



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE *Lactobacillus* sp CON POTENCIAL
PROBIÓTICO *IN VITRO* FRENTE A
PATÓGENOS DE TRUCHA ARCOIRIS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

KAROL GERALDINE QUEVEDO OLAYA

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR DE TESIS

Dr. Mg. MV. MARCOS ENRIQUE SERRANO MARTINEZ

Docente Asociado-Investigador de la Facultad de Medicina Veterinaria y

Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

COASESOR DE TESIS

Dr. MV. LUIS ANTONIO LLANCO ALBORNOZ

Doctor en Microbiología

Docente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad

Peruana Cayetano Heredia

DEDICATORIA

A mi *familia*, que siempre me ha apoyado en cada paso dado desde que inicie esta carrera, alentándome a ser mejor persona y mejor profesional.

A mi esposo *Alejandro* por su apoyo y sacrificio estos años para cumplir una de mis metas, a mi hija *Alejandra*, mi motivación, para seguir adelante y ser mejor como madre.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia por la gran experiencia vivida, a los docentes encargados por su sabiduría y experiencia brindada.

A los doctores de la Maestría en Sanidad Acuícola, por las clases impartidas, aquellos quienes fueron parte de este proceso de formación estos dos años.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar con el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 230-2015- FONDECYT-DE-PROMOCION 2.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION	4
III. MARCO TEÓRICO	6
IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	14
V. OBJETIVOS	16
VI. MATERIALES Y METODOS	17
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSIÓN	36
IX. CONCLUSIONES	44
X. RECOMENDACIONES	45
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
XII. ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Criterio para la caracterización del tipo de hemolisis.	21
Tabla 2 Cebadores del PCR usados en el estudio	26
Tabla 3 Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas seleccionadas frente a antibióticos utilizados en acuicultura.....	32
Tabla 4: Identificación a nivel molecular de las cepas con potencial probiótico.	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Análisis de comparación de medias de los aislados de <i>Lactobacillus</i> .	30
Cuadro 2: Cinética de crecimiento de la cepa B53.....	31
Cuadro 3: Halos de inhibición de las cepas probióticas frente a patógenos.....	33
Cuadro 4: Halo de inhibición producido por sobrenadante frente <i>A. salmonicida</i> usando el método de cilindro.	34
Cuadro 5 Halo de inhibición producido por sobrenadante frente <i>Y. ruckeri</i> usando el método de cilindro.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Visualización de amplificadores de las cinco cepas seleccionadas. Electroforesis en gel de agarosa 1.2%. C: control ATCC; B9, B15, B53, C1 y C2: cepas probióticas aisladas.	35
---	----

RESUMEN

A partir del intestino de truchas arcoíris, se obtuvieron más de 200 aislados bacterianos, de los cuales, 26 fueron confirmados como pertenecientes al Género *Lactobacillus*, después de las pruebas bioquímicas. En seguida se evaluó su capacidad probiótica, mediante pruebas *in vitro* como: formación de hemólisis; resistencia a sales biliares (0.3% p/v) y lisozima (5 UI); tolerancia a distintos pH (2.5 y 8), al estrés por calor (durante 4 h) y NaCl (2% p/v) y susceptibilidad a cinco antibióticos empleados en la industria acuícola (oxitetraciclina, eritromicina, ácido oxolínico, amoxicilina y florfenicol). Adicionalmente se evaluó su actividad antagónica frente a dos agentes patógenos de truchas. Solamente cinco de las cepas evaluadas mostraron características probióticas y la mayoría de ellas mostró sensibilidad a 4 de los antimicrobianos testados. Estas cepas, identificadas molecularmente como *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus sp*, inhibieron el crecimiento de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* patogénicas, mostrando potencial para su uso en acuicultura.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, probióticos, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, actividad antagónica, patógenos acuícolas

ABSTRACT

From rainbow trout intestine, more than 200 bacterial isolates were obtained, 26 of them were confirmed as belonging to genus *Lactobacillus*, after biochemical tests. Their probiotic capacity was evaluated in vitro by absence of hemolysis in blood agar; resistance to biliary salts (0.3% w/V) and lysozyme (5 IU); tolerance to pH (2.5 and 8), heat stress (for 4 h) and NaCl (2% w/V) and susceptibility to five antibiotics used in aquaculture industry (oxytetracycline, erythromycin, oxolinic acid, amoxicillin and florfenicol). Additionally, its antagonistic activity against two pathogens of trout was tested. Only five of all strains of *Lactobacillus* sp evaluated showed probiotic characteristics and most of them were susceptible to 4 of antimicrobials tested. These strains, identified molecularly as *Lactococcus Lactis* and *Lactobacillus* sp, inhibited growth of pathogenic *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri*, showing potential use in aquaculture.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, probiotic, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, antagonistic activity, aquaculture pathogens.

I. INTRODUCCIÓN

En el mundo, la pesca y acuicultura siguen siendo fuente importante de nutrición e ingresos y las especies de agua dulce, como la trucha y la tilapia, son responsables del aumento vertiginoso de la producción acuícola, representando un 60% de la producción total (FAO, 2016).

Asociado al crecimiento exponencial de la acuicultura, se han empezado a usar tecnologías más intensivas en los cultivos, esto, junto a la introducción de otras especies y cambios ambientales, han generado estrés y enfermedades en los peces. De hecho, las enfermedades de origen infeccioso son las que generan las mayores pérdidas económicas (Cruz, 2013).

Se vienen aplicando diversas estrategias para poder controlar las enfermedades que afectan a las especies de cultivo, como el uso de antibióticos de manera profiláctica en los estanques, pero las restricciones por el uso indiscriminado de estas drogas y la presión por una acuicultura sostenible han impulsado la búsqueda por otras alternativas para optimizar la producción sin ver afectado el medio ambiente. Por todo lo anterior, el uso de probióticos se perfila como una buena opción para el control de enfermedades (Acar *et al.*, 2000; Van den Bogaard, 2000)

En cuanto al desarrollo de la microbiota y la barrera intestinal se va dando con el transcurso del tiempo después del nacimiento. En las especies acuáticas, esta acción está mediada por el contacto del organismo con su medio ambiente, el tipo de

alimentación y secreción de hormonas, principalmente. Inicialmente la microbiota del intestino está conformada por especies facultativas, posteriormente, la modificación hacia una mayor proporción de anaerobios estrictos dependerá de la dieta de la especie, edad, ubicación geográfica, tratamiento con medicamentos, así como el bienestar del pez (Cahill, 1990; Isolauri *et al.*, 2001). Así mismo, a esta microbiota intestinal de los peces se le denomina autóctona, cuando los microorganismos son capaces de colonizar la superficie del epitelio intestinal del huésped, y se le denomina alóctona o pasajera si los microorganismos que se encuentran presentes en el medio que los rodea no logran permanecer dentro del intestino (Ringo y Olsen, 2003).

Actualmente es aceptado que los peces tienen una microbiota intestinal específica, que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta, por consiguiente, aislar microorganismos propios de los peces, favorece su utilización como probióticos (Burbank *et al.*, 2012; Henríquez, 2013) debido a que estos tienen un gran potencial de exclusión competitiva contra patógenos, debido a su mayor adaptación y afinidad por el mismo nicho ecológico (Bidhan *et al.*, 2013). Por todo esto, existe una mayor probabilidad que estos microorganismos nativos colonicen, se establezcan y multipliquen en el intestino del hospedador y, de esta forma confieran beneficios al huésped (Henríquez, 2013).

El uso de probióticos está bien establecido desde hace muchos años en humanos como animales de producción, principalmente con el uso de bacterias lácticas y levaduras. La introducción al sector acuícola ha ocurrido en los últimos años y se

incrementa cada vez más, esto debido a los efectos positivos que confieren al hospedero: potencian el sistema inmune, disminuyen el número de microorganismos patógenos y mejoran tasas de crecimiento. Así mismo, se ha demostrado que promueven la actividad de ciertas enzimas digestivas, permitiendo obtener mejores índices de conversión (Tovar *et al.*, 2008).

Los géneros de bacterias más representativos empleados como probióticos son las productoras de ácido láctico (BAL), entre ellos encontramos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; pero también *Saccharomyces* y *Enterococcus* (Rodríguez *et al.*, 2009).

De esta manera, los objetivos del presente estudio fueron aislar y caracterizar bacterias con potencial probiótico *in vitro* a partir de la microbiota intestinal de la trucha arcoíris y determinar su actividad antagónica frente a patógenos de esta especie acuícola en condiciones de laboratorio.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Las bacterias *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* son causantes de enfermedades que traen importantes pérdidas en la producción de trucha arcoíris, a raíz de esto se vienen usando diferentes sustancias químicas y antibióticas para controlar los agentes causales de enfermedad, pero las consecuencias de su uso son poco deseables, como la acumulación de estos residuos en la carne del pez, el desarrollo de la resistencia bacteriana y la contaminación del ambiente. (Shao, 2001).

Existen bacterias que se ha demostrado tienen un efecto benéfico (probiótico) sobre los peces; según Tovar *et al.* (2008) los beneficios en el campo de la acuicultura se resumen en: mejoras en la tasa de crecimiento, calidad del agua y el sistema inmunológico; inhibición de patógenos que afectan la producción, además de aportar beneficios nutricionales, entre otros.

A pesar de que existen reportes sobre el uso de organismos benéficos en otras especies de producción, su introducción a la acuicultura es reciente. Por tanto, es necesario contar con criterios específicos a la hora de seleccionar las bacterias que serán usadas como probióticos y así obtener el efecto deseado (Cruz, 2013).

Investigaciones recientes sugieren que los probióticos deben ser seleccionados específicamente de los hospederos en los cuales se va a utilizar, con el fin de minimizar diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos (Cruz, 2013)

Por todo esto resulta de gran importancia la obtención y caracterización de bacterias benéficas que ayuden a prevenir enfermedades de peces de importancia comercial y asegurar un producto inocuo y sin efectos negativos sobre la salud, el ambiente y cuya aplicación resulte sencilla y económicamente rentable.

III. MARCO TEÓRICO

El cultivo de organismos acuáticos para el consumo humano es una de las actividades con mayor crecimiento a nivel mundial. En particular, la trucha ha registrado un incremento sobresaliente los últimos años, siendo el departamento de Puno el mayor productor nacional, generando más de 32 000 toneladas al año (FAO, 2016).

El éxito de la acuicultura intensiva se ha acompañado por la aparición de enfermedades infecciosas, debido principalmente a las malas prácticas de manejo, constituyendo un factor limitante para su desarrollo a nivel mundial, en particular en la producción de trucha arcoíris (Staykov *et al.*, 2007).

En nuestro país los patógenos más prevalentes que afectan la truchicultura son las bacterias Gram negativas *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum*, reportadas en Puno, Junín, Cusco, Lima, entre otros departamentos (Hurtado, 2019; Mesías, 2019; Távara, 2018).

La sintomatología clínica que muestran los peces infectados por *Y. ruckeri* son letargia, anorexia, dificultad para nadar, exoftalmia, nado cerca de la superficie del agua, melanosis, abdomen abultado y heces blanquecinas o amarillentas (Kumar *et al.*, 2017)

Las lesiones macroscópicas que más se han observado son hemorragias petequiales en ojos (ipema), estómago, músculo lateral, vejiga natatoria, branquias, aletas dorsales, ventrales y anales, oscurecimiento y disminución del tamaño del riñón;

así como, hemorragias subcutáneas dentro y alrededor de la boca y garganta, las cuales le dan el nombre característico de Enfermedad de la Boca roja. Asimismo, el hígado y el bazo presentan un aumento de tamaño (Buchmann et al., 2003) Además, algunos animales presentan el estómago y los ciegos pilóricos con contenido mucoso claro, junto con intestinos de consistencia flácida y contenido acuoso rojizo. En casos crónicos, mayormente los peces manifiestan una descoloración grisácea del hígado (Barnes, 2011).

