

# 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una industria de rápido crecimiento en respuesta al dramático incremento poblacional mundial en los últimos dos siglos y la creciente demanda de alimentos. De acuerdo con el informe de la FAO, "Estado de la Acuicultura Mundial: 2006", la acuicultura es una actividad con un alto potencial para satisfacer la creciente demanda de alimentos acuáticos ya que es probablemente el sector productivo de más rápido ascenso que genera actualmente alrededor del 50% de la producción de pesca en el mundo. La producción de trucha se ha desarrollado en los últimos diez años en la región Interandina del Ecuador, especialmente en las provincias del Azuay y Pichincha, estimándose que hay 213 criaderos en el país (Idrovo, 2006). Los 12 criaderos más grandes rinden entre 80 y 150 toneladas al año, el resto tienen un promedio de 30 toneladas y los artesanales menos de 5 toneladas (Castro y Quintong, 2003).

A diferencia de otros ambientes el medio acuático presenta la existencia de relativamente pocas bacterias que puedan considerarse como patógenos obligados. Una parte importante de ellas son patógenos oportunistas que pueden vivir de forma más o menos independiente sin tener que afectar a los peces, pero en determinadas ocasiones se presentan buenas oportunidades para que puedan actuar como patógenos (Padrós, F., Furones, M., 2004). Lamentablemente las enfermedades presentes en los peces se han convertido en un factor limitante en el desarrollo de la acuicultura, debido principalmente, a la alta densidad poblacional de los espacios físicos de cultivo, que facilita la propagación de focos infecciosos causados por microorganismos patógenos (Toledo, *et al.*, 2004). La estrategia más común utilizada actualmente en los centros de cultivo es el tratamiento con antibióticos tales como las tetraciclinas o amoxicilinas a concentraciones de 250 mg/ml en la piscina o de 3 mg/ml para que ingiera el pez, antibióticos de comprobada acción antimicrobiana y de amplio espectro (Toledo *et al.*, 2004).

En años recientes se presenta un creciente interés por agentes probióticos que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal del consumidor permitiendo controlar microorganismos patógenos por medio de la estimulación del sistema inmune, acidificando el contenido intestinal y aportando bacterias benéficas, además de las levaduras que aportan vitaminas y enzimas bacterianas que colaboran en una mejor degradación del alimento consumido, actuando como promotores de crecimiento, ya que su acción sobre el intestino favorece una mayor absorción y utilización de nutrientes (Guevara, *et al.*, 2005). Se han descubierto que estos microorganismos juegan un papel de desplazamiento contra otros microorganismos porque compiten por nutrientes y espacio para su desarrollo, eliminando microorganismos patógenos sin tener la necesidad de usar antibióticos; de esta manera se ha incrementado su uso en la producción animal para promover un mejor crecimiento, conversión alimenticia y salud, entre otros (Sánchez y Zapata, 2002).

El uso indiscriminado de antibióticos presenta serios problemas porque los patógenos se hacen cada vez más resistentes a los tratamientos antibióticos habituales (Jean Yves, 1998 citado por Le Goff, 2003); y las bacterias farmacorresistentes son transmitidas a través de la cadena alimentaria al consumidor provocando una enfermedad lo que, hoy en día, es una complicación mayor para los servicios de salud pública en todo el mundo (Le Goff, 2003). Por estas razones, los probióticos que antes eran vistos sólo como medicina alternativa, se han vuelto en una buena opción de tratamiento y prevención de enfermedades tanto en seres humanos como en animales (Le Goff, 2003).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), es una de las especies de la familia *Salmonidae* más utilizadas para el cultivo a nivel mundial porque tiene la ventaja de adaptarse muy bien a cambios ambientales, en especial a los de temperatura. La trucha es una especie acuícola con un alto contenido de aceite Omega-3 que actúa como agente reductor de los depósitos que existen de colesterol en las arterias y al incluirla en una dieta cotidiana nos evita

enfermedades del corazón. Es importante mencionar que el precio de la trucha es menor al del salmón, otro pez de agua fría rico en Omega-3, una razón más para considerar a la trucha como un buen aliado de la nutrición y economía familiar (Meteppec, 2008). Este pez se ve afectado por patógenos que afectan su producción, entre ellos *Carnobacterium piscícola*, que puede provocar la pérdida de hasta el 85% de la producción total de una piscícola generando graves daños para sus productores y grandes pérdidas económicas. La presencia de este patógeno aumenta cuando se da una sobredosis de antibióticos produciendo resistencias que permiten su masivo crecimiento y cuando se presentan bajas de temperaturas bruscas a menos de 15 °C en las aguas de la piscina acuícola donde se encuentren.

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Agrobiotecnología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA), de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicada en la Hacienda el Prado, parroquia San Fernando, del cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha; tiene como fin aislar en el laboratorio el patógeno *Carnobacterium piscícola* –presente en el sistema digestivo de estos peces– brindando así la oportunidad de determinar de manera más profunda qué tipo de probiótico es más conveniente para prevenirlo e incluso eliminarlo. De esta manera se podrá tener una alternativa antimicrobiana natural que pueda ayudar a mantener saludables a las truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), mejorando la producción, reduciendo el índice de animales muertos por deficiencias en su salud y ayudando tanto a productores pequeños como industriales para que incrementen sus ganancias.

## 1.1 Objetivos de la investigación

### 1.1.1 Objetivo General:

Analizar el 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*).

### 1.1.2 Objetivos Específicos:

- Aislar la microflora intestinal de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).
- Identificar bioquímicamente y tipificar microbiológicamente *Carnobacterium piscícola*.
- Probar el efecto antagónico con los probióticos *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* a concentraciones de  $10^9$ ,  $10^7$  y  $10^5$  ufc/ml, y a temperaturas de 8°C, 15°C y 20°C.
- Determinar el efecto antagónico con los antibióticos Oxitetraciclina, Amoxicilina, Eritromicina a concentraciones de 30 mcg, 25 mcg y 15 mcg respectivamente, y a temperaturas de 8°C, 15°C y 20°C.

## 1.2 Marco Teórico

### 1.2.1 Probióticos

#### 1.2.1.1 Origen de los probióticos

El término probiótico ha sufrido modificaciones en su significado a lo largo de los años. La definición utilizada por Lilly y Stillwell como: "Suplemento microbiano que se suministra a animales y humanos" en 1965 fue modificada y se redefinió el término de probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal. En 1989 R. Fuller definió a los probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino" (Gómez, 2003). En 1998 el Instituto Internacional en Ciencias de la Vida (ILSI, siglas en inglés), de la Unión Europea en Bruselas definió a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales (Gómez, 2003). Y en el 2002 la FAO definen a los probióticos como: "Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas".

Este grupo de aditivos incluye cultivos vivos de levaduras y hongos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*) o bacterias (*Lactobacillus*), que se agregan al alimento de los animales con la idea de que colonicen el tubo digestivo y mejoren el balance microbiano del mismo, en beneficio del animal. Debe subrayarse que para que un producto pueda considerarse como probiótico, los microorganismos deben ser viables y sobrevivir el medio fuertemente ácido del estómago colonizando el intestino delgado y grueso (Gómez, 2003).

Los probióticos se han probado en prácticamente todas las especies pecuarias y los resultados obtenidos varían desde mejora en las ganancias diarias de peso, hasta aumentos en la grasa butírica de la leche de vacas. Es probable que en el futuro el empleo de probióticos sustituya el uso de antibióticos como aditivos en los alimentos para las especies pecuarias (Shimada, 2003). En lo que respecta a acuicultura los primeros probióticos probados en peces fueron preparaciones comerciales diseñadas para animales terrestres, presumiendo que la supervivencia de estas bacterias era incierta en el ambiente acuático (Timmermans, 1987).

