

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE LOS PROBIÓTICOS
COMERCIALES *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* Y DE LOS
ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINA, AMOXICILINA Y ERITROMICINA
PARA EL CONTROL DE LA BACTERIA PATÓGENA *Carnobacterium*
piscícola AISLADA DEL INTESTINO DE LA TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*).

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

LAURA ESTEFANÍA REYES HARO

SANGOLQUÍ, 9 DE JULIO DEL 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Laura Estefanía Reyes Haro

DIRECTOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIA ACADÉMICA

Dra. Vanessa Andrade

Sangolquí, 9 de julio del 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. LAURA ESTEFANÍA REYES HARO como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Sangolquí, 9 de julio del 2010

Dr. Darwin Rueda

DIRECTOR

Ing. Karina Ponce

CODIRECTORA

REVISADO POR

Ing. Rafael Vargas

DIRECTOR DE LA CARRERA

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre que con su fortaleza supo enseñarme a salir adelante.

A mi padre por ser un amigo incondicional.

A mi hermano que pese a su ausencia siempre ha estado a mi lado.

A mi esposo por creer siempre en mi y a mi hijo por ser la luz que ilumina mi camino.

Laura Estefanía Reyes Haro.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres que con su esfuerzo lograron darme una educación integral y con su amor me apoyaron para sacar esta carrera adelante.

A mi esposo por ser mi mejor amigo y mi caballero andante, gracias por entenderme y ayudarme a crecer como ser humano.

A mi hijo que con su infinita inocencia y dulzura me dio las fuerzas para culminar con esta meta.

A mi nueva familia por estar siempre conmigo apoyándome en todo lo que he necesitado.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Darwin Rueda por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y brindarme su conocimiento cuando lo necesité. A mi codirectora la Ing. Karina Ponce por guiarme y darme el tiempo que necesité para terminar mi tesis. Al Ing. Ortiz por ayudarme a obtener las truchas que se emplearon en la investigación y a la Dra. Betty Caicedo por facilitarme su laboratorio, los insumos que necesité para realizar mi tesis y sus sabios consejos.

A mis amigos que me acompañaron a lo largo de mi carrera y que me brindaron su apoyo en los momentos más difíciles.

Laura Estefanía Reyes Haro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	viii
LISTADO DE CUADROS	ix
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Objetivos de la investigación</i>	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
1.2 <i>Marco Teórico</i>	4
1.2.1 Probióticos	4
1.2.1.1 Origen de los probióticos	5
1.2.1.2 Mecanismos de acción	6
1.2.1.3 Importancia de los probióticos	9
1.2.2 Bacterias ácido lácticas	10
1.2.2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	11
1.2.2.2 <i>Lactobacillus casei</i>	13
1.2.2.3 <i>Carnobacterium piscicola</i>	14
1.2.3 Antibióticos	15
1.2.3.1 Oxitetraciclina	16
1.2.3.2 Amoxicilina	17
1.2.3.3 Eritromicina	17
1.2.4 Trucha arco iris	18
1.2.4.1 Origen	19
1.2.4.2 Descripción	20
1.2.4.3 Características corporales	22
1.2.4.4 Alimentación	22
1.2.4.5 Abastecimiento de agua	23

1.2.5	Identificación bacteriana	24
1.2.5.1	Tipificación	25
1.2.5.1.1	Aislamiento de cultivos puros	25
1.2.5.1.2	Morfología y crecimiento de colonias	26
1.2.5.2	Pruebas bioquímicas	26
1.2.5.2.1	Tinción Gram	26
1.2.5.2.2	Prueba de la catalasa	27
1.2.5.2.3	Sistemas bioquímicos manuales	28
1.2.6	Pruebas de antagonismo	29
1.2	<i>Hipótesis</i>	30
2	MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1	<i>Participantes</i>	31
2.2	<i>Zona de estudio</i>	31
2.3	<i>Período de tiempo de investigación</i>	31
2.4	<i>Diseño</i>	31
2.5	<i>Procedimientos</i>	34
2.5.1	Disección de la trucha arco iris	34
2.5.2	Aislamiento e identificación	34
2.5.3	Pruebas de antagonismo	35
2.5.4	Análisis de datos	37
3	RESULTADOS	37
3.1	<i>Disección de la Trucha</i>	37
3.2	<i>Aislamiento e identificación bacteriana</i>	38
3.3	<i>Identificación Carnobacterium piscícola</i>	40
3.4	<i>Pruebas de antagonismo</i>	42
3.4.1	Efecto antagónico	50
4	DISCUSIÓN	58
5	CONCLUSIONES	63
6	RECOMENDACIONES	65
7	BIBLIOGRAFÍA	66
	ANEXOS	71