Por otro lado, la furunculosis es una enfermedad sistémica y ulcerativa, causada por cepas patogénicas de *A. salmonicida*, presentando un cuadro per agudo, agudo, 7 subagudo y crónicos (McCarthy, 1975). La enfermedad per aguda es común en peces jóvenes, que presentan la piel oscurecida y exoftalmia. La furunculosis aguda se manifiesta por septicemia general y los peces mueren sin lesiones detectables. Finalmente, la forma subaguda y crónica de furunculosis es más común en peces adultos y se caracteriza por la manifestación de lesiones externas como el oscurecimiento de la piel (melanosis), hemorragia de las aletas y el orificio anal, descamación epidérmica, exoftalmia y palidez branquial; lesiones internas como ascitis sanguinolenta, renomegalia, enteritis, petequias en las vísceras y esplenomegalia (González, 2002). Esta enfermedad produce elevada tasa de mortalidad en las truchas y la característica clínica que permite la identificación de la enfermedad son las lesiones ulcerosas que llegan a penetrar la musculatura, sin embargo, este signo clínico no siempre está presente (OIE, 2000).

Asimismo, estos patógenos expresan diferentes factores de virulencia (adhesinas, hemolisinas, citotoxinas y enzimas proteolíticas, por ejemplo) que causan severas

lesiones como hemorragia intestinal, esplenomegalia, abscesos, entre otros, disminuyendo la producción y generando elevada mortalidad (Beck *et al.*, 2015; Jung-Schroers *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se ha demostrado que estas bacterias muestran resistencia frente a varios de los antimicrobianos de uso frecuente en la acuicultura, incluyendo el florfenicol, amoxicilina, tetraciclina, ácido oxolínico y sulfa-trimetropin y que cargan los respectivos genes de resistencia a estas drogas, muchos de los cuales son transferibles, inclusive entre bacterias de diferentes géneros (Hurtado, 2019; León *et al.*, 2009; Mesías, 2019). El uso indiscriminado de antimicrobianos es un problema que dificulta el éxito terapéutico y aumenta los costos de producción, además de afectar la calidad del producto final y volverse rápidamente un serio riesgo para la salud pública y el medio ambiente por la aparición de bacterias multi drogo resistentes (Aich *et al.*, 2018).

Por estas razones, recientes investigaciones se están enfocando en la búsqueda de herramientas ecológicamente correctas para el control de patógenos infecciosos (Balcázar *et al.*, 2008).

Es conocido que la microbiota que coloniza el intestino las especies acuáticas puede albergar entre 10^7 a 10^{11} bacterias/gramo de heces, número muy superior al de las células de su hospedero (Taschuk y Griebel, 2012), sin afectar su salud. Se puede afirmar que existe una relación estrecha entre los microorganismos que integran esta microbiota y aquellas bacterias presentes en el medio acuático, algunas de las

cuales son integrantes habituales de la microbiota residente de muchas especies de peces, destacándose miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, entre otros (Ricaud *et al.*, 2018). Vale destacar que el establecimiento de esta microbiota es un proceso gradual y continuo, que es influenciado por los hábitos alimenticios del hospedero, la edad, estado de salud y exposición a sustancias como antimicrobianos, entre otros. Así, la microbiota presente en el tracto intestinal sufre varias modificaciones antes de establecerse como una población madura y definitiva que sea capaz de conferir protección al huésped contra los patógenos (Balcázar, 2008).

Como en otras especies de interés económico, la microbiota intestinal de la trucha arcoíris ha sido estudiada por métodos de secuenciación masiva, llegando a identificar a Proteobacteria, Firmicutes (que incluyó especies de *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*) y Actinobacteria como los Phylum predominantes (representando al menos el 97% del total de las poblaciones bacterianas) (Ricaud *et al.*, 2018) mientras que Bacteroidetes, Tenericutes, Gemmatomonadetes, Fusobacteria, Spirochaeta y Cyanobacteria estuvieron poco representados. Interesantemente estos mismos autores llegaron a asociar a algunas unidades taxonómicas operativas (OTU's) al estado corporal del hospedero (individuos con mayor infiltración grasa en músculo).

Debido a estos antecedentes, una estrategia interesante es la manipulación de la microbiota residente ya que esta modula positivamente la inmunidad innata (incrementando la actividad de fagocitos mononucleares y a través de la producción

de péptidos antimicrobianos y especies reactivas del oxígeno), estimulando el crecimiento de los tejidos linfoides asociados a mucosas, induciendo señales que estimulan la producción de citoquinas, la respuesta al estrés y brindando protección directa contra patógenos invasores, al inhibir su crecimiento mediante la producción de sustancias como bacteriocinas, por los productos finales de su metabolismo (ácido butírico, por ejemplo) o compitiendo por los recursos y sitios de colonización, mejorando de esta forma la resistencia a enfermedades (Merrifield et al., 2010). Este efecto benéfico también se extiende a la calidad del ambiente (oxigenación del agua y reciclaje de sustancias tóxicas como el amonio) donde crecen las especies acuáticas. Finalmente, al elevar la producción de enzimas digestivas, facilita el aprovechamiento de los nutrientes y favorece el incremento de la ganancia de peso, entre otros (Hoseinifar *et al.*, 2008).

Durante la última década se ha expresado mayor interés en la actividad funcional de algunas bacterias lácticas asociadas a las superficies epiteliales del tracto digestivo de los peces y como estas colonizan este aparato durante los primeros días de vida, mostrando ventajas para el hospedero, son consideradas como probióticos (Ringø *et al.*, 1995; Ringø y Gatesoupe, 1998). Balcázar *et al.* (2008), mencionan múltiples beneficios generados por la implementación de los probióticos autóctonos de peces, tales como la renovación de la microbiota intestinal, ser fuente de enzimas que favorecen el proceso de digestión de nutrientes y la eliminación de patógenos por competición.

El principal método practicado para reducir las poblaciones bacterianas indeseables sigue siendo la aplicación de quimioterapéuticos, pero su uso inadecuado fomenta la diseminación de la resistencia antimicrobiana y con ello enfermedades infecciosas más difíciles de controlar (Gullian *et al.*, 2004; Venkant *et al.*, 2004). En los sistemas intensivos de crianza se emplean alimentos que no siempre son los que los peces encuentran en su hábitat natural (aceites vegetales, por ejemplo) y las dietas suelen incluir niveles de nutrientes muy elevados de proteínas, los cuales tienen como objetivo favorecer la rápida ganancia de peso pero que pueden terminar afectando la composición y estabilidad de la microbiota residente (disbiosis), perjudicando la salud del pez (Ingerslev *et al.*, 2014). De esto se concluye que para controlar las interacciones huésped- bacteria- ambiente es imprescindible utilizar cepas con alto potencial colonizador, seguras, pero sobre todo con elevada capacidad de excluir patógenos que afecten la producción (Olafsen, 2001).

Algunos de los microorganismos clasificados como probióticos, mediante mecanismos de exclusión competitiva, han demostrado efectos benéficos para la salud de especies de importancia acuícola como la tilapia roja, latija japonesa, langostino tigre negro, langostino de pata blanca, el camarón y la trucha (Vine *et al.*, 2006; Hoseinifar *et al.*, 2018). Así, por ejemplo, especies de *Lactobacillus* han mostrado efecto antagónico contra *Pseudomonas fluorescens* y *Streptococcus iniae* en la tilapia nilótica (Aly *et al.*, 2008). Además, *Lactobacillus rhamnosus* ha demostrado reducción de la mortalidad asociada a infecciones causadas por *A. salmonicida* y *Edwardsiella tarda* en la trucha arcoíris y tilapia (Nikoskelainen *et al.*, 2001) mientras *Lactobacillus plantarum* mostró similar efecto contra

Lactococcus garvieae en la trucha (Vendrell *et al.*, 2008). En el mismo sentido, cepas de *Lactococcus lactis* protegieron a la paltija verde de la infección contra *Streptococcus iniae* activando el sistema inmune (Kim *et al.*, 2013).

Lactobacillus y *Lactococcus*, junto a *Bifidobacterium*, individualmente o asociados, están entre los géneros más ampliamente utilizados como probióticos acuícolas debido que se mantienen viables después del pasaje por el tracto gastrointestinal, a que su aplicación es muy segura y adicionalmente porque favorecen los parámetros productivos en diferentes especies (Van Doan *et al.*, 2017).

De igual modo, en el salmón atlántico, especies del género Carnobacteria, aisladas del intestino de este animal, mostraron experimentalmente efecto inhibitorio contra *A. salmonicida*, *Vibrio ordalii* y *Yersinia ruckeri* y estimularon de manera la respuesta inmune, sugiriendo que son varios los microorganismos autóctonos de peces que tienen potencial benéfico para estos (Robertson *et al.*, 2000).

En resumen, el uso de probióticos se perfila como una opción segura para disminuir el uso de antibióticos en la acuicultura y disminuir el costo asociado a vacunas e inmunoestimulantes en la producción de especies acuáticas (Balcázar *et al.*, 2008).

En la actualidad se conocen más de 20 géneros de microorganismos probióticos en el mundo, estos han sido aislados de diversas fuentes como: el tracto intestinal de humanos y animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Barboza *et al.*, 2004). De estos, la mayor parte pertenece al grupo de las bacterias ácido-

lácticas (BAL). Los grupos de BAL usadas en cultivos de peces, principalmente en larvas y primeros estadios de trucha y tilapia, son *Lactobacillus* y *Carnobacterium* (Forouhandeh *et al.*, 2010), además de algunas especies de los géneros *Vibrio* (*V. alginolyticus*), *Bacillus* y *Pseudomonas*; las cuales, si se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios al hospedero.

Lactobacillus sp son un grupo de microorganismos ampliamente usados de forma habitual en medicina veterinaria. Así, *L. lactis* y *L. fermentum* demostraron ser antagonistas de *Y. ruckeri*; debido a que redujeron la adhesión del patógeno al moco intestinal del pez. Asimismo, otros estudios reportan 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, así como menor proliferación del patógeno *Aeromonas salmonicida* en el intestino (Balcázar *et al.*, 2008).

Finalmente, podemos decir que el uso de probióticos en acuicultura es una práctica relativamente nueva comparada con otras especies de producción (mamíferos y aves, principalmente), puesto que poco se conoce sobre las especies de microorganismos con esta capacidad. Se requieren de estudios como este, que identifiquen cepas con capacidad probiótica, aisladas de las mismas especies que se serán beneficiadas y así implementar trabajos de investigación que permitan dar solución a los problemas de salud en los peces de interés comercial y que cuiden del medio ambiente (García *et al.*, 2015).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Durante los últimos años la acuicultura se ha convertido en una de las actividades con mayor crecimiento en el mundo. Nuestro país no es ajeno a este desarrollo y algunos departamentos, como Puno y Junín, se muestran como los principales productores de la trucha arcoíris, especie que ha visto crecer su producción en más del 700 % los últimos 10 años.