Entre los probióticos más estudiados se encuentran las bacterias y las levaduras. Algunos ya se comercializan bajo la forma de preparados que contiene uno o varios microorganismos vivos. De los géneros bacterianos más investigados están: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, siendo los dos primeros lo que presentan mejores resultados. Los *Lactobacilli* fueron los primeros microorganismos en ser administrados en su forma viva, por vía oral, con el objetivo de producir efectos benéficos a la microbiota digestiva animal (Castro, *et al.*, 2005).

#### 1.2.1.2. Mecanismos de acción

Como formas de acción de los probióticos en el hospedero se pueden mencionar la competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunitaria no específica, la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal, entre otros que se ha evidenciado en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, la eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando es administrado al hospedero por la gran influencia de factores más complejos como la ingestión selectiva (Riquelme *et al.*, 2000) y la muerte en el tracto gastrointestinal (Vine *et al.*, 2006) provocada por la incapacidad del probiótico para mantener su

fisiología bajo circunstancias de una mayor interacción microbiana (Tinh *et al.*, 2007).

Según (Villamil, L. y Martínez, M., 2009) Entre los principales mecanismos descritos que usan los aislados probióticos para beneficiar al hospedador, se encuentran:

### Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal

La habilidad de las bacterias para adherirse y sobrevivir en el mucus entérico es decisiva en el establecimiento de la microbiota intestinal y la capacidad de adherencia es una característica que es aprovechada de igual manera tanto por las bacterias probióticas como por las patógenas (Villamil, L. y Martínez, M., 2009). En el caso de las bacterias probióticas, esta característica ha sido uno de los factores más importantes para su selección y aplicación en la acuicultura, mientras que para las bacterias patógenas esta habilidad para adherirse se relaciona con la virulencia y se considera como el primer paso para una infección (Bengmark, 1998).

### Producción de antibióticos / compuestos antivirales

Para la selección de microorganismos con actividad probiótica se puede determinar la capacidad de generar productos extracelulares (ECPS) que pueden inhibir o matar otras bacterias potencialmente patógenas, entre ellos sustancias antibacteriales, enzimas bacteriolíticas, ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y bacteriocinas (Villamil, L. y Martínez, M., 2009). Los probióticos no sólo tienen capacidad antibacteriana, también se ha descrito actividad antiviral de algunos aislados

como *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp., contra el virus de la necrosis hematopoyética (IHNV) (Kamei et al., 1988).

### Mejoramiento de las funciones inmunes

Irianto y Austin (2002) vieron el aumento en parámetros celulares, como el número de eritrocitos, linfocito, macrófagos y un aumento de la actividad lisozimica de *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Scophthalmus maximus* alimentados con probióticos tanto Gram-positivos como Gram negativos, seleccionados previamente. Se ha visto que el camarón blanco *L. vannamei* tratado con complemento alimenticio de *Lactobacillus plantarum* aumentó significativamente la actividad fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la superóxido dismutasa (SOD), así como la transcripción del mRNA de peroxinectina (PE) y profenoxidasa (proPO), lo que contribuyó a la eliminación de *Vibrio alginolyticus* durante infecciones experimentales (Chiu et al., 2007).

### Mejora de la calidad de agua

El género *Bacillus* seleccionado como probiótico puede convertir la materia orgánica en CO<sub>2</sub>, al contrario de las bacterias Gram-negativas que convierten la materia orgánica en biomasa bacteriana o limo. Laloo et al. (2007) comprobaron la capacidad de tres aislados de este género para bajar las concentraciones de nitritos, nitratos y amonios en el agua de cultivo de peces ornamentales.



## Actividad metabólica

Los probióticos presentan la característica de aumentar la actividad de las hidrolizas de las sales biliares en el hígado, las cuales se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, teniendo un efecto hipocolesterolémico (García, 2002), hay que tener en cuenta que es necesario la presencia del aditivo probiótico en la dieta de forma constante para lograr la acción hipocolesterolémica. Los mecanismos de acción propuestos para lograr esta respuesta de los probióticos explican la necesidad de su permanencia en el tracto gastrointestinal para ejercer su efecto. Se ha visto que pueden propiciar la formación de esterios de colesterol en el intestino favoreciendo su excreción (Kiebling *et al.* 2002).

### 1.2.1.3. Importancia de los probióticos

Los efectos de los probióticos son varios incluyendo la modificación de la flora bacteriana evitando la colonización patógena, la prevención del desequilibrio de la flora intestinal, la reducción de la incidencia y duración de diarreas, el mantenimiento de la integridad de las mucosas, la modulación de la inmunidad al evitar la translocación bacteriana, la producción de vitaminas como la B2, B6 y biotina, la asimilación de oligoelementos y la actividad antitumoral (Gómez, 2003).

Según Gómez (2003), los probióticos presentan algunas propiedades benéficas tales como:

- Prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas
- Disminución de los niveles de colesterol.
- Disminución de diarreas, ya sea por virus, bacterias o parásitos.

- Tratamiento de la intolerancia a la Lactosa, actúa en la digestión de la lactosa
- Estimulación del sistema inmune.
- Exclusión o reducción de la adherencia patógena
- Producción de ácidos, peróxido de Hidrógeno y bacteriocinas antagonistas al crecimiento patógeno.
- Formación de una flora intestinal balanceada.
- Prevención de ciertas manifestaciones alérgicas
- Prevención del cáncer de Colon
- Tratamiento contra tumores
- Poseen efectos antimicrobianos.

### 1.2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han estado presentes en la alimentación desde hace siglos; constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en nuestro aparato digestivo. Se pueden aislar de productos fermentados como la leche y derivados, productos cárnicos y vegetales; los cuales proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos (Mateos, 2002 citado por Estrada, Gutiérrez y Montoya, 2005). Estos microorganismos cuando fermentan carbohidratos producen una mezcla de sustancias con acción antimicrobiana como: ácido láctico, ácido acético, ácido butírico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas, que generan cambios en la microbiota intestinal como la inhibición de patógenos; lo cual repercute positivamente en el estado de salud del consumidor (Estrada *et al.*, 2005).

Entre los géneros de bacterias ácido lácticas más utilizados para el consumo humano se encuentran los siguientes: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, entre otros (Estrada *et al.*, 2005). Las bacterias del género *Lactobacillus* son microorganismos reconocidos por su habilidad fermentativa e iniciadores en procesos industriales de productos fermentados; su presencia en el tubo digestivo es considerada benéfica, por tener un papel protector o terapéutico (Estrada *et al.*, 2005). Se cree que algunas especies de este género pueden estar involucradas en la prevención de la enfermedad de Crohn's, el cáncer de colon, la disminución del colesterol previenen o reducen los efectos de la diarrea, constipación, infecciones alimentarias, e infecciones urinarias (Estrada *et al.*, 2005).

Debido a las características fisiológicas y bioquímicas de las BAL, su uso en la conservación de los alimentos, permite disminuir el empleo de preservantes químicos adicionados a estos. Estas ventajas han hecho que los *Lactobacillus* sean considerados como bacterias nutraceúticas, es decir bacterias importantes por su valor nutricional y farmacéutico (Estrada *et al.*, 2005).

#### 1.2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

**Cuadro 1.1 Clasificación científica de *Lactobacillus plantarum*.**

Reino	Bacteria
División	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>L. plantarum</i>

Fuente: Kleerebezem, et al., 2003

*Lactobacillus plantarum* es una bacteria gram positiva, no esporulada, aerotolerante que puede crecer desde 15°C hasta 37°C y produce ambos isómeros del ácido láctico tanto el D como L. *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más común usada en los procesos de inoculación para la producción de alimentos (Magonova *et al.*, 2007).

Durante condiciones anaerobias estos organismos dominan rápidamente la población microbiana y transcurrido 48 horas empiezan a producir ácidos tanto lácticos como acéticos por la ruta de Embden-Meyerhof, disminuyendo su competencia. Bajo estas condiciones *Lactobacillus plantarum* produce altos niveles de proteínas heterólogas que han presentado una alta competitividad (Magonova *et al.*, 2007). En condiciones aerobias consume el oxígeno y lo convierte en peróxido de hidrógeno que resulta tóxico para otros microorganismos (Kleerebezem *et al.*, 2003).

