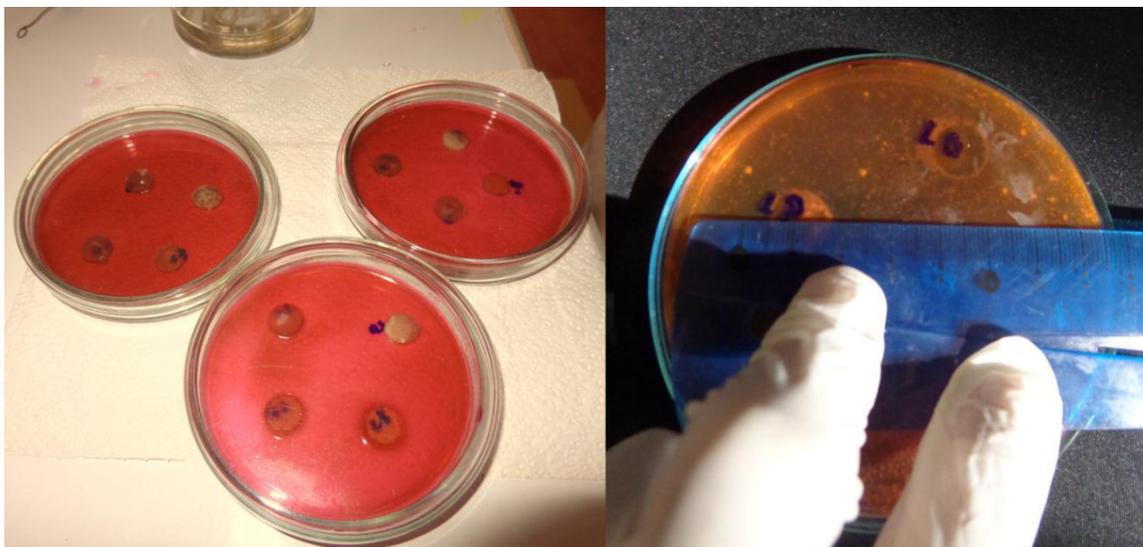


Figura 14: Lectura y medición del diámetro de los halos de inhibición (Puno – mayo 2017)

Tabla 3: Análisis de varianza y prueba de Tukey de halos de inhibición (Puno – agosto 2017).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halo Inh	12	0.73	0.63	7.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34.00	3	11.33	7.16	0.0118
Trat	34.00	3	11.33	7.16	0.0118
Error	12.67	8	1.58		
Total	46.67	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=2.36919

Error: 1.5833 gl: 8

Trat Medias n E.E.

BS	15.00	3	0.73	A
LG	18.00	3	0.73	B
LD	18.00	3	0.73	B
LP	19.67	3	0.73	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



CONSTANCIA DE DESARROLLO DE TESIS

EL QUE SUSCRIBE:, JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA VETERINARIA:

HACE CONSTAR:

Que el Bachiller en Biología **WILSON REINALDO QUISPE GALLEGOS**, ha desarrollado la parte experimental y pruebas de laboratorio; de la tesis intitulada "AISLAMIENTO DE *Lactobacillus* sp. DE "TRUCHA ARCO IRIS" *Oncorhynchus mykiss* CON POTENCIAL PROBIÓTICO FRENTE A *Yersinia ruckeri* EN PUNO"; en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano; la misma que se encuentra bajo mi jefatura.

Expido la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines correspondientes.



Dr. Mg., M.V. Alberto Ccama Sullca