Sin embargo, y de forma paralela a este crecimiento, se ha observado un incremento del número y gravedad de enfermedades infecciosas, principalmente de origen bacteriano, destacándose la yersiniosis y furunculosis. Estas dolencias surgen debido a fallas en el manejo, la intensidad de producción, así como la inadecuada calidad del agua. Esto constituye un factor limitante para el desarrollo de esta actividad. Sumado a esto, el uso incorrecto e indiscriminado de antibióticos propicia la diseminación de la resistencia antimicrobiana, la cual se ha vuelto una seria amenaza para la salud mundial.

Por lo tanto, el uso de probióticos promete ser una alternativa eco amigable y eficaz frente a los tratamientos más convencionales, ya que se ha demostrado que su administración de forma regular es capaz de inhibir la proliferación de patógenos mediante mecanismos que provocan en el huésped un incremento de su respuesta inmune, así como la producción de sustancias antimicrobianas que los excluyen.

Lamentablemente, en nuestro medio aún son escasos los trabajos referentes al aislamiento y caracterización de bacterias con potencial probiótico, autóctonas del huésped, para ser utilizadas contra bacterias patógenas en la producción acuícola.

La presente investigación se enfocó en identificar y caracterizar aislados de *Lactobacillus* sp, oriundas de la trucha arcoíris cultivada en nuestro país (*Oncorhynchus mykiss*), que muestren efecto inhibitorio *in vitro* contra los principales patógenos que la afectan. Se seleccionó este género bacteriano debido a que ya ha sido aplicado con éxito en otras especies acuícolas, mostrándose seguro, eficiente en mejorar la producción, en reducir la incidencia de enfermedades y disminuyendo el uso de antimicrobianos.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias del género *Lactobacillus* con potencial probiótico *in vitro* frente a patógenos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar bacterias del género *Lactobacillus* sp presentes en el intestino de la trucha arcoíris.
- Evaluar *in vitro* la viabilidad frente a las condiciones de tránsito gastrointestinal y de seguridad (ausencia de actividad hemolítica y resistencia frente a antimicrobianos) de las cepas aislados de *Lactobacillus* sp.
- Evaluar *in vitro* la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* sp seleccionados sobre los principales patógenos, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*, de origen acuícola.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. Lugar de estudio

La colecta de muestras de la presente investigación se realizó en los departamentos de Junín (11°09'32" S, 75°59'34" O) y Lima (12°2'35.45" S, 77°1'41.66" O) durante los meses de enero a junio de 2018.

Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.2. Tipo de estudio

La investigación fue del tipo descriptivo, de diseño observacional y de corte transversal.

6.3. Población Objetivo

La población estuvo constituida por ejemplares de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en estadio juvenil y engorde (comprendido entre 150 – 200 g.) de sexo indistinto, con apariencia saludable y que no hayan sido tratados con antimicrobianos por lo menos 2 semanas antes del muestreo, provenientes de centros piscícolas de cultivo intensivo del departamento de Junín (centros Piscícolas de Comas, Jauja y Huancayo) y Lima (centro piscícola de Canta), los cuales fueron obtenidas a través de compras directas con los productores de forma personal (ver Anexo 1).

6.4. Tamaño de la muestra

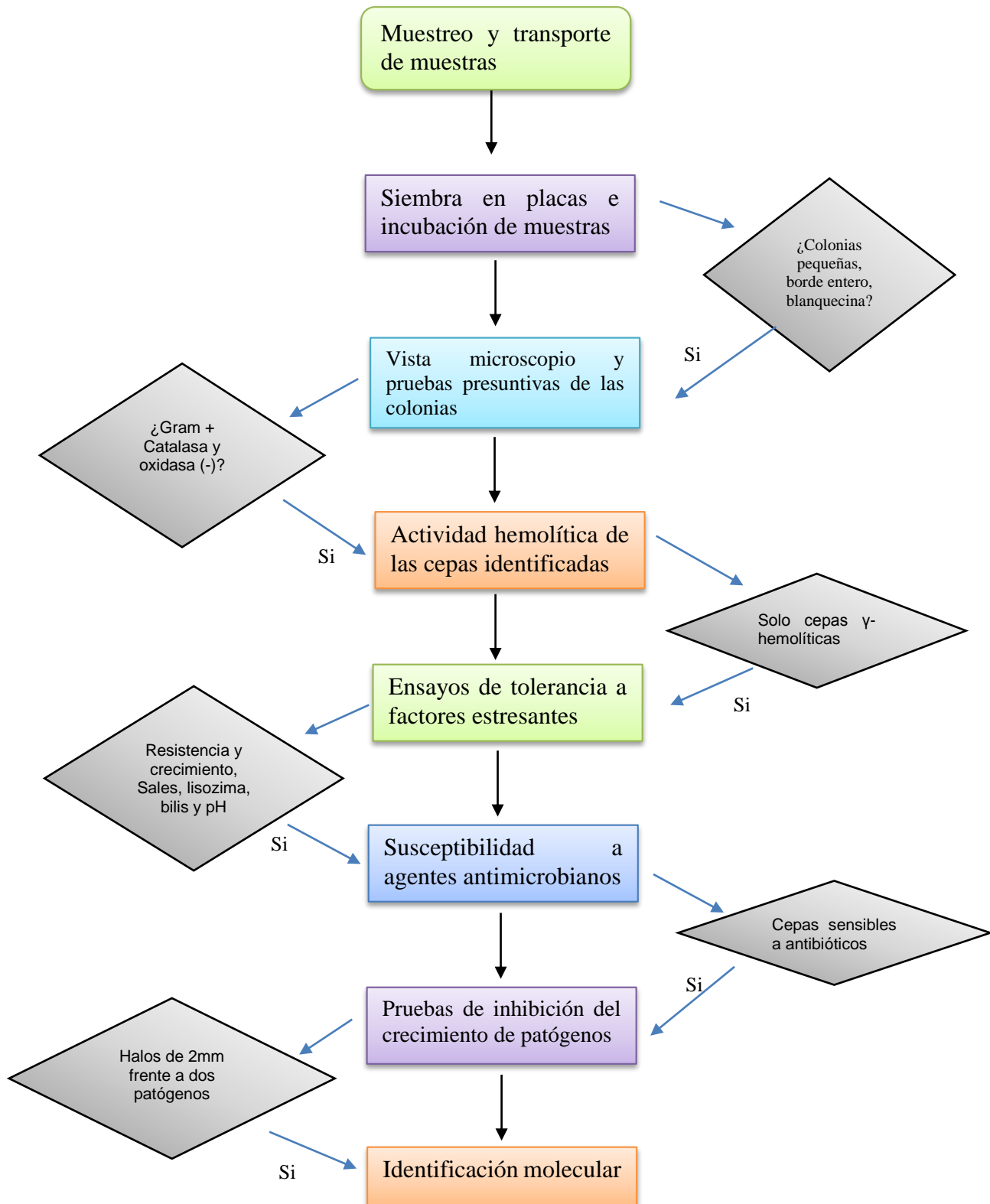
Se consideró un tamaño de muestra en función a estudios similares previos realizados por Gutiérrez (2016) y Quispe (2017), considerando un total de 30 peces. La colecta de peces se realizó de forma mensual y estos fueron sacrificados por inmersión en un balde de 20 litros que contenía el anestésico Tricaína (MS-222) a una concentración final de 150 mg/L por 15 min. (Araújo, 2014). Seguidamente, los especímenes fueron diseccionados asépticamente y las muestras de intestinos fueron transportadas en bolsas herméticas ziploc sobre hielo (8 a 12 °C) y colocadas en cooler para después ser enviadas, en menos de 12 h al laboratorio para su análisis

(Diagrama de flujo)

Los restos de peces fueron puestos en bolsas rojas y desechadas de manera segura en contenedores especiales para muestras biológicas.

Para la recolección de muestras microbiológicas, se realizó un corte en condiciones asépticas del intestino delgado, en la porción media posterior y se procedió a realizar un raspado en la mucosa del intestino con un asa microbiológica estéril. Posteriormente se hizo el sembrado por agotamiento en placas Petri con agar MRS (Man Rogosa y Sharpe, Merck) con una repetición en caldo MRS, para luego ser incubadas en una campana de anaerobiosis (Anaerocult, Merck-USA) a 35°C por 48 horas en una estufa (Lab Tech) (Araújo, 2014). Estas condiciones de cultivo fueron repetidas en todas las etapas de cultivo.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA



6.5. Identificación presuntiva de *Lactobacillus sp*

Transcurridas las 48 horas de incubación, se obtuvieron 200 colonias y fueron seleccionadas aquellas compatibles con el género *Lactobacillus*, utilizando criterios macroscópicos (colonias pequeñas, blanquecinas, borde entero y cremosas), microscópicos y pruebas primarias.

Para esto se realizó tinción Gram, observando su morfología en microscopio óptico (Zeiss), siendo seleccionadas aquellas colonias que resultaron Gram positivas y de forma bacilar. Luego se realizaron ensayos de catalasa y oxidasa, (negativa para ambas) (Gutiérrez, 2016). Aquellas que fueron compatibles pasaron a los ensayos de funcionalidad e inocuidad.

Dichas colonias seleccionadas se volvieron a incubar a 35° C en medio MRS por un tiempo de 24 a 48 horas, para obtener colonias puras. Finalmente, fueron conservadas en glicerol 15% v/v a -20°C, con replica en leche descremada estéril. Estas cepas sirvieron como stocks para los ensayos posteriores, para así evitar las resiembras y la pérdida de características de estas.

6.6. Actividad hemolítica de cepas aisladas

Este ensayo se realizó inoculando por agotamiento una colonia de cada aislado en placas Petri que contenían agar MRS con 5% v/v de sangre de cordero estéril, estos cultivos fueron incubados a una temperatura de 35°C durante 48 h en condiciones anaeróbicas mediante el uso de una jarra de anaerobiosis de 2.5 L, las cepas resultantes fueron caracterizadas según el grado de hemólisis (Tabla 1) que llegaron a producir (Rodríguez, 2009). Se seleccionaron las colonias que fueron gamma -

hemolíticas, ya que estas no representarán riesgo para los peces en posteriores ensayos de campo.

Tabla 1 Criterio para la caracterización del tipo de hemólisis.

α-Hemólisis	Rompimiento parcial de los glóbulos rojos, observándose zonas parcialmente claras alrededor de las colonias en el medio de cultivo.
β-Hemólisis	Rompimiento total de los Glóbulos rojos, observándose zonas claras alrededor de las colonias en el medio de cultivo
γ-Hemólisis	No hay rompimiento de Glóbulos rojos, no se observan zonas claras alrededor de las colonias

6.7. Pruebas *in vitro* de la capacidad funcional de los aislados

Los aislados que no presentaron hemólisis fueron evaluados *in vitro* para su actividad probiótica. Así, se cuantificó la resistencia a condiciones similares a las del pasaje por el tracto gastrointestinal (Dunne., *et al* 2001)

6.7.1. Resistencia a las sales biliares del intestino (0.3% p/v):

Según Noriega *et al.* (2006) para los ensayos de actividad probiótica, cada aislado fue activado en caldo MRS a 35°C durante 24 horas. Las cepas de estudio se ajustaron con un inóculo patrón de 5×10^8 (0.5 de la escala de Mc Farland). Por otra parte, se tomaron tubos de ensayo con 9 mL de caldo MRS enriquecidos con 0.3% p/v de sales biliares (pH 3) (Oxgall, Difco, EUA).