La actividad que tiene *Lactobacillus plantarum* para producir sustancias antimicrobianas le ayuda a sobrevivir en el tracto gastro intestinal. Estas sustancias antimicrobianas han mostrado un efecto bastante significativo sobre bacterias gram positivas y gram negativas (Magonova *et al.*, 2007). Otros microorganismos tolerantes al oxígeno acumulan cantidades milimolares de manganeso, el cual es usado por *Lactobacillus plantarum* como una pseudo catalasa para bajar los niveles de oxígeno y de esta manera impedir el crecimiento de estos organismos (Kleerebezem, *et al.*, 2003).

### 1.2.2.2 *Lactobacillus casei*

**Cuadro 1.2 Clasificación científica de *Lactobacillus casei***

Reino	Bacteria
División	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>L. casei</i>

Fuente: Hansen & Lessel, 1971

*Lactobacillus casei* es una bacteria gram positiva, no esporulada, anaerobia facultativa del género *Lactobacillus* que se encuentra en el intestino así como en la boca. Se trata de una bacteria productora de ácido láctico que se emplea en la industria láctea para la elaboración de alimentos lácteos probióticos, ya que contienen microorganismos vivos que ejercen importantes efectos fisiológicos si se ingieren en cantidades adecuadas. Esta especie es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura, siendo además un complemento al crecimiento de *L. acidophilus*. Se sabe que mejora la digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea, por esta razón se emplea en la elaboración de diversos alimentos funcionales (Magonova *et al.*, 2007).

Las bacterias deben resistir la acción de los jugos gástricos, biliares y duodenales y llegar intactas al tracto intestinal donde desarrollan acciones inmunomoduladoras. Se han realizado experimentos para detectar la supervivencia de estas bacterias al paso por el tracto intestinal y se ha visto que hay un porcentaje alto de supervivencia y es el productor de la enzima amilasa (una enzima digestiva de carbohidratos en la saliva y en el jugo pancreático de mamíferos) (Magonova *et al.*, 2007).

### 1.2.2.3. *Carnobacterium piscícola*

**Cuadro 1.3 Clasificación científica de *Carnobacterium piscícola***

Reino	Bacteria
División	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Carnobateiaceae</i>
Género	<i>Carnobacterium</i>
Especie	<i>C. piscícola</i>

Fuente: NCBI, 2002.

Algunas bacterias heterofermentativas no productoras de ácidos han sido clasificadas en un nuevo género, *Carnobacterium*, sobre las bases de sus características fenotípicas (Collins, et al., 1987). *Carnobacterium piscícola* es una bacteria con características similares a *Lactobacillus* y han sido aisladas de peces aparentemente sanos y de peces enfermos. En la mayoría de los casos de enfermedades, los bacilos ácido lácticos han estado relacionados con infecciones crónicas de cultivos de salmónidos y algunos niveles de mortalidad (Baya *et al*, 1991).

La mayoría de los aislamientos de este patógenos se ha hecho en peces adultos que han sido sometidos a factores tales como estrés, o cuando se encuentran en la etapa de desove. También se ha encontrado como causa de infección la baja de temperaturas en el agua de las piscinas, lo cual indica que son patógenos oportunistas (Starliper *et al*. 1992).

Los principales síntomas que presentan los peces, específicamente la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con la presencia del patógeno *Carnobacterium piscícola*, son –como síntomas externos– el oscurecimiento de

la piel y exoftalmia, mientras que como síntomas internos presenta puntos hemorrágicos en el hígado.

En los últimos años los procesos septicémicos causados por bacterias gram positivas han aumentado alarmantemente en la producción masiva de peces. Existen una serie de factores que van a favorecer la presencia del proceso infeccioso, en este caso primero la especie, ya que trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la más sensible a este tipo de enfermedades y la va a padecer de forma más aguda y con mayores tasas de mortalidad (Zaragoza, 2006).

Ante un brote agudo de la enfermedad, se recurre al uso inmediato de antibióticos y en la actualidad los más utilizados son la Eritromicina, Oxitetraciclina y Amoxicilina. Hay que tener en cuenta que ante el uso indiscriminado de antibióticos se van a desarrollar con facilidad resistencias (Zaragoza, 2006).

### 1.2.3 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos relativamente sencillos producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias e interfieren en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han establecido docenas de nuevos tipos de antibióticos y optimizado o sintetizado cerca de una centena (Sánchez, 2006). Un fármaco que perturba una función microbiana que no existe en células eucariotas animales va a tener una toxicidad selectiva mayor y un índice terapéutico mayor. El espectro de eficacia va a varias, dependiendo del fármaco, ya que muchos son fármacos de espectro reducido, lo que quiere decir que sólo son eficaces contra una gama pequeña de patógenos, mientras que los de espectro amplio atacan a muchas clases diferentes de patógenos (Prescott, L., *et al.*, 2002).

Los antibióticos más selectivos son los que interfieren en la síntesis de las paredes celulares bacterianas. La estreptomicina, tetraciclinas, eritromicinas, entre otros inhiben la síntesis proteica uniéndose al ribosoma de los procariotas, discriminando entre los ribosomas de procariotas y eucariotas y su índice terapéutico es bastante elevado, sin embargo no es tan favorable como los que inhiben la síntesis en pared celular (Prescott, L., *et al.*, 2002).

Su eficacia se ha visto alterada por su mal uso, que ha producido la aparición de microorganismos resistentes. Estas bacterias resistentes van a actuar impidiendo el ingreso, modificando o inactivando la droga y modificando al blanco. La gran capacidad que tienen las bacterias para mutar y transferir genes, la presencia de genes de resistencia esencialmente en plásmidos y transposones va a contribuir a su diseminación tanto entre bacterias emparentadas o patógenas como hacia bacterias no patógenas que son los reservorios de bacterias resistentes. Ahora aparecen nuevas alternativas ya sea utilizando la genómica como material de análisis de nuevos blancos, las defensas naturales del organismo huésped, u otros agentes olvidados como las bacterias predadoras y los fagos, ambos con la capacidad de destruir bacterias (Sánchez, 2006).

#### 1.2.3.1 Oxitetraciclina

La oxitetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que resulta muy eficaz ya que actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana a nivel de los ribosomas de la bacteria, impidiendo la fijación del ARN mensajero y el ARN de transferencia en los receptores respectivos. Este antibiótico es muy conocido en la industria por su extraordinaria actividad sobre los principales microorganismos que atacan a los animales en todas sus fases y es muy bueno para tratar bacterias intracelulares, gram positivas y gram negativas (Chiriboga, 1999). Las tetraciclinas van a ligarse a la subunidad 30S del



ribosoma y van a interferir con la unión aminoacil-tRNA (Prescott, L., *et al.*, 2002).

### 1.2.3.2 Amoxicilina

La amoxicilina es una aminopenicilina semisintética de amplio espectro congénere de la ampicilina. Es activa contra gérmenes Gram positivos y negativos. Este antibiótico inhibe la biosíntesis de la pared bacteriana en su tercera etapa. Algunas cepas de *Staphylococcus* y de *Haemophilus* se muestran resistentes a amoxicilina sola ya que son bacterias productoras de betalactamasa. Por esta razón se ha asociado a amoxicilina una molécula de ácido clavulánico a fin de que la proteja de la acción de la betalactamasa. En efecto, ácido clavulánico es un inhibidor irreversible de la betalactamasa impidiendo que la enzima abra el anillo betalactámico de la amoxicilina (Mandell, Petri, 1996). Las ampicilinas van a inhibir las enzimas de transpeptidación que participan en los enlaces entre las cadenas polisacáridas del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, activando las enzimas líticas de la pared celular (Prescott, L., *et al.*, 2002).