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Lista de descripción de los tratamientos a ser utilizados para la inhibición del crecimiento del patógeno <i>Carnobacterium piscícola</i> .	33
Tabla 2.2 Dosis de los probióticos comerciales para el control del patógeno <i>Carnobacterium piscícola</i> .	36
Tabla 2.3 Antibióticos a ser probadas para el control del patógeno <i>Carnobacterium piscícola</i> .	36
Tabla 2.4 Temperatura a ser probadas	36
Tabla 3.1 Pesos de truchas, intestino y contenido	38
Tabla 3.2 Colonias identificadas	39
Tabla 3.3 Análisis de varianza para tratamientos y grupos de estudio bajo la acción del patógeno <i>Carnobacterium piscícola</i> en 5 días de evaluación	50
Tabla 3.4 Análisis de varianza para dosis, temperatura e interacción de <i>L. plantarum</i> y <i>L. casei</i>	51
Tabla 3.5 Análisis de varianza para dosis, temperatura e interacción del grupo 3	53
Tabla 3.6 Análisis de varianza de promedios generales	54
Tabla 3.7 Promedios de inhibición entre grupos	54
Tabla 3.8 Promedios de inhibición del grupo 1 y 2	55

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Clasificación científica de <i>Lactobacillus plantarum</i> _____	11
Cuadro 1.2 Clasificación científica de <i>Lactobacillus casei</i> _____	13
Cuadro 1.3 Clasificación científica de <i>Carnobacterium piscícola</i> _____	14
Cuadro 1.4 Taxonomía de la Trucha arco iris (<i>Orcorhynchus mykiss</i>) _____	18
Cuadro 1.5 Tamaños de las zonas de inhibición _____	30

LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.1 Trucha arco iris lista para la disección una vez sedada	37
Figura 3.2 Intestinos extirpados de la trucha arco iris	38
Figura 3.3 Inoculación de pocillos en kit API 50 CHL	40
Figura 3.4 Reacción de azúcares tras 24 horas	41
Figura 3.5 Reacción de azúcares tras 48 horas	41
Figura 3.6 Activación <i>L. plantarum</i>	42
Figura 3.7 Activación <i>L. casei</i>	42
Figura 3.8 <i>Carnobacterium piscícola</i> en MRS agar	43
Figura 3.9 Antagonismo oxitetraciclina pruebas piloto	43
Figura 3.10 Antagonismo <i>L. casei</i> pruebas piloto	44
Figura 3.11 Antagonismo <i>L. plantarum</i> pruebas piloto	44
Figura 3.12 Efecto antagónico <i>L. plantarum</i> 8°C	45
Figura 3.13 Efecto antagónico <i>L. plantarum</i> 15°C	46
Figura 3.14 Efecto antagónico <i>L. plantarum</i> 20°C	46
Figura 3.15 Efecto antagónico <i>L. casei</i> 8°C	47
Figura 3.16 Efecto antagónico <i>L. casei</i> 15°C	47
Figura 3.17 Efecto antagónico <i>L. casei</i> 20°C	48
Figura 3.18 Efecto antagónico Antibióticos 8°C	49