6.7.2. Resistencia al pH ácido del estómago y alcalino del intestino

(2.5 y 8.5 pH):

Se evaluó la tolerancia siguiendo el mismo procedimiento que el anterior. Se prepararon alícuotas de caldo MRS que fueron ajustados con ayuda de HCl o NaOH y midiendo con ayuda de un pH-metro hasta los valores de 2.5 y 8.5.

6.7.3. Resistencia a enzimas líticas (Lisozima 0.5 UI):

Se evaluó la tolerancia siguiendo el mismo procedimiento que el anterior. Para esta evaluación se preparó 9 mL de la enzima lisozima (sigma) a 0.5 mg/mL.

6.7.4. Tolerancia a medio salino. (NaCl 2% p/v):

Se evaluó la tolerancia siguiendo el mismo procedimiento que el anterior. La prueba se realizó utilizando caldos MRS a una concentración de 2% de NaCl p/v (pH 7).

Para todos los ensayos se utilizó el protocolo de Rodríguez (2009) e incluyó trabajar en microplacas ELISA de 96 pocillos donde se inocularon 150 μ L de caldo MRS de cada aislado seleccionado, con una concentración equivalente a 0.5 en la escala de Mc Farland y 150 μ L de cada substancia a evaluar (hechos previamente en tubos de ensayo); las condiciones de incubación incluían agitación constante a 37°C durante 4h. En todos los casos se realizaron controles en caldo MRS (pH 6.5) que permitieron determinar los valores de crecimiento de cada cepa.

Los resultados de densidad óptica obtenidos mediante el espectrofotómetro, a 620 nm, fueron tabuladas al inicio (T 0h) y final de cada ensayo (T 4h).

Para el análisis de los experimentos se utilizó un diseño por bloques completamente aleatorizados y se realizó mediante el programa Excel 2016.

6.7.2 Curva de crecimiento

Con el objetivo de evaluar la capacidad de recuperación de las bacterias después de estar en contacto con las sustancias descritas anteriormente, se procedió a realizar la medición de la curva de supervivencia durante 16 horas. Para esto, en una nueva microplaca se colocó 150 μ L de caldo MRS y 150 μ L de las bacterias desafiadas durante 4 horas, luego se incubó y tabuló la absorbancia a 620 nm cada 2 horas mediante espectrofotómetro, como se indicó anteriormente.

6.8. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos

El siguiente paso, luego de identificar a los microorganismos que lograron recuperarse de las condiciones estresantes descritas en el paso anterior, fue evaluar su susceptibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión en agar, según lo descrito por Gutiérrez (2016). Para este ensayo se emplearon: oxitetraciclina (30 μ g, Liofilchem), eritromicina (15 μ g, Liofilchem) ácido oxolínico (2 μ g, Liofilchem), amoxicilina (10 μ g, Liofilchem) y florfenicol (30 μ g, Liofilchem). A partir de cultivos de 24 a 48 horas en caldo MRS, las cepas seleccionadas se diluyeron en solución salina hasta obtener una turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland, como se describió anteriormente, luego fueron inoculadas con un hisopo estéril sobre la superficie de una placa con agar Mueller Hinton.

Los discos impregnados de antibióticos se colocaron en la superficie de la placa e incubaron durante 24 horas a 35 °C en condiciones anaeróbicas obtenidas con el uso de una jarra de anaerobiosis de 2.5 L (Anaeroculut, Merck). Como son escasos los datos sobre halos de inhibición para bacterias ácido lácticas, se considera los mayores a 2 mm como indicativo de sensibilidad (Salminen *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 2001).

6.9. Pruebas de inhibición del crecimiento de patógenos

Aquellas bacterias que se mostraron sensibles a los antimicrobianos testados fueron consideradas para determinar su efecto inhibitorio frente a patógenos de la trucha arcoíris. Para esto se reactivaron aislados que hacen parte del cepario del laboratorio de Parasitología – FAVEZ, los cuales incluyeron cepas patógenas de *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*. Estas bacterias fueron aisladas de lesiones en la piel, riñón anterior y bazo de animales con sintomatología clínica, tuvieron su antibiograma realizado (resistencia hasta a 5 antimicrobianos) y se identificó molecularmente los respectivos genes de resistencia (2 genes y mutaciones puntuales asociadas a los fenotipos identificados) (Mesías, 2019; Hurtado, 2019).

6.9.1 Ensayo de inhibición por contacto

El ensayo se realizó utilizando la técnica de difusión en agar (Montville *et al.*, 1999). Para esto, se tomaron seis discos de agar MRS de 6 mm de diámetro impregnados con las bacterias lácticas previamente sembradas, estas se colocaron sobre placas con agar Mueller Hinton inoculadas con las bacterias patógenas antes mencionadas; las placas Petri se incubaron a 35 °C durante 24 horas, después de

este tiempo se procedió a realizar la lectura de los halos formados. El tamaño del halo para determinar si hay inhibición se consideró como igual o superior a 2 mm.

6.9.2. Evaluación de la actividad bactericida del sobrenadante

Para esta prueba se centrifugó 1,5 mL de la bacteria láctica durante 15 minutos a 1000 rpm, cultivada durante 24 h bajo condiciones de anaerobiosis como se detalló anteriormente, a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, a 4 °C. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0,45 µM. La actividad bactericida se evaluó mediante el método modificado de difusión por cilindros sobre agar Mueller Hinton inoculado con las cepas patógenas. Se hicieron cilindros de 6 mm de diámetro usando una pipeta Pasteur estéril, sobre los cuales se añadieron diferentes cantidades del sobrenadante (50, 75 y 100 µL) durante un tiempo incubación de 48 horas a 35°C en anaerobiosis (Anaerocult, Merck). La inhibición fue determinada por el halo producido alrededor del cilindro (Jurado-Gámez, 2014).

Con la finalidad de seleccionar a las cepas que presenten mayor poder inhibitorio contra los patógenos para futuros ensayos *in vivo*, se seleccionaron aquellas cepas con actividad inhibitoria frente a menos un patógeno.

6.10. Identificación molecular de las especies de *Lactobacillus* seleccionadas

Se identificaron molecularmente aquellas colonias que sobrevivieron al desafío con las sustancias inhibitorias (bilis, diferentes pH, concentración de NaCl y lisozima), que se mostraron como inocuas (ausencia de hemólisis y de resistencia a antimicrobianos) y presentaron actividad antimicrobiana contra al menos uno de los

patógenos enfrentados. Para esto, se amplificó por PCR el gen que codifica la subunidad 16S rRNA (16S rDNA. Brevemente, se utilizó el DNA bacteriano total obtenido con el kit comercial Wizard Genomic DNA (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del DNA extraído fue verificado con equipo nanodrop (Thermo Fisher-USA). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL conteniendo 10 µL de Máster Mix 2x (Invitrogen, Brasil) en cual contiene 1.5 mM de ClMg, 0.5 U de Taq polimerasa y 2 mM de cada DNTP; 1 µL de cada cebador (10 pmol) y 2 µL de DNA purificado (60 ng/ µL).

Los cebadores específicos usados para la amplificación fueron los universales diseñados para procariotas 16sF 5'- CCTACGGGNGGCWGCAG - 3' y 16sR 5' GACTACHVGGGTATCTAATCC - 3' (Klindworth *et al.*, 2013) (Tabla 2). Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de desnaturalización (95 °C por 3 min), seguida de 25 ciclos de desnaturalización (95 °C por 30 s), alineamiento (55 °C por 30 s) y extensión (72°C por 1 minuto), terminando con un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min, en un termociclador (Mastercycler/Eppendorf, Alemania). El tamaño del amplicon esperado fue de 450 bp, como control positivo se utilizó la cepa de *Lactobacillus sp* ATCC 11146 y como blanco, agua libre de nucleasas (Sigma, USA).

Tabla 2 Cebadores del PCR usados en el estudio

CEBADOR	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS 5' - 3'	AMPLICON	REFERENCIA
16sF	CCTACGGGNGGCWGCAG	450 bp	Klindworth <i>et al.</i> , (2014)
16sR	GACTACHVGGGTATCTAATCC		

Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en 1% (p/v) en el gel agarosa (Cleaver Scientific, Reino Unido) y visualizados con el sistema de documentación MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel). El 100 bp DNA Ladder (Novagen, USA) fue utilizado como marcador de tamaño molecular. Los amplicones se purificaron mediante el uso del QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemania).

Los productos obtenidos de la purificación se cuantificaron en equipo Qubit (Thermo Fisher-USA) y enviaron al servicio de secuenciación Macrogen DNA (Corea) y las secuencias obtenidas se interpretaron por medio de los programas Bioedit y Blast.

Finalmente, la información se comparó con la base mundial de secuencias (Genbank). Sólo secuencias con similitudes superiores al 97% se consideraron significativas para la identificación bacteriana en el nivel de la especie (Poyart, 2000).

6.11. Plan de análisis de datos

Los resultados de las pruebas de laboratorio realizadas se trasladaron a una base de datos en Excel para su análisis estadístico descriptivo.

En las pruebas de actividad probiótica se realizó un análisis de varianza para verificar diferencia significativa en el crecimiento de los aislados después de las 4 horas de contacto con los analitos estudiados y la prueba de Tukey para comparación múltiple entre medias ($\alpha = 0,05$) para determinar cuáles de ellos presentaban mejores perfiles de resistencia.

6.12. Consideraciones éticas

Las muestras usadas en este estudio provienen de peces sanos y la investigación siguió lo establecido por El Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (Constancia 030-09-18).

VII. RESULTADOS

7.1. Identificación presuntiva de *Lactobacillus* sp

Se obtuvo 200 aislados a partir de las 30 muestras de intestinos de trucha arcoíris, de los cuales se seleccionaron 65, compatibles macroscópicamente con bacterias lácticas: colonias pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos (Ver anexo 2).

Se destacan 26 aislados compatibles con el género *Lactobacillus* (bacilos cortos Gram positivos) de los cuales solo 14 cepas pasaron las pruebas de catalasa y oxidasa. Finalmente, estas fueron conservadas en glicerol 15% v/v a -20°C para los ensayos posteriores (ver Anexo 3).

7.2. Actividad hemolítica

Los resultados de esta prueba demostraron que solo 10 de las 14 cepas usadas no generaron ningún tipo de hemólisis, puesto que no se observó ningún halo transparente en las líneas de inoculación después de 24 horas de incubación.

7.3. Pruebas *in vitro* de la capacidad funcional de los aislados

El análisis de varianza para *Lactobacillus*, evidenció que hubo diferencia estadísticamente significativas entre el crecimiento de los aislados cuando fueron sometidos al efecto de los analitos, $p < 0,05$ (Anexo 5)

Los resultados de las prueba de Tuckey para la comparación de medias, se muestran en el cuadro 1, donde se confirman que cinco aislados presentaron diferencias estadísticamente significativas, con respecto a las otras cepas.