### 1.2.3.3 Eritromicina

La eritromicina es un antibiótico del grupo de los macrólidos y su nombre se debe a que poseen en común un anillo lactónico macrocíclico unido a diversos desoxiazúcares. Son sintetizados a partir del *Streptomyces* spp y la sustancia de mayor importancia y uso, de este grupo es la eritromicina, sintetizada en 1952. Se logran concentraciones adecuadas de eritromicina, cuando se administra por vía intravenosa, alcanzando cifras de 10 mg/mL, una hora después de una dosis IV de 500 a 1000 mg de lactobionato o gluceptato de eritromicina. La eritromicina se distribuye en casi todos los tejidos, excepto en el líquido cefalorraquídeo y se metaboliza fundamentalmente en el hígado y

se excreta por la bilis. Alcanza bajas concentraciones urinarias pues sólo del 2% al 15% se elimina en forma activa en la orina. La vida media plasmática es de una y media horas, pero la droga permanece activa en los tejidos, por un tiempo mayor (Gundián. *et al.*, 1998). Las eritromicinas se ligan a la subunidad 50 S del ribosoma e inhiben la elongación de la cadena peptídica (Prescott, L., *et al.*, 2002).

#### 1.2.4 Trucha arco iris

**Cuadro 1.4 Taxonomía de la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**

<b>Taxonomía de la Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b>	
Phylum	<i>Chordata</i>
Sub Phylum	<i>Vertebrata</i>
Orden	<i>Salmoniformes</i>
Sub Orden	<i>Salmonoidei</i>
Familia	<i>Salmonidae</i>
Súper clase	<i>Gnastosthomata</i>
Clase	<i>Osteichyes</i>
Sub Clase	<i>Actinopterygii</i>
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>mykiss</i>

Fuente: Sánchez, 2004

La Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se diferencia de otros miembros de la familia por una banda rojiza longitudinal que se extiende por los flancos de su cuerpo incluyendo la cabeza, pero, si bien esta coloración es típica, puede variar en algunos individuos, y estar ausente en otros (Sánchez, 2004).

#### 1.2.4.1 Origen

Es originaria de la costa oeste (costa del Pacífico) de América del Norte y luego fue introducida en América Latina. En la actualidad ha sido introducida en casi todos los ambientes propicios del mundo (Sánchez, 2004).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), fue introducida en Sudamérica a finales del siglo pasado y en el transcurso de los años se ha adaptado a la climatología y orografía; se encuentra ampliamente diseminada, ocupando numerosos ecosistemas acuáticos. La trucha adaptada al medio natural es llamada salvaje o libre, para diferenciarla de las truchas procedentes de instalaciones industriales que son denominadas domésticas; sin embargo, es difícil afirmar que las truchas existentes en los ríos procedan de reproducciones naturales, suponiendo que la mayor parte, sino son todas, procedan de repoblaciones o sueltas de alevines que escapan de la instalaciones industriales (Blanco, 1994).

En estado salvaje, la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), tiene un crecimiento más rápido que la trucha común y, con una buena alimentación puede alcanzar pesos de 250 gr en el primer año de vida; así, gracias a esta respuesta directa al aporte alimenticio disponible, traducida en términos de velocidad de crecimiento, la convierte en una especie rentable para la producción en piscifactorías (Drummond, 1988).

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) ha sido introducida en Australia, América del Sur y Sur-África, por lo que es posible obtener huevos de truchas del hemisferio sur, procedentes de peces que desovan en la época del año opuesta a los de las piscifactorías europeas o de América del Norte, teniendo huevos de trucha que eclosionan seis meses antes que los procedentes de la población nativa del norte (Drummond, 1988).

#### 1.2.4.2 Descripción

La trucha es un pez vertebrado acuático, ovíparo de aguas dulces frías y limpias, semi rústico; de cuerpo fusiforme y respiración branquial, que posee cabeza grade, radios blandos, un cuerpo cubierto de finas escamas, aleta segunda dorsal adiposa y primera de radios blandos; los músculos del cuerpo representan alrededor de la 3/5 partes del volumen total del pez y corresponden a las partes comestibles (Sánchez, 2004).

Las truchas son peces poiquiloterms, es decir, que la temperatura a la que se encuentra el agua es la misma que tiene el pez, modificándose en el mismo sentido; pero los cambios bruscos de temperatura son muy mal tolerados, por lo que a nivel industrial se necesitan aguas estables, con escasas variaciones térmicas diarias y preferentemente temperaturas de 15°C porque se considera óptima para el engorde y crecimiento de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Blanco, 1994).

La trucha es un pez carnívoro y se alimenta en la naturaleza de las presas vivas que captura, comiendo una proporción mayor de aquellos organismos que son más fácilmente alcanzados, ahorrando de esta manera energía, sobre otros que suponen riesgo y esfuerzo (Blanco, 1994). La trucha como carnívoro predador es territorial defendiendo un área o espacio en el que vive, eso afecta tanto en la naturaleza, como en los medios artificiales de cría, ya que se observan en los cultivos industriales, en donde se produce también la jerarquía social, a pesar de la alta densidad de peces con que habitualmente se trabaja (Blanco, 1994). La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) predominante adopta un puesto más idóneo, con mejores condiciones en cuanto a corriente oxígeno alimentación, en la lámina de agua sin importar a qué nivel, relegando a los subordinados a otro espacio menos favorable, a

diferencia de la trucha común que prefiere los fondos que mantiene durante su estancia en los estanques (Blanco, 1994).

Referente a la coloración varía de rosado a anaranjado dependiendo del sexo, edad, calidad del agua y tipo de alimentación. Vive en alturas superiores a los 1500 m.s.n.m. (Sánchez, 2004). Su hábitat es en aguas limpias, siendo necesario tomar en cuenta algunos elementos físico-químicos del que dependerá el óptimo desarrollo y la rentabilidad de esta especie (Sánchez, 2004).

Sus dimensiones pueden ser hasta 12 Kg y 650 mm de longitud total, dependiendo de múltiples condiciones ambientales como el ambiente en el que se desarrolla, estado nutricional, densidad poblacional o presión de pesca (Sánchez, 2004). Con respecto a otras especies de salmónidos, la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) muestra una mayor docilidad a la cautividad, tolerancia y adaptación social a la alta densidad poblacional, con comportamientos menos agresivos que la trucha común (Blanco, 1994); además, tiene un amplio margen de adaptación a las temperaturas de las aguas y a las diversas condiciones ambientales de los recintos artificiales donde se encuentra confinada, acudiendo ávida a la distribución de alimento (Blanco, 1994).

La temperatura óptima de engorde y crecimiento está entre los 13 y 21 °C. La cantidad mínima de oxígeno saturado en el agua de la trucha para sobrevivir es de 5 a 6 partes por millón, pero normalmente debe tener de 9 a 11 ppm que es casi la saturación total. La alcalinidad es otro factor importante y el pH óptimo es de 7 y 8, pero cuando se alteran estos rangos la reproducción de las truchas se interrumpe (Sánchez, 2004).

Es muy utilizada para la cría industrial en todo el mundo por su adaptabilidad al manipuleo, condiciones de alta densidad, alimentación artificial

y por soportar temperaturas más altas y aguas menos oxigenadas que otros salmónidos (Sánchez, 2004).

#### 1.2.4.3 Características corporales

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) presenta las siguientes características:

- Dos aletas dorsales, la segunda no posee radios (aleta adiposa).
- Presenta aletas ventrales en posición abdominal.
- Una aleta caudal de borde recto o casi recto.
- Aletas si radios osificados ni transformados en espinas punzantes.
- Boca grande, el maxilar sobrepasa el borde posterior del ojo.
- Si barbillas; cuerpo cubierto con escamas pequeñas.

#### 1.2.4.4 Alimentación

El alimento es otro factor importante para el buen desarrollo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), ya que se debe tener en cuenta la ración adecuada en el momento adecuado. El alimento que se suministre debe cubrir las necesidades de los peces tanto en los que a energía se refiere, como a los diferentes tipos de nutrientes que requieren para un buen desarrollo y crecimiento (Sánchez, 2004).

En la truticultura se utilizan alimentos artificiales balanceados ya que la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie carnívora y la formulación de su alimento y tasa de alimentación diaria se hace de acuerdo al tamaño, peso y estadio sexual (Sánchez, 2004).