Figura 3.19 Efecto antagónico Antibióticos 15°C _____	49
Figura 3.20 Efecto antagónico Antibióticos 20°C _____	50
Figura 3.21 Análisis de varianza para tratamientos y grupos _____	51
Figura 3.22 Análisis de varianza para temperaturas e interacción de grupos 1 y 2 _____	51
Figura 3.23 Análisis de varianza para el grupo 3 _____	53
Figura 3.24 Comparación entre los tres grupos probados contra el patógeno <i>Carnobacterium piscícola</i> _____	55
Figura 3.25 Dosis 3 para los grupos 1 y 2 _____	56
Figura 3.26 Temperatura 3 para los grupos 1 y 2 _____	56
Figura 3.27 Comparación de los tres antibióticos _____	57
Figura 3.28 Comparación de las tres temperaturas _____	58

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A: Tablas con las colonias obtenidas después del aislamiento de la flora intestinal de la trucha arco iris _____ 71
- Anexo B: Tablas con los informes de los resultados de la identificación bacteriana _____ 75
- Anexo C: Tabla del efecto antagónico del primero al quinto día de los 27 tratamientos contra el patógeno *Carnobacterium piscícola* _____ 81

RESUMEN

El conocimiento de la microflora bacteriana del intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) representa una ventaja para su cuidado, porque permite conocer las bacterias que en éste habita y lo que se buscó en el presente trabajo fue encontrar una alternativa probiótica al uso de antibióticos generalmente usados en acuicultura para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola* que está en el intestino de las truchas. Se utilizaron los probióticos comerciales *L. plantarum*, *L. casei* y los antibióticos oxitetraciclina, amoxicilina y eritromicina para determinar cuál resulta más efectivo para inhibir el crecimiento del patógeno a través de pruebas de antagonismo. Se probaron tres concentraciones de los probióticos (10^9 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^5 ufc/ml) y sensidiscos de los tres antibióticos a concentraciones de 30 mcg (oxitetraciclina), 25 mcg (amoxicilina) y 15 mcg (eritromicina). Para las pruebas de antagonismo se sembró el patógeno en medio MRS (Man, Rogosa y Sarpe) agar (Merck) y se hicieron orificios en el medio para inocular ahí los probióticos y en otras cajas sólo se colocaron los sensidiscos encima del patógeno recién inoculado. Se tomaron datos por cinco días a tres temperaturas distintas (8°C, 15°C y 20°C) y con diámetros de inhibición mayores a 5 mm se consideró una reacción positiva. Los resultados indicaron que de los probióticos utilizados sólo *L. plantarum* presentó un buen efecto antagónico contra *Carnobacterium piscícola*, mientras que en los antibióticos la amoxicilina no presentó ningún efecto antagónico durante los cinco días y la oxitetraciclina y eritromicina produjeron buena inhibición. De este estudio se concluye que *L. plantarum* es una mejor opción al uso de los antibióticos habituales en acuicultura con dosis de 10^9 ufc/ml, porque a 8°C inhibió casi en su totalidad el crecimiento del patógeno en la caja.

ABSTRACT

The knowledge of intestine bacteria from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) represents an advantage for its care. In this investigation looking for a probiotic option to antibiotics which were used in aquiculture to control *Carnobacterium piscicola*. To determinate the best option were used like probiotics (10^9 ufc/ml, 10^7 ufc/ml, 10^5 ufc/ml) *L. plantarum*, *L. casei* and the antibiotics oxitetraciclina (30mcg), eritromicina (15mcg) and amoxicilina (25mcg). Antagonism test was made in MRS (Man, Rogosa y Sarpe) agar (Merck) where the probiotics were inoculated. The antibiotics sensidiscs were collocated over the agar for five days in three diferents temperatures (8°C, 15°C, 20°C) and with an inhibition greater than 5 mm was considered positive. The results show that *L. plantarum* (10^9 ufc/ml) presented the best antagonism effect against *Carnobacterium piscicola*. In this investigation can concluded that *L. plantarum* is the best option to prevent the growing of *Carnobacterium piscicola* in comparison of the antibiotics used in general in aquiculture. At 8°C the growing of the pathogen was inhibited almost totally.