Cuadro 1 Análisis de comparación de medias de los aislados de *Lactobacillus*

Grupos	Promedio	Diferencia
B9	0.2682	*
B15	0.2888	*
B53	0.3024	*
C1	0.3448	*
C5	0.2884	*

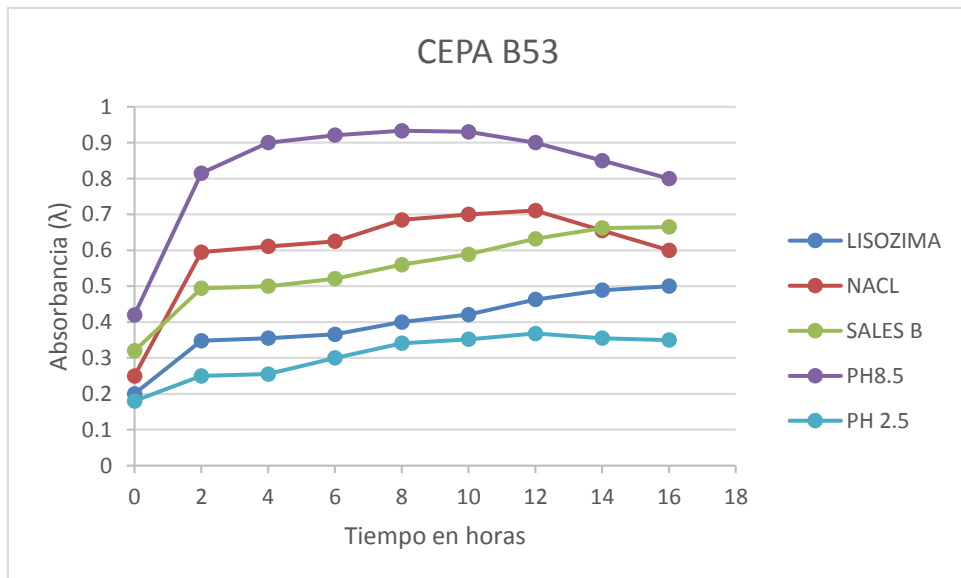
Los aislados que presentaron diferencias significativas en las pruebas de tolerancia, fueron seleccionados para realizar los estudios posteriores.

7.4. Curva de crecimiento

Se puede observar la capacidad de recuperación de las cepas expuestas a las sustancias evaluadas después de 4 horas (ver Anexo 4). Aquí se destaca al aislado B53, que muestra las curvas de supervivencia más pronunciadas durante las primeras 10 horas, evidenciando su capacidad de recuperación al efecto de las sales, NaCl 2%, pH 2,5, pH 8,5 y lisozima 5 UI (cuadro 2), situación que no ocurrió en

las cepas B9 y C5, donde se observa que no se recuperan al efecto del pH alcalino y sales biliares.

Cuadro 2: Cinética de crecimiento de la cepa B53



7.5. Susceptibilidad a frente a agentes antimicrobianos

Apenas cinco cepas fueron seleccionadas, después de estar en contacto con las sustancias inhibitorias anteriormente mencionadas, por su capacidad de recuperación. Con ellas se llevó a cabo la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana usando cinco antibióticos comerciales usados ampliamente en acuicultura (Tabla 3)

En todas las pruebas realizadas, los halos fueron superiores a 19 mm, indicando que todas bacterias probióticas fueron sensibles a los antimicrobianos evaluados, con excepción del ácido oxolínico, que presentó resistencia en todas las cepas estudiadas.

Tabla 3 Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas seleccionadas frente a antibióticos utilizados en acuicultura

CEPA	Amoxicilina 10µg	Eritromicina 15 µg	Oxietraciclina 30 µg	Ácido oxolinico 2 µg	Florfenicol 30 µg
B9	S	S	S	R	S
B15	S	S	S	R	S
B53	S	S	S	R	S
C1	S	S	S	R	S
C5	S	S	S	R	S

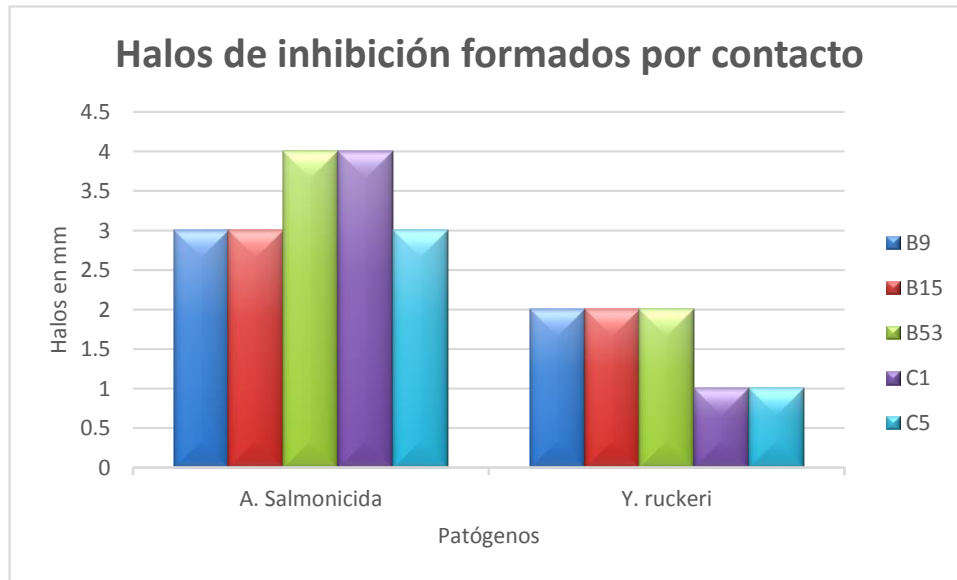
7.6. Pruebas de inhibición del crecimiento de patógenos

7.6.1 Ensayo de inhibición por contacto

A las mismas cinco cepas seleccionadas en el párrafo anterior por presentar los mejores perfiles probióticos *in vitro*, actividad hemolítica y sensibilidad a antibióticos se les realizó los ensayos de inhibición frente a los dos patógenos de mayor importancia en la producción de truchas: *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, facilitados por el laboratorio de Parasitología FAVEZ-UPCH. Estos microorganismos provienen de casos clínicos nacionales diagnosticados en el laboratorio y fueron seleccionados por que generan infecciones de importancia en acuicultura.

En el cuadro 3 los resultados muestran que la bacteria patógena más sensible a los probióticos fue *A. salmonicida* con halos entre 5 y 6 mm, mientras que en los ensayos frente a la bacteria *Y. ruckeri* los halos oscilaron entre 1.5 y 2 mm. Las cepas probióticas que mostraron mayor actividad bactericida fueron B53 y C1 con halos de 4 mm.

Cuadro 3: Halos de inhibición de las cepas probióticas frente a patógenos

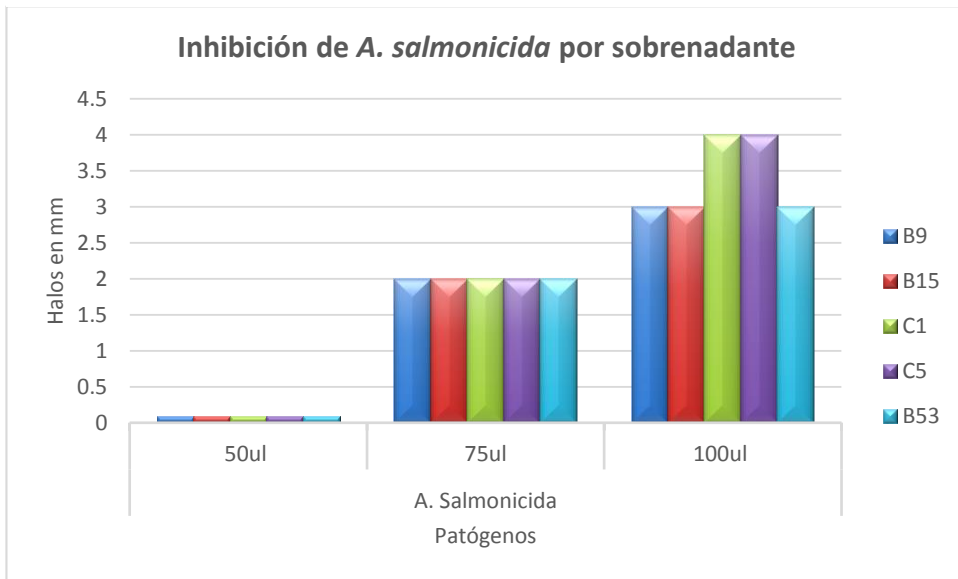


7.6.2 Evaluación de la actividad bactericida del sobrenadante

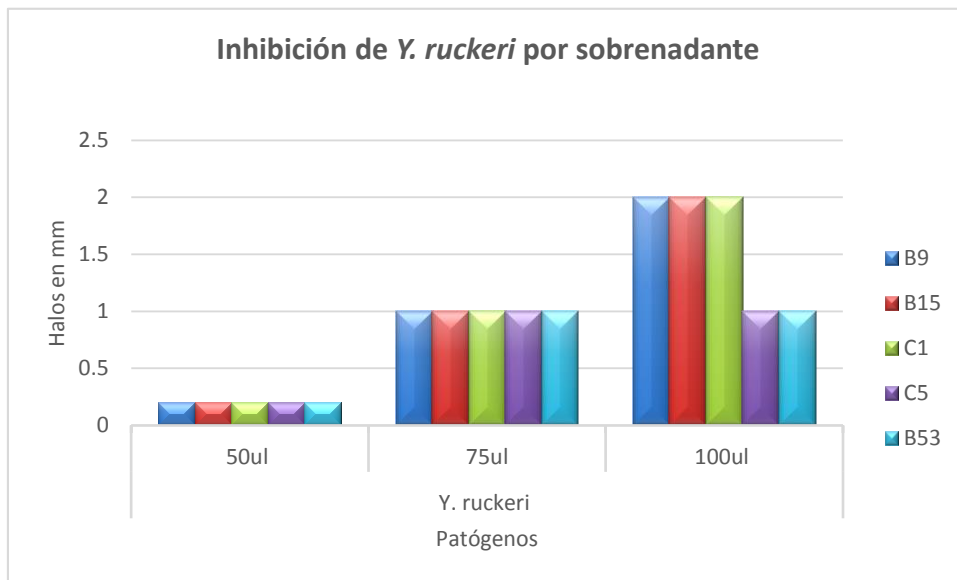
Los resultados obtenidos muestran que el patógeno más susceptible frente a la acción de los probióticos evaluados fue *A. salmonicida*, presentando considerables halos de inhibición, con un tamaño de hasta 4 mm (cuadro 4); también se observó efecto antagonista fue contra el patógeno *Y. ruckeri* con halos de 2 mm solo en las cepas B9, B15, C1 (Cuadro 5).

El empleo de los sobrenadantes reveló que con cantidades de 75 μL y 100 μL si se presenta inhibición clara frente todos los patógenos formando halos desde 2 a 4 mm, mientras que con cantidades de 50 μL no se observó este efecto en ningún caso.

Cuadro 4: Halo de inhibición producido por sobrenadante frente *A. salmonicida* usando el método de cilindro.



Cuadro 5 Halo de inhibición producido por sobrenadante frente *Y. ruckeri* usando el método de cilindro.



7.8. Identificación molecular de las especies de *Lactobacillus* seleccionadas

Utilizando PCR, se observó un amplicón del tamaño esperado (450 pb) (figura 2) en todas las cinco cepas que pasaron las pruebas de caracterización probiótica.

Los análisis de secuenciamiento permitieron identificar las cepas como *Lactobacillus* sp y *Lactococcus lactis* (Tabla 4).