La alimentación tiene una importancia por encima de otros trabajos en el criadero y debe alimentarse a las truchas los siete días de la semana

procurando no hacerlo muy cerca de la salida del agua porque la corriente se lleva el balanceado antes de que pueda ser consumido por las truchas (Briones, 1994).

La ración alimenticia tiene que ser bien balanceada con un nivel del 38-40% de proteína y una temperatura de 10-18°C, en la cual el aprovechamiento del alimento que se consigue es mejor. Se recomienda también la interrupción de la alimentación por un día por semana para mejorar y beneficiar la salud de la trucha (Briones, 1994).

Las sustancias que ayudan al mantenimiento de las constantes biológicas del organismo se llaman principios alimenticios y son las proteínas, lípidos, glúcidos, minerales y vitaminas, que son elementos básicos y fundamentales dentro de una dieta equilibrada. La asimilación y utilización de estos principios en los peces resulta de la interacción y coordinación de complejos procesos para absorber y trasportar a los tejidos, así como transformar estas sustancias en otras que les sirvan como fuente de energía (Blanco, 1994).

#### 1.2.4.5 Abastecimiento de Agua

Es esencial que el agua utilizada en la piscifactoría esté libre de contaminación, la concentración de oxígeno debe ser al 100% de saturación, de preferencia debe ser neutra o ligeramente alcalina (pH 7,0-7,5), debiendo evitarse valores inferiores a 6,0. (Drummond, 1988).

Debe hacerse un previo análisis químico del agua para abastecer la piscifactoría, se necesita un caudal de 5 litros de agua por segundo y por tonelada de pescado, que va a variar según la temperatura, ya que si

disminuye se va a necesitar menos agua. Se debe hacer un constante análisis en todas las estaciones del año y bajo todas las condiciones climatológicas (Drummond, 1988).

La temperatura del agua interviene en el grado de actividad metabólica de las truchas y por ello en invierno, con aguas frías, apenas ingieren alimento y su crecimiento es lento, a diferencia del verano en que este pez es muy voraz (Blanco, 1994). A mayor temperatura del agua, menor va a ser la cantidad de oxígeno en disolución, por lo que, proporcionalmente, se pueden mantener menos peces con un mismo flujo de agua, o bien se debe disponer de un mayor caudal para mantener la misma producción (Drummond, 1988).

#### 1.2.5 Identificación bacteriana

Para poder realizar las pruebas de diagnóstico para la confirmación de un patógeno es necesario el aislamiento y crecimiento de la bacteria. Generalmente se reconoce la presencia de crecimiento bacteriano por el desarrollo de colonias sobre medio sólido o de turbidez en un medio líquido. La identificación inicial de un microorganismo bacteriano puede darse teniendo en cuenta el lugar del que procede la muestra, su aspecto microscópico y la tinción Gram, su patrón de crecimiento en medios selectivos, diferenciales, enriquecidos o característicos. Después de haber examinado las características microscópicas y de crecimiento de un cultivo puro, se pueden realizar pruebas bioquímicas utilizadas frecuentemente para la identificación de bacterias ya aisladas (Prescott, L., *et al.*, 2002).

##### 1.2.5.1 Tipificación



#### 1.2.5.1.1 Aislamiento de cultivos puros

Para realizar cualquier tipo de identificación bacteriana lo primero que se debe tener es un cultivo puro –que es una población de células que proceden de una única célula– para así caracterizar una especie individual, porque no se puede estudiar adecuadamente un único tipo de microorganismo en un medio mixto (Madigan, M., *et al.*, 2006).

Según Prescott, L., *et al.*, (2002), hay varias formas de preparar cultivos puros, pero los más comunes son:

#### Siembra en placa por extensión y estrías

La siembra por extensión es una forma directa y fácil para lograr un cultivo puro y consiste en pasar un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida, conteniendo no más de un centenar de células, al centro de una placa de agar para extenderlo uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril. El número de colonias debe ser igual al número de organismos viables de la muestra tomada. Este método es usado para determinar la concentración microbiana de una muestra.

La siembra en estrías consiste en inocular la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa de agar con una asa de siembra o un hisopo, y se extiende formando estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos. De esta manera las células individuales se irán desprendiendo el asa al frotarla sobre la superficie y desarrollarán colonias aisladas

#### 1.2.5.1.2 Morfología y crecimiento de colonias

Cuando ya se han desarrollado colonias sobre superficies de agar van a permitir la identificación bacteriana porque las especies forman a menudo colonias con una forma y aspecto característico. La estructura microscópica de las bacterias varía tanto como su aspecto visual, es así que en la naturaleza las bacterias y muchos otros microorganismos crecen formando biofilms. En general, el crecimiento celular más rápido se produce en el extremo de las colonias y el crecimiento es más lento en las partes centrales más antiguas de las colonias. Estas diferencias en el crecimiento se deben a gradientes de oxígeno, nutrientes y productos tóxicos dentro de la colonia, porque en su extremo el oxígeno y los nutrientes son abundantes, mientras que en el centro el oxígeno y los nutrientes no difunden tan fácilmente y los metabolitos tóxicos no pueden eliminarse rápidamente, produciendo un crecimiento más lento (Prescott, L., *et al.*, 2002).

#### 1.2.5.2 Pruebas bioquímicas

##### 1.2.5.2.1 Tinción Gram

La tinción Gram es un método de tinción diferencial que permite la clasificación de las bacterias en grupos diferentes según sus propiedades de tinción. Este método fue desarrollado por un médico danés en 1884, llamado Christian Gram, y es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología; se lo denomina método de tinción diferencial porque divide a las bacterias en dos clases: las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Prescott, L., *et al.*, 2002).

El primer paso para de esta tinción consiste en que el frotis bacteriano se tiñe con el colorante básico cristal violeta (violeta de genciana), que es el colorante primario. Luego, se trata con una solución yodada que actúa como mordiente, es decir, el yodo aumenta la interacción entre la célula y el colorante

para que se dé un tinción más intensa. Una vez puesto el yodo se decolora el frotis lavándolo con etanol o acetona. Este paso va a producir el aspecto diferencial de la tinción de Gram ya que las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta, mientras que las Gram negativas lo pierden y aparecen incoloras. Ya para concluir, el frotis es teñido otra vez (tinción de contraste) con un colorante básico de diferente color al cristal violeta y es el más utilizado; es la safranina, que tiñe las bacterias Gram negativas de color rosa o rojo, dejando a las Gram positivas de color violeta (Prescott L., *et al.*, 2002).

#### 1.5.5.2.2 Prueba de la catalasa

Puede hacerse en tubo y debe realizarse una vez incubados los cultivos de manera inclinada para poder gotear por la pendiente peróxido de hidrógeno al 3%. La catalasa va a convertir el peróxido de hidrógeno en agua y burbujas de oxígeno, siendo este resultado tomado como positivo; en caso de no presentarse burbujas es un resultado negativo (Prescott, L., *et al.*, 2002).

Esta prueba también se puede realizar en porta objetos y para eso se usa un palillo de madera para tomar la muestra de la colonia, que luego se pone sobre una gota de peróxido que se encuentra previamente en un porta. Al igual que la prueba en un tubo, una reacción positiva presenta burbujas de gas, mientras que para que se considere una prueba catalasa negativa debe carecer de burbujas (Prescott, L., *et al.*, 2002).

#### 1.5.5.2.3 Sistemas bioquímicos manuales

La microbiología se ha beneficiado mucho de los avances tecnológicos en equipos, programas informáticos y bases de datos. En lo que respecta a métodos de detección de microorganismos en muestras biológicas se ha dado un giro de los métodos en pasos múltiples que se describieron anteriormente y se presentan ahora procedimientos y sistemas unitarios que incorporan estandarización, velocidad, reproductibilidad, miniaturización, mecanización y automatización (Prescott, L., *et al.*, 2002).

Un kit bioquímico para la identificación de los miembros de la familia Lactobacillaceae y otras bacterias Gram positivas es el sistema API 50CH. Para esto el cultivo a ser identificado tiene que estar puro y una vez verificada su pureza se prepara el inóculo en el medio adecuado. Después se prepara la galería que consta de 5 filas conteniendo cada una 10 tubos numerados. La inoculación se realiza repartiendo la suspensión bacteriana con ayuda de una pipeta estéril en los 50 tubos de la galería, teniendo precaución de inclinar ligeramente la cámara de incubación, colocar la punta de la pipeta en el borde del tubo para que cuando se inocule el tubo no rebase el límite superior del mismo a fin de conservar una buena anaerobiosis. Una vez incubados los tubos se procede a sellarlos con aceite vegetal (Parafina) y se incuban las galerías a la temperatura óptima de crecimiento del grupo de microorganismo estudiado. La lectura de las reacciones observadas se ven por 2 parámetros, la intensidad y la velocidad de aparición. Para leer las galerías debe hacerse en un tiempo de incubación definido (3, 6, 24, o 48 horas) dependiendo del microorganismo y del tipo de reacción estudiada. De manera semicuantitativa se da un valor 0 a las reacciones negativas y 5 a las reacciones intermedias que se toman como positivas.

#### 1.2.6 Pruebas de antagonismo

Para realizar un tratamiento adecuado es necesario determinar la eficacia antimicrobiana frente a los patógenos específicos a fin de mostrar qué agentes son más eficaces contra determinado patógeno y dar una estimación de la dosis terapéutica adecuada (Prescott, L., *et al.*, 2002). Una tarea muy importante para determinar un efecto antagónico es ver la sensibilidad a los antimicrobianos de los aislados microbianos. Se puede ver la sensibilidad de un cultivo microbiano por el método de difusión en agar o utilizando una técnica de dilución en tubo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de una gema que vaya a inhibir el crecimiento. El método de la CIM que va a analizar la sensibilidad antibiótica conlleva un ensayo de dilución del antibiótico en los pocillos y después se inoculan todos los pocillos con una cantidad estándar del mismo organismo que se usa como prueba y al final se mide la turbidez (Madigan, M., *et al.*, 2006). La prueba de difusión de agar es bastante simple, ya que cuando se coloca un disco impregnado de antibiótico en agar en el que previamente se ha inoculado la bacteria objeto de la prueba, el disco va a captar humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia afuera, a través del agar, produciendo un gradiente de concentración de antibiótico. A medida que aumenta la distancia desde el disco va a disminuir la concentración de antibiótico y sólo los patógenos más sensibles resultan dañados. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano, en torno al disco se forma un anillo claro. Cuanto más ancha es la zona de inhibición, más sensible es el patógeno. El diámetro del anillo va a ser función de la concentración inicial del antibiótico, de su solubilidad y de su tasa de difusión a través del agar, por lo tanto, no se puede emplear el diámetro de la zona de inhibición para comparar directamente la eficacia de dos antibióticos diferentes (Prescott, L., *et al.*, 2002).

Otra técnica recomendada es la de difusión en agar denominada *método de Kirby-Bauer*, que consiste en inocular una placa con un medio de cultivo adecuado para distribuir una muestra de cultivo uniformemente por toda la superficie del agar. Después se van a colocar sobre la placa discos de papel filtro con una concentración conocida de distintos antimicrobianos, para luego notar la presencia de zonas de inhibición alrededor de los discos (Madigan, M.,

et al., 2006). La placa se coloca inmediatamente en una incubadora y después de un tiempo determinado de incubación se mide los diámetros de inhibición en milímetros (Prescott, L., et al., 2002).

**Cuadro 1.5 Tamaños de las zonas de inhibición en algunas pruebas de susceptibilidad a discos de antimicrobianos (Madigan, M., et al., 2006)**

Antibiótico	Diámetro de la zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>			
	Cantidad en el disco	Resistente	Intermedia	Sensible
Ampicilina <sup>b</sup>	10µg	11 o menos	12-13	14 o más
Ampicilina <sup>c</sup>	10µg	28 o menos	—	29 o más
Cefoxitina	30µg	14 o menos	15-17	18 o más
Cefalotina	30µg	14 o menos	15-17	18 o más
Cloranfenicol	30µg	12 o menos	13-17	18 o más
Clindamicina	2µg	14 o menos	15-16	17 o más
Eritromicina	15µg	13 o menos	14-17	18 o más
Estreptomina	10µg	11 o menos	12-14	15 o más
Gentamicina	10µg	12 o menos	13-14	15 o más
Kanamicina	30µg	13 o menos	14-17	18 o más
Metilicina <sup>c</sup>	5µg	9 o menos	10-13	14 o más
Neomicina	30µg	12 o menos	13-16	17 o más
Nitrofurantoína	300µg	14 o menos	15-16	17 o más
Penicilina G <sup>d</sup>	10 unidades	28 o menos	—	29 o más
Penicilina G <sup>e</sup>	10 unidades	11 o menos	12-21	22 o más
Polimixina B	300 unidades	8 o menos	9-11	12 o más
Tetraciclina	30µg	14 o menos	15-18	19 o más
Trimetoprim-sulfametoxazol	1,25/23,75 µg	10 o menos	11-15	16 o más
Tobramicina	10µg	12 o menos	13-14	15 o más

Fuente: Madigan, M., et al., 2006

### 1.3 Hipótesis

“Los probióticos *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* presentan mejor efecto antagónico que los antibióticos Oxitetraciclina, Amoxicilina y Eritromicina contra el patógeno *Carnobacterium piscícola*”.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1 Participantes

El presente trabajo fue realizado por la tesista Laura Estefanía Reyes Haro.

## 2.2 Zona de estudio

El proyecto se desarrolló en los Laboratorios de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, Área de Agrobiotecnología, ubicados en la en la Hacienda “El Prado”, Parroquia San Fernando, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, a 78°24'44” (O) y 0°23'20”(S), a una altitud de 2748 m. Las muestras de truchas arco iris se obtuvieron del proyecto de trucha arcoíris, Pailones, que se encuentran a una altitud de 2940 msnm.

## 2.3 Período de tiempo de investigación

El presente proyecto se inició en el mes de Julio del 2009 y finalizó en el mes de mayo del 2010.

## 2.4 Diseño

Tomando en cuenta que para la parte del antagonismo se ocupó la bacteria patógena *Carnobacterium piscícola* contra los dos probióticos *L. plantarum* y *L. casei* a tres diferentes concentraciones y a tres diferentes temperaturas, y los tres antibióticos a una misma concentración, se aplicó un D.C.A en arreglo grupal y dentro de cada grupo se evaluó el factorial

correspondiente para cada probiótico, antibiótico y temperatura con 3 repeticiones.

<u>F de V</u>	<u>GL</u>	
Total	80	
Tratamientos	(26)	
Entre grupos	2	
G3vsG1,G2		1
G1vsG2		1
DG1 ( <i>L. plantarum</i> )	(8)	
Dosis		2
Temperatura		2
DxT		4
DG2 ( <i>L. casei</i> )	(8)	
Dosis		2
Temperatura		2
DxT		4
DG3 (A1, A2, A3)	(8)	
Antibióticos		2
Temperatura		2
DxT		4
Error	54	

**Tabla 2.1 Lista de descripción de los tratamientos a ser utilizados para la inhibición del crecimiento del patógeno *Carnobacterium piscícola*.**