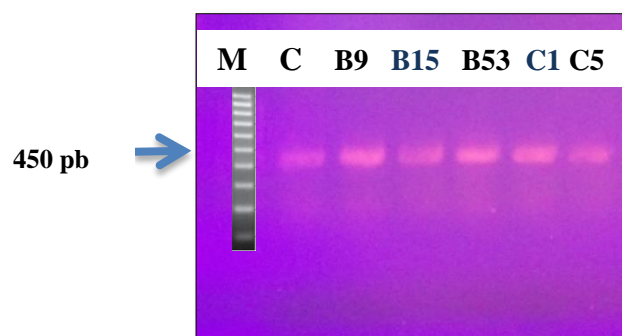


Figura 1 Visualización de amplicados de las cinco cepas seleccionadas. Gen amplificado 16S rRNA (16S rDNA). Electroforesis en gel de agarosa 1.2%. C: *Lactobacillus* sp ATCC; B9, B15, B53, C1 y C2: cepas probióticas aisladas.

Tabla 4: Identificación a nivel molecular de las cepas con potencial probiótico

BACTERIA	CEPA IDENTIFICADA	% DE IDENTIFICACION
B9	No se logró identificar	*
B15	<i>Lactobacillus</i> spp.	96.69
B53	<i>Lactococcus lactis</i>	99.79
C1	<i>Lactococcus lactis</i>	99.79
C5	<i>Lactococcus lactis</i>	100

* La muestra no se logró identificar

VIII. DISCUSIÓN

En esta investigación se aislaron bacterias con potencial probiótico, propias de la microbiota intestinal de truchas arcoíris. Cuatro de las cinco bacterias obtenidas fueron identificadas a nivel molecular como *Lactobacillus* sp y *Lactococcus lactis*. Nuestros resultados coinciden con los reportados por otros investigadores, como Quispe (2017), que aislaron especies del género *Lactobacillus* y *Bacillus* en intestinos de trucha arcoíris, así también como los reportados por Gómez-Gil (2000) y Balcázar (2008), que también identificaron *Lactobacillus* (y otras bacterias como *Bacillus* y *Micrococcus*) a partir del tracto intestinal de peces de agua dulce.

Burbank (2012) aisló más de 300 cepas bacterianas, del intestino de trucha arcoíris, obteniendo al final 16 cepas que fueron candidatas a probióticos. Por otro lado, Gutiérrez (2016) reportó predominancia de cepas del género *Bacillus*, *Lactococcus lactis* y en menor cantidad *Lactobacillus delbruecki* en la microbiota del intestino de tilapia.

En este estudio, la especie *L. lactis* fue aislada en el intestino de trucha, lo cual coincide con otros estudios realizados en salmónidos, carpa dorada, carpa común y bagres donde esta bacteria hace parte de la microbiota residente y frecuentemente aislada (Hagi *et al.*, 2004).

Araújo y colaboradores (2016), analizando la microbiota intestinal de salmónidos en etapa de crecimiento, reportaron que los géneros más frecuentemente encontrados fueron *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* sugiriendo que

algunas especies de estos géneros podrían ser candidatos probióticos a ser usados en acuicultura.

La presencia de estas bacterias en el medio acuático ha sido asociada a reducción en la mortalidad, mejora la resistencia frente a patógenos del medio, así como de la calidad del agua. Es así como Balcázar *et al.* (2014), reportaron en su estudio la elevada presencia de bacterias del genero *Lactobacillus* en poblaciones sanas de trucha arcoíris después de presentarse una epidemia de furunculosis. Lo cual nos indica que la presencia de estas bacterias mejora el sistema inmune del pez y por tanto la salud en general del huésped.

El presente trabajo aisló cepas de bacterias propias del intestino de trucha arcoíris, obteniendo 200 aislados. La importancia de aislar cepas nativas es que existe más probabilidad que los probióticos potenciales resistan el paso del trato digestivo y lleguen a colonizar la última parte del intestino (Balcázar, 2008). Asimismo, trabajos realizados por Verschuere en el 2000, con microorganismos probióticos en acuicultura, recomienda que los microorganismos aislados sean de la propia especie en las que se va a probar, o del agua circundante.

De las 14 cepas seleccionadas, 10 resultaron ser no hemolíticas (no se observó halo transparente alrededor de la siembra), este resultado es compatible con lo descrito por Gutiérrez (2016), ya que las bacterias pertenecientes al grupo de las ácido-lácticas no son patógenas y por consiguiente no poseen hemolisinas que destruyan las células rojas, y que al ser administradas como posibles probióticos en peces, no presenten ningún problema.

Los resultados obtenidos de la resistencia frente a lisozima, sales biliares y pH, permitieron seleccionar cepas con capacidad probiótica y que cumplan con los exigidos por Guidelines for evaluation of probiotics in Food (2002).

Los resultados de la resistencia de estas cepas a cada uno de estos ensayos se evaluaron a partir de lecturas ópticas de las densidades de crecimiento obtenidas, dando como resultado un crecimiento después del contacto, comparándolas con el control inicial de cada ensayo. Hay que resaltar la importancia de disponer con controles del para cada una de las pruebas.

La presente investigación evaluó dichas características *in vitro*, para tener seguridad de su uso posterior a nivel *in vivo*; a comparación con otros trabajos similares como el de Quispe (2017), que solo identificó cepas de intestino de trucha arcoíris a nivel microbiológico y bioquímico, sin pasar por estos ensayos que son preliminares esenciales para seleccionar microorganismos con potencial probiótico.

Si bien las mediciones con espectrofotómetro no diferencian entre bacterias vivas y muertas, es de suponerse que aquellos aislados que muestren incremento en sus lecturas, luego del cese de las condiciones estresantes, pueden ser considerados como tolerantes ya que consiguieron multiplicarse.

Los resultados obtenidos en este estudio, mediante mediciones positivas de la curva de crecimiento realizada durante 16 horas, indican la capacidad de recuperación de nuestras diez cepas a los mismos desafíos. Respecto a la capacidad de sobrevivir a estas condiciones hostiles, Gardiner *et al* (2005) sugieren que, por lo menos frente a los ácidos del estómago, la matriz de alimentos podría protegerlos.

Adicionalmente, Estela *et al* (2007) y Cueto-Vigil *et al* (2010), indican que la resistencia a estos factores ambientales, en especial el pH ácido, varía entre cepas de origen bucal e intestinal y que esto se debe en parte a que el producto final de su metabolismo incluye ácidos como el láctico y propiónico.

Nuestros datos nos llevan a suponer que, si los microorganismos probióticos identificados fueran suministrados a peces junto con el alimento, algunas de estas bacterias lácticas tienen el potencial de mantenerse viables luego del pasaje por el tracto gastrointestinal, ya que se mostraron tolerantes a condiciones de acidez y alcalinidad similares a las encontradas en este ambiente.

Los probióticos ejercen sus efectos benéficos, principalmente a nivel del tracto gastrointestinal, de ahí que muchos de los modos de administración desarrollados estén dirigidos a incrementar su estabilidad y facilitar su asimilación. La adición de los probióticos en la dieta es una de las formas más empleadas (Shen *et al.*, 2010)

Erkkilä y Petäjä (2000) reportaron que la concentración crítica de resistencia de las bacterias a sales biliares era de 0.3% a 1.3%, parámetro de importancia si los probióticos son suministrados por vía oral. La capacidad para sobrevivir en presencia de bilis de peces se ha identificado como una característica importante para el potencial de sobrevivir en el tracto gastrointestinal debido a las propiedades antimicrobianas de la bilis (Balcázar *et al.*, 2008). Por otro lado, otros autores como Nikoskelainen *et al.* (2001) utilizaron bilis de buey a una concentración de 5 y 9% para determinar la sensibilidad a esta.

Es este estudio las cepas seleccionadas cumplieron con esta condición a una concentración de 0.3%, simulándose como el paso del alimento a través del tracto gastrointestinal, después de la permanencia de las bacterias en caldo MRS durante 4h. Se observó que las cepas no fueron afectadas por la concentración de sales biliares, así como a enzimas y NaCl ya que el número de bacterias aumentó en concentración partiendo de una concentración inicial de 0.5 Mc Farland.

La capacidad que manifiestan algunas cepas a la resistencia a los antibióticos, es un criterio determinante y restrictivo para ser seleccionado como posible probiótico.

En relación a las cinco cepas seleccionadas como posibles probióticos, se mostraron sensibles frente a todos los antibióticos evaluados esto sugeriría que estas cepas no transmitirán mediadores de resistencia antimicrobiana hacia el huésped. Estos resultados concuerdan con Gutiérrez (2016) y Zhou *et al.* (2005), donde indican que *Lactobacillus sp* y Bifidobacterias son sensibles frente a estos antibióticos.

Aunque no hay medidas específicas en cuanto al halo de inhibición propio de *Lactobacillus* frente a antimicrobianos en acuicultura, trabajos similares con probióticos sugieren un tamaño de halo igual o mayor a 2mm (Salminen et al., 1998; Zhou et al, 2005)

Finalmente podríamos comentar que en *Lactobacillus sp* los mecanismos que confieren resistencia frente al ácido oxolínico no están asociados a algún elemento genético móvil por lo que el riesgo de transmisión al huésped es mínimo (European Food Safety Authority, 2008; Coppola *et al.*, 2005).

Por otro lado, una de las características que nos facilitó la selección de cepas que puedan ser consideradas como potenciales probióticos, es su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, no deseables en el organismo del pez ni en el agua. Es dicho sentido, este trabajo llevó a cabo ensayos con el fin de evidenciar la posible capacidad de inhibición de las cepas aisladas del intestino de trucha arcoíris, ya que con esto se cumpliría con los requisitos de selección ya establecidos previamente.

Gutiérrez en 2016, aisló bacterias lácticas de intestino de tilapia y observó los efectos del extracto frente a *Aeromonas veronii* con halos de inhibición de hasta 35mm. En esta misma investigación se encontró que los extractos bacterianos presentaron halos de inhibición frente a *A. salmonicida* y *Yersinia ruckeri* con halos de 4 mm y 2 mm respectivamente.

Por otro lado, Leyton (2015) trabajando con sobrenadantes de *Pseudomonas* sobre la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* obtuvo efecto antipelículas de 18 aislamientos de 67 iniciales. Ciertamente se ha demostrado aquellas sustancias que las bacterias probióticas expulsan presentes en el sobrenadante, les sirven para comunicarse con su entorno e interactuar con otras bacterias.

Las cepas presentaron actividad inhibitoria frente a *A. salmonicida* y *Yersinia ruckeri* después de 48 h de incubadas, momento en el cual estas alcanzan la fase exponencial de crecimiento y por tanto su capacidad de sintetizar enzimas, proteínas y otras sustancias atinge su máximo nivel.

Estos resultados inhibitorios del crecimiento de los patógenos se deben probablemente a la producción de sustancias con actividad antibacteriana propios de bacterias lácticas, que se citan en investigación anteriores incluyendo ácidos orgánicos, nicinas, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (Morace, 1986).

Estas sustancias son activas frente a una amplia gama de bacterias y levaduras, que en conjunto logran limitar la colonización de una microbiota competitiva, inhibiendo su crecimiento, afectando su viabilidad y metabolismo y alterando su permeabilidad citoplasmática (Nithya *et al.*, 2012; Mohankumar, 2011) y la producción de toxinas (Wilson y Castro 2010).

Interesantemente, Monroy en 2015, trabajó pruebas de inhibición *in vitro* con bacterias probióticas como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* sp frente a patógenos como *Vibrio fluvialis*, demostrando que hubo inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas, recomendando así el uso de estas bacterias como potenciales probióticos en la camaronicultura.