Tratamientos	Descripción	Antagonistas	Dosis (ufc/ml)	Temperatura (°C)
T1	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C1= 8
T2	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C1= 8
T3	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C1= 8
T4	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C2= 15
T5	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C2= 15
T6	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C2= 15
T7	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C3= 20
T8	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C3= 20
T9	Probiótico 1	<i>L. plantarum</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C3= 20
T10	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C1= 8
T11	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C1= 8
T12	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C1= 8
T13	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C2= 15
T14	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C2= 15
T15	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C2= 15
T16	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D1= 10 <sup>5</sup>	C3= 20
T17	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D2= 10 <sup>7</sup>	C3= 20
T18	Probiótico 2	<i>L. casei</i>	D3= 10 <sup>9</sup>	C3= 20
T19	Antibiótico 1	Oxitetraciclina	D4= 30 mcg	C1= 8
T20	Antibiótico 2	Amoxicilina	D5= 25 mcg	C1= 8
T21	Antibiótico 3	Eritromicina	D6= 15 mcg	C1= 8
T22	Antibiótico 1	Oxitetraciclina	D4= 30 mcg	C2= 15
T23	Antibiótico 2	Amoxicilina	D5= 25 mcg	C2= 15
T24	Antibiótico 3	Eritromicina	D6= 15 mcg	C2= 15
T25	Antibiótico 1	Oxitetraciclina	D4= 30 mcg	C3= 20
T26	Antibiótico 2	Amoxicilina	D5= 25mcg	C3= 20
T27	Antibiótico 3	Eritromicina	D6= 15 mcg	C3= 20

Además se determinó el coeficiente de varianza, se hicieron pruebas de Duncan al 5% para temperaturas, dosis y tratamientos. Se realizó regresión y correlación de las temperaturas con cada una de las variables en estudio, y

regresión y correlación de las dosis con cada una de las variables en estudio. También se hizo un DMS al 5% entre probióticos y entre antibióticos.

## 2.5 Procedimientos

### 2.5.1 Disección de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Para el aislamiento de la microflora intestinal se necesitó recolectar truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que permanecieron 48 horas sin alimentación. Cumplidas las 48 horas se las sumergió en una solución del 100 ppm de aceite de clavo para poder manipularlas y, una vez que el eje de nado perdió su funcionalidad, se procedió a retirarlas del agua, pesarlas en una balanza y empezar la disección con un corte desde la región posterior (a la altura de la cloaca u ano) hasta la región anterior (aletas pectorales) con la ayuda de una tijera de disección. Se continuó el corte hasta llegar a la región opercular, en donde se hizo un corte vertical ascendente y se siguió la línea lateral para finalizar en el punto de inicio (Quintero, 2006). De esta manera se tuvo acceso al intestino, el cual fue retirado y puesto en una caja petri estéril para ser llevado a una cámara de flujo de bioseguridad para pesarlo, abrirlo con un corte longitudinal y poder retirar el contenido del intestino que también fue pesado.

### 2.5.2 Aislamiento e Identificación de microflora bacteriana del intestino

Para el aislamiento de la flora intestinal se hizo un raspado del intestino a fin de separar el contenido del mismo con un asa estéril de vidrio y luego se puso en tubos con agua estéril salina el contenido, se hicieron diluciones hasta la  $10^{-5}$ , del intestino con el contenido y del intestino solo. Después se homogenizó en el vortex por 15 segundos y se procedió a inocular en los

medios de cultivo TSA Merck (Tripiticasa Soya Agar) y en el medio de cultivo específico para *Lactobacillus* que es el medio MRS Merck (Man, Rogosa y Sarpe), al cual se le añadió fosfomicina y cicloheximida para volverlo más selectivo. Las respectivas cajas petri fueron incubadas a 30°C, pero las de MRS fueron incubadas en anaerobiosis logrando este ambiente con el uso de bolsas de Anaerocult (MERCK), de 48 a 72 horas (Vargas, 2002). Para la identificación de las bacterias obtenidas en los medios de cultivo TSA Merck y MRS Merck, se utilizaron pruebas bioquímicas como la tinción de Gram y la prueba de la catalasa, realizadas en el laboratorio de Agrobiotecnología del IASA, y posteriormente se mandaron a realizar en el laboratorio de Microbiología en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, la identificación de los géneros bacterianos.

Para la identificación *Carnobacterium piscícola* se utilizó el protocolo según el proveedor Biomerieux del Kit API 50 CH, específico para especies de *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.

### 2.5.3 Pruebas de antagonismo

Se usó los probióticos comerciales liofilizados *L. plantarum* y *L. casei*; se utilizó MRS Merck caldo para activarlas, y agua destilada estéril para sus respectivas diluciones. Para las pruebas de antagonismo se hizo la siembra del patógeno *Carnobacterium piscícola* en cajas Petri con MRS Merck agar utilizando hisopos estériles, con el fin de conseguir un crecimiento en toda la caja a manera de un césped. Con el patógeno sembrado en toda la caja Petri se procedió a inocular el respectivo probiótico a concentraciones de  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^9$  ufc/ml en los orificios previamente realizados. Para los sensidiscos de los tres antibióticos se los colocó en la caja Petri a concentraciones de 30 mcg (Oxitetraciclina), 25 mcg (Amoxicilina) y 15 mcg (Eritromicina). Cuando ya se hizo la siembra de los dos probióticos y los tres antibióticos, se dejaron las

cajas a tres temperaturas diferentes (8, 15 y 20°C). Durante 5 días se midió el halo de inhibición formado en la superficie de la bacteria indicadora.

**Tabla 2.2 Dosis de los probióticos comerciales para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola*.**

<i>L. plantarum</i> x Dosis (P1D)	<i>L. casei</i> x Dosis (P2D)	Dosis (Ufc/ml)
P1D1	P2D1	10 <sup>5</sup>
P1D2	P2D2	10 <sup>7</sup>
P1D3	P2D3	10 <sup>9</sup>

**Tabla 2.3 Antibióticos a ser probadas para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola*.**

Temperatura (C)	Dosis (mcg)
A1	30
A2	25
A3	15

**Tabla 2.4 Temperaturas a ser probadas**

Temperatura (C)	°C
C1	8
C2	15
C3	20

#### 2.5.4 Análisis de datos

Se determinó el efecto antagónico de los tratamientos para el control del patógeno *Carnbacterium piscícola* con la formación de halos mayores a 5 mm de diámetro durante 5 días de medición.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Disección de la Trucha

Una vez sedada la trucha con el aceite de clavo, se procedió a pesar la trucha, diseccionarla y pesar tanto el intestino y el contenido del intestino (tabla 3.1).



**Figura 3.1 Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) lista para la disección una vez sedada.**



**Figura 3.2 Intestinos extirpados de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).**

**Tabla 3.1 Pesos de truchas, intestino y contenido intestinal.**



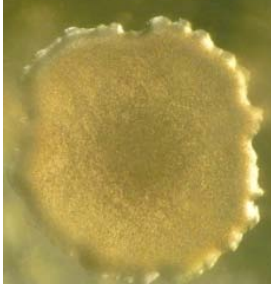



No. Trucha	Peso trucha (g)	Peso intestino (g)	Peso contenido (g)
<b>1</b>	65.0	2.7	1.2
<b>2</b>	94.5	5.5	1.6
<b>3</b>	77.5	3.6	1.5
<b>4</b>	72.1	2.4	
<b>5</b>	55.8	2.9	

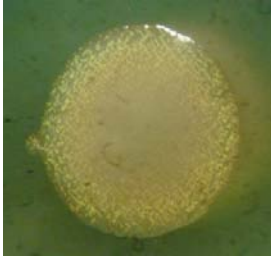
### 3.2 Aislamiento e identificación bacteriana

Una vez realizadas las siembras de los intestinos y 5 g de sus contenidos –en los dos medios de cultivo–, se dejó incubar por 72 horas. Se encontró crecimiento de numerosas colonias bacterianas con formas diversas.

Se tomó 10 colonias bacterianas diferentes y se realizó la identificación de las mismas para luego purificarlas y mandar a determinar los géneros bacterianos en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Central. De las 10 colonias se indentificó 7 géneros bacterianos diferentes (Anexo B).