Aunque no se investigó el modo de acción de los sobrenadantes de los aislados con capacidad probiótica frente a los patógenos, ya sea por el método de disco o sobrenadante; la explicación más probable sería la producción de compuestos extracelulares (Verschuere *et al.*, 2000). Sin embargo, esto debería ser confirmado mediante más investigaciones. Asimismo, la competición por los nutrientes podría ser otra explicación aceptable para esta acción inhibitoria que poseen.

Mientras algunos trabajos de tesis realizados en nuestro país aislaron bacterias con potencial probiótico y determinaron su actividad inhibitoria *in vitro* frente a una

cepa de *Y. ruckeri* (Quispe, 2017) o evaluaron el efecto de un producto comercial destinado al engorde de ganado (Ponce, 2014), en el presente estudio se evaluó las características recomendadas por la FAO para considerar a un microorganismo como probiótico y después de ello, se comprobó su efecto antagonista frente a los dos principales patógenos de la trucha arcoíris para finalmente identificar a nivel molecular la identidad de los candidatos más promisorios.

Por otra parte, algunos ensayos adicionales, como la capacidad de adhesión a líneas celulares, producción de sustancias con actividad antimicrobiana, habilidad de estimular la respuesta inmune o actividad lítica, podrían haberse incluido para caracterizar mejor los aislados obtenidos pero limitaciones financieras, técnicas y de tiempo no nos permitieron realizarlas.

También para realizar estudios genómicos (mediante secuenciación de genoma), que profundicen nuestros conocimientos de estas bacterias benéficas. Estas investigaciones se están realizando actualmente en nuestro laboratorio.

Finalmente, podemos indicar que este trabajo servirá como base para nuevos estudios que deseen evaluar y confirmar el potencial probiótico de los aislados obtenidos, pero bajo condiciones experimentales *in vivo* y de campo.

IX. CONCLUSIONES

- De los 200 aislados iniciales se logró pre seleccionar 26 cepas autóctonas compatibles con género *Lactobacillus* del intestino de trucha arcoíris.
- Las diferentes pruebas permitieron seleccionar diez cepas por su viabilidad *in vitro* frente a condiciones de estrés (pH 2.5 y 8; sales biliares, lisozima y NaCl), capacidad de recuperación y seguridad (cepas γ -hemolíticas).
- Cinco cepas cumplieron con las condiciones *in vitro* seleccionadas para este estudio, demostraron sensibilidad frente a cinco antibióticos de uso en acuicultura e inhibición frente a *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*.
- Finalmente se identificaron molecularmente las cinco cepas candidatas como probióticos, perteneciendo una cepa (B15) al género *Lactobacillus* sp y tres cepas (B53, C1 y C5) al género *Lactococcus lactis*.

X. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar mediante cromatografía líquida (HPLC) la concentración de ácido láctico producido por estos microorganismos.
- Es necesario realizar ensayos posteriores que permitan entender mejor el mecanismo de acción y el potencial uso antibacteriano de estas cepas con características probióticas.
- Es importante continuar con trabajos *in vivo* de los probióticos identificados en este estudio y corroborar sus beneficios en sistemas de producción intensivos para controlar enfermedades como la Furunculosis y Yersiniosis de la trucha arcoíris.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar J, Casewell M, Freeman J, Friis C, Goossens H. 2000. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clinical Microbiology and Infection*. 6 (9), 477–482.
- *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie
- Aich N, Ahmed N, Paul A. 2018. Issues of Antibiotic Resistance in Aquaculture Industry and Its Way Forward. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(8): 26-41.
- Aly SM, Mohamed MF, John G. 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 39, 647–656.
- Araújo C, Muñoz E, Nahuelquin Y, Poeta P, Igrejas G, Hernández P, Herranz C, Cintas L. 2014. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Reduca* 3(3): 71-72.
- Balcázar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz I, Múzquiz J, Gironés O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.
- Barboza J, Vázquez H, Salcedo R, Bautista M. 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*. 14(3):32-38.
- Barnes AC. 2011. Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: P. Woo y D. Bruno. (eds). *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections* (pp. 484-511). UK: CABI. p 484-511.
- Beck BH, Li C, Farmer BD, Barnett LM, Lange MD, Peatman E. 2016. A comparison of high- and low-virulence *Flavobacterium columnare* strains reveals differences in iron acquisition components and responses to iron restriction. *J Fish Dis.* 39(3):259-68.
- Bidhan, C, Meena, DK, Behera, BK, Pronob D, Das Mohapatra PK, Sharma AP. 2013. Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*. 1-51.

- Buchmann K, Nielsen ME, Nielsen CV. 2003. Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikhailov, 1975). *J Fish Dis* 26: 183-186.
- Burbank DR, LaPatra SE, Fornshell G, Cain KD. 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*. 35(11):809-16. 1-8.
- Cahill MM, 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*. 19, 21-4.
continuous cultivation. *Rev. Peru. Biol.* 14(2): 271-275.
- Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*. 85: 193-204.
- Cruz Z. 2013. Probióticos y acuicultura: “Desafíos y perspectivas”. *Rev. Industrias Pesqueras* 2063-2064: 42-45.
- Cueto-Vigil M, Acuña-Monsalve Y, Valenzuela-Riaño J. 2010. *In vitro* evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated From coastal serum. *Actual Biol*. 32 (93): 129-138.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. Collins, J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal*. 765, 1-87.
- Erkkilä S, Petäjä E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*, 55(3), 297-300.

- Estela W, Rychtera M, Melzoch K, Quillama E, Egoavil E. 2007. Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Forouhandeh H, Vahed H, Hejazi M, Nahaei M, Dibavar M. 2010. Isolation a phenotypic characterization of *Llactobacillus* species from various dairy products. Current Research in Bacteriology. 3(2): 84-88.
- García R, Guierrez L, David RB C. 2015. El uso de probióticos en la industria acuicolaacuícola. Revista Alimentos Hoy. 26(36):165-178.
- Gardiner C, Stanton C, Lynch P, Collins J, Fitzgerald G, Ross R. 2005. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. J Dairy Sci. 82:1379-1387.
- Gómez-Gil B, Roque A, Tumbull F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture. 191: 259-270.
- Gonzáles, E. (2002). Descripción de la furunculosis producida por
- Guidelines for evaluation of probiotics in Food (2002). Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food London Ontario, Canada.
- Gutiérrez L. 2016. Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación (tesis de doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, Hoshino T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture.
- Henríquez P. 2013. Caracterización de propiedades probióticas de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos (tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

- Hoseinifar SH, Sun Y-Z, Wang A, Zhou Z. 2018. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 9:2429.
- Hurtado C. 2019. Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de cuatro regiones de la Sierra del Perú. Tesis para obtener el grado de Magíster en Sanidad Acuícola. UPCH. 2019
- Ingerslev H-C, von Gersdorff Jørgensen L, Lenz Strube M, Larsen N, Dalsgaard I, Boye M, *et al.* 2014. The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*; 424-425: 24-34.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (suppl):444S-450S.
- Jung-Schroers V, Jung A, Ryll M, Bauer J, Teitge F, Steinhagen D. 2019. Diagnostic methods for identifying different *Aeromonas* species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus. *J Fish Dis.* 42(2):189-219.
- Kim D, Beck BR, Heo SB, Kim J, Kim HB, Lee SM, *et al.* 2013. *Lactococcus lactis* BFE920 activates the innate immune system of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), resulting in protection against *Streptococcus iniae* infection and enhancing feed efficiency and weight gain in large scale field-studies. *Fish Shellfish Immun.* 35: 1585–1590.
- Kumar G, Hummel K, Welch TJ, Razzazi-Fazeli E, El-Matbouli M. 2017. Global proteomic profiling of *Yersinia ruckeri* strains. *Vet. Res.* 48(1):55.
- León J, Ávalos R, Ponce M. 2009. *Flavobacterium psychrophilum* and its pathology in alevins of *Oncorhynchus mykiss* from the El Ingenio fish farm, Huancayo. *Rev. Peru. Biol.* 15(2): 117- 124.

- Leyton A. 2015. Actividad inhibitoria del sobrenadante de la bacteria Antártica *Pseudomonas* sp. M19B en la formación de biopelículas de *Flavobacterium psychrophilum* 19749. Revista de Biología Marina y Oceanografía 50(2): 375-381.
- McCarthy, D. H. (1975). Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. Journal of Wildlife Diseases, 11 (4), 489-493. Recuperado de <https://www.jwildlifedis.org/doi/pdf/10.7589/0090-3558-11.4.489>.
- Merrifield D, Dimitroglou, G, Bradley G, Barker R, Davies S. 2010. Probiotics applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquacult. Nutr. 16, 496-503.
- Mesías F. 2019. Caracterización molecular y fenotípica de la resistencia antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* aislada de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo intensivo de la sierra central y sur del Perú. Tesis para obtener el grado de Magíster en Sanidad Acuícola. UPCH.
- Monroy MC. 2015. El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (*in vitro*), aisladas de peces enfermos. Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente. 1 (7): 25-31.
- Montville TJ, Chung HJ, Chikindas, ML, Chen Y. 1999. Nisin A depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis*. Letters in Applied Microbiology, 28(3), 189-193.
- Morase (1983) Reevaluation of the killer phenomenon. Journal of clinical Microbiology. 24: 866-869
- Nikoskelainen S, Ouwehand A, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immunol. 15: 443–452

- Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand AC. 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Micro.* 67, 2430–2435.
- Nithya K, Senbagam D, Senthilkumar B, Udhayashree N, Gurusamy R. 2012. Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application as a food preservative. *Afr J Microbiol Res.* 6: 1138-1146.
- Noriega L, Cuevas I, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG (2006) Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium strains* with acquired resistance to bile. *Int Dairy J* 16: 850–855
- [OIE] Organización Internacional de Salud Animal. (2000). World Animal Health in 2000: Reports on the Animal Health Status and Disease Control Methods and Tables on Incidence of List A Diseases. pp. 33–37.
- Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P. 2000. Sequencing the gene encoding manganese dependent superoxide dismutase for rapid species identification of *Enterococci*. *J Clin Microbiol.* 38:415-8.
- Quispe W. 2017. Aislamiento de *Lactobacillus* sp. de “trucha arco iris” *oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en puno. Tesis para obtener el grado de licenciado en biología. universidad nacional del altiplano
Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fvg643d/doc/fvg643d.pdf>.
- Ricaud K, Rey M, Plagnes-Juan E, Larroquet L, Even M, Quillet E, Skiba-Cassy S, Panserat S. 2018. Composition of Intestinal Microbiota in Two Lines of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Divergently Selected for Muscle Fat Content. *The Open Microbiology Journal.* 12: 308-320.
- Ringø E, Gatesoupe FJ. 2014. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 160:177- 203.

- Ringo E, Olsen RE, Mayhew T, Myklebustd R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227: 395-415.
- Robertson PA, O'Dowd C, 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.
- Rodríguez M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Salminen MK, Järvinen A, Saxelin M, Tynkkynen S, Rautelin H, Valtonen V (2001). Increasing consumption of Lactobacillus GG as a probiotic and the incidence of lactobacilli bacteraemia in Finland. *Clin Microbiol Infect*, 7: (Suppl 1) 802.
- Salminen S. et al. (1998). Demonstration of safety of probiotics -A review. *Int J Food Microbiol*, 44(1-2): 93-106.
- *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Tesis de pregrado).
- Shen, W.-Y.; Fu, L.-L.; Li, W.-F. y Zhu, Y.-R. (2010). Effect of Dietary Supplementation with *Bacillus subtilis* on the Growth, Performance, Immune Response and Antioxidant Activities of the Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 41 (11), 91-98.
- Staykov Y, Spring Z, Denev Z, Sweetman Z. 2007. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Int* 15:153–161.
- Taschuk R, Griebel PJ. 2012. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim. Health Res Rev.* 13(1): 129-41.
- Távara C. 2019. Expresión de genes de la respuesta inmune local y sistémica frente a la infección por *Flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* en la provincia de Puno- Perú. Tesis para obtener el grado de Magíster en Sanidad Acuícola. UPCH.

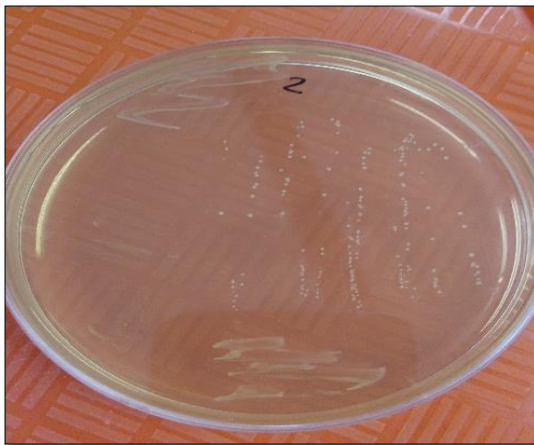
- Tovar D, Reyes M, Guzmán L, Gleaves V, Civera R, Ascencio F. *et al.* 2008. Probióticos en acuicultura: avances recientes del uso de levaduras en peces marinos. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 237-257 pp.
- Van den Bogaard A, Stobberingh E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. International Journal of Antimicrobial Agents 14: 327–335.
- Van Doan H, Hoseinifar SH, Dawood MO, Chitmanat C, Tayyamath K. 2017. Effects of Cordyceps militaris spent mushroom substrate and Lactobacillus plantarum on mucosal, serum immunology and growth performance of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Fish Shellfish Immun. 70 (Supplement C):87–94.
- Vendrell D, Balcazar JL, Blas ID, Ruiz-Zarzuela I, Girones O, Muzquiz JL. 2008. Protection of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) from lactococcosis by probiotic bacteria. Comp. Immunol. Microb. 31, 337–345.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev. 64(4): 655-71.
- Wilson JM, Castro LFC. 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. Fish Physiol. 30.1-55.
- Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill H. S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. International Journal of Food Microbiology. 98(2), 211-217.

XII. ANEXOS

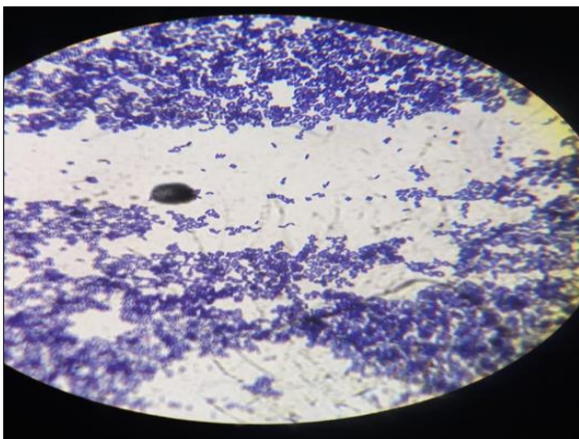
Anexo 1: Número de peces muestreados según su procedencia

DEPARTAMENTO	REGIÓN	CANTIDAD DE PECES
LIMA	CANTA	6
LIMA	CANTA	6
JUNIN	HUANCAYO	6
JUNIN	HUANCAYO	6
JUNIN	JAUIJA	6

Anexo 2: Observación macroscópica de cepas en agar MRS a las 24h de incubación



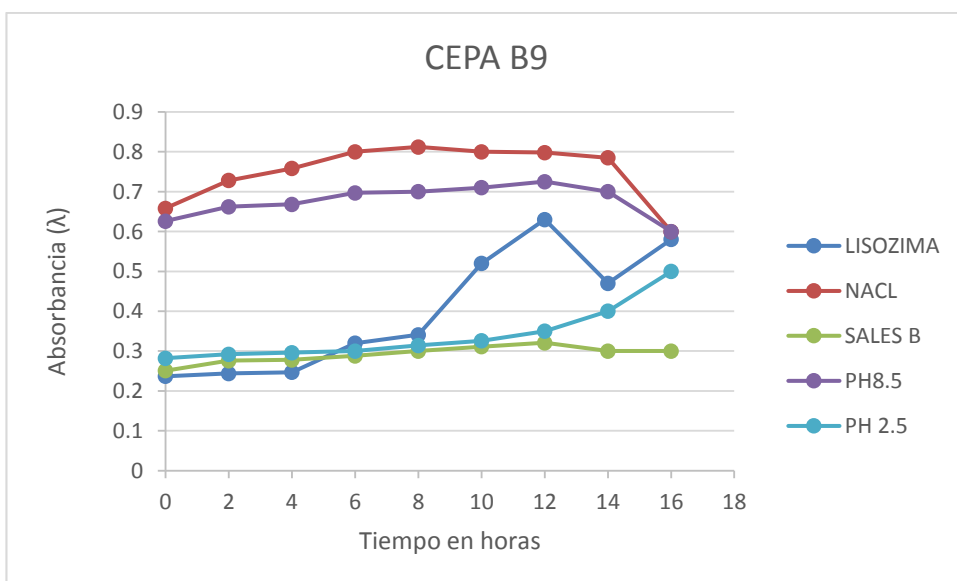
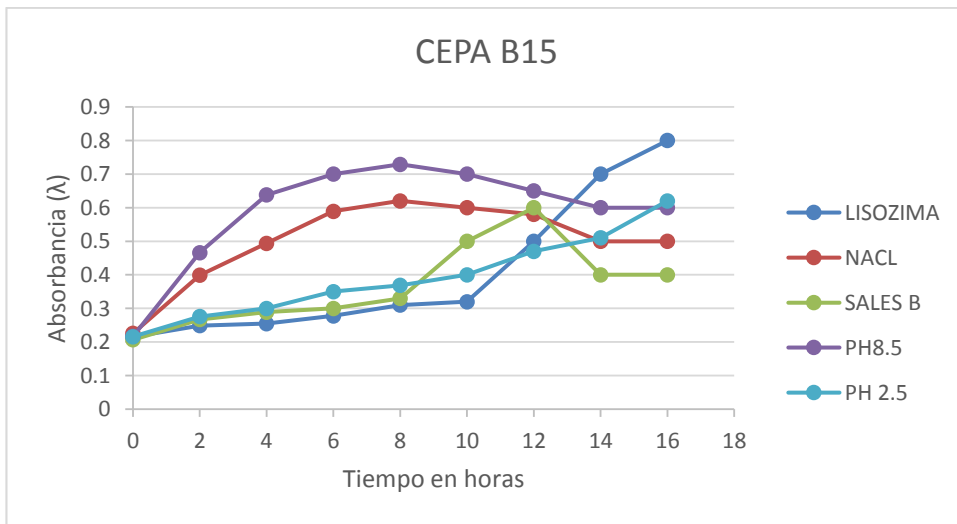
Anexo 3: Imagen de microscopia de aislados de bacterias lácticas.
Bacilos Gram positivos 100x

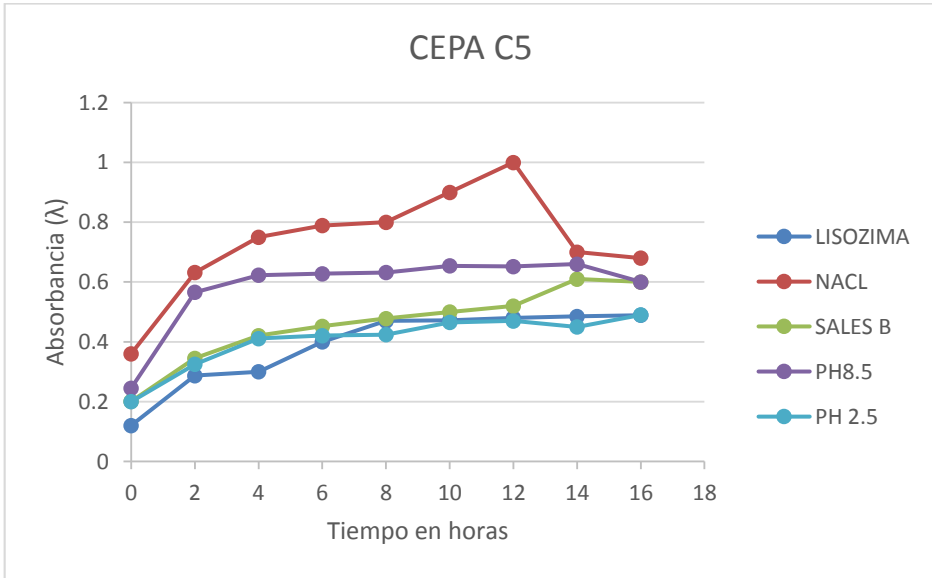
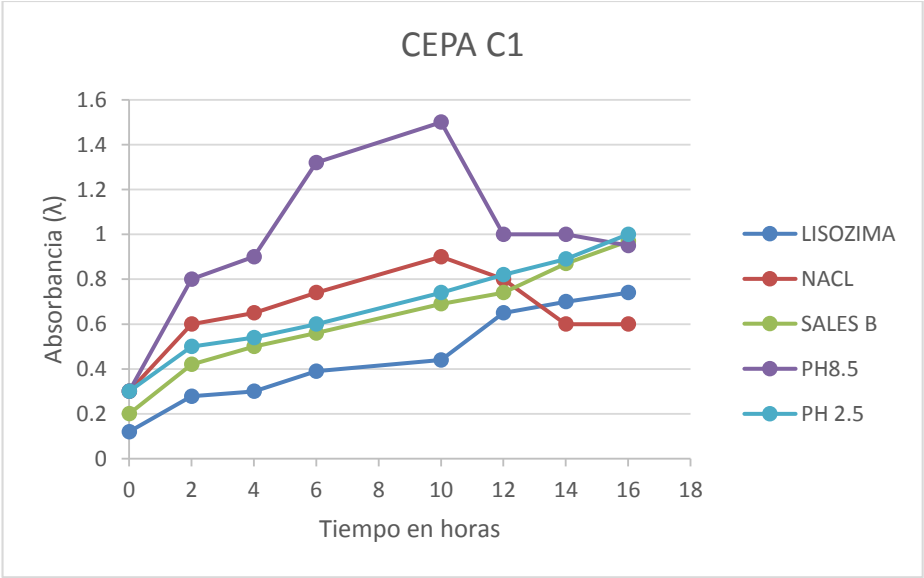


Anexo 4. Ausencia de hemolisis en agar sangre



Anexo 5: cinética de crecimientos de las cepas obtenida





Anexo 6: Anova para Bacterias probióticas obtenidas

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0.421438	4	0.1053595	13.4831204	8.21542E-07	2.63353209
Columnas	0.4291836	9	0.047687067	6.10263396	3.54529E-05	2.15260747
Error	0.2813104	36	0.007814178			
Total	1.131932	49				