**Tabla 3.2 Colonias identificadas de las muestras predominantes del aislamiento bacteriano de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).**

Colonia	Descripción	Identificación
	Colonia rizoide, plana, margen lobulado, blanca, superficie brillante	<i>Bacillus (alvei)</i>
	Colonia rizoide, plana, margen lobulado, blanca, superficie brillante	<i>Bacillus (coagulans)</i>
	Colonia amiboide, plana, margen ondulado, blanca, superficie opaca	<i>Aeromonas spp.</i>
	Colonia amiboide, plana, margen lobulado, blanca, superficie opaca	<i>Flavobacterium spp.</i>
	Colonia circular, plana, margen ondulado, blanca, superficie brillante	<i>Proteus spp.</i>
	Colonia puntiforme, convexa, margen entero, blanca, superficie brillante, anaerobia estricta	<i>Lactobacillus spp.</i>



Colonia circular, convexa, margen  
entero, blanca, superficie  
brillante, anaerobia facultativa

*Carnobacterium  
piscícola*

### 3.3 Identificación *Carnobacterium piscícola*.

Para la identificación de *Carnobacterium piscícola* se utilizó el kit API 50CHL. De los 7 géneros identificados se seleccionó al género que sobrevivió a condiciones aeróbicas, además de coincidir en los resultados de las pruebas de catalasa, tinción Gram y morfología.



**Figura 3.3 Inoculación de los pocillos del kit API 50CHL con el medio de cultivo específico.**





**Figura 3.4 Reacción de los azúcares del kit API 50 CHL transcurridos 24 horas.**



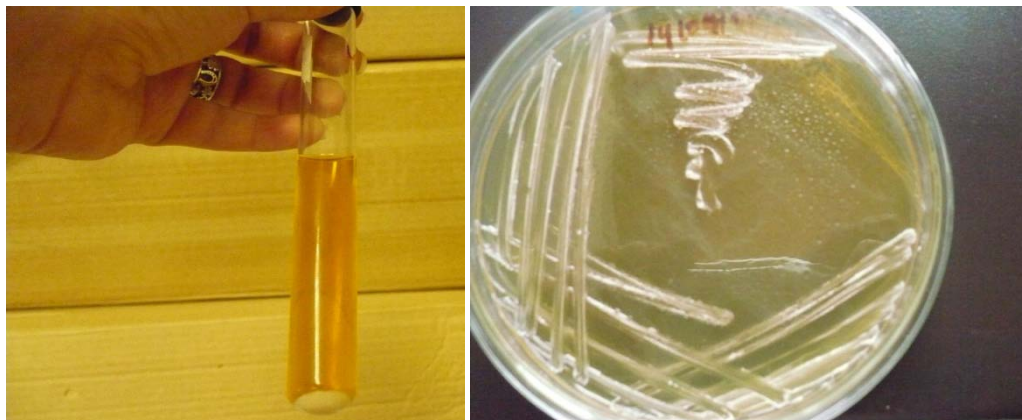
**Figura 3.5 Reacción de los azúcares del kit API 50 CHL transcurridos 48 horas.**

### 3.4 Pruebas de antagonismo

Para empezar con las pruebas de antagonismo se tuvo que activar los dos probióticos comerciales, *L. plantarum* y *L. casei*, en caldo de MRS (Merck) a 35°C y a las 24 horas se obtuvo ya un buen crecimiento de ambas bacterias.



**Figura 3.6 Activación del probiótico comercial *L. plantarum* en medio líquido y sólido de MRS.**



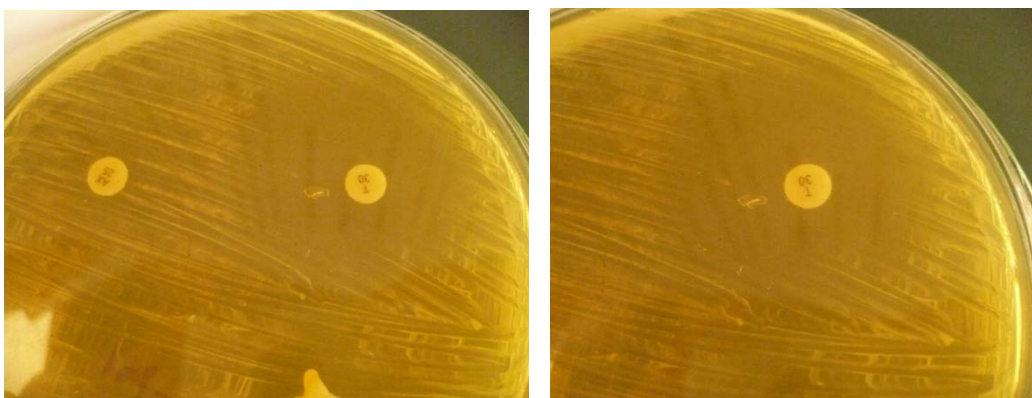
**Figura 3.7 Activación del probiótico comercial *L. casei* en medio líquido y sólido de MRS.**

Se hizo crecer el patógeno *Carnobacterium piscícola* en medio MRS (Merck) agar por 24 horas.

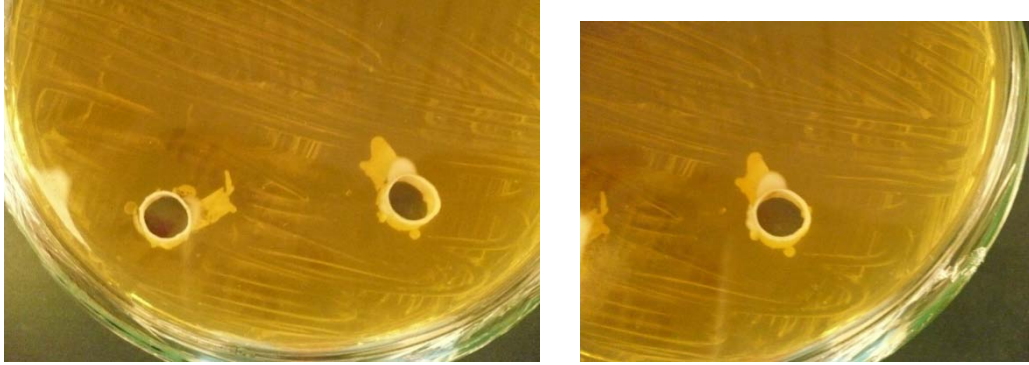


Figura 3.8 *Carnobacterium piscícola* en MRS (Merck) agar.

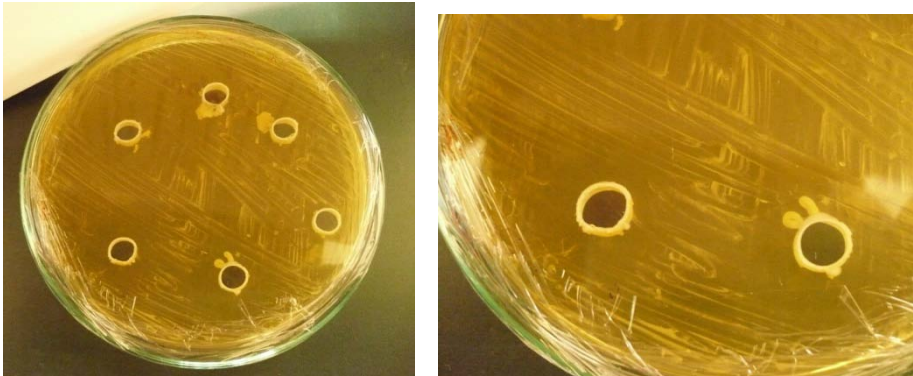
A las 24 horas de crecimiento de las 3 bacterias se procedió a realizar las siembras para las pruebas piloto de antagonismo que se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas.



**Figura 3.9 Antagonismo producido por el antibiótico oxitetraciclina (30mcg) a las 72 horas de incubación.**



**Figura 3.10** Antagonismo producido por el probiótico *L. casei* con una concentración de  $10^9$  ufc/ml, a las 72 horas de incubación.



**Figura 3.11** Antagonismo producido por el probiótico *L. plantarum* con una concentración de  $10^9$  ufc/ml, a 72 horas de incubación.

Se puede observar que los dos probióticos comerciales produjeron inhibición de crecimiento del patógeno *Carnobacterium piscícola* con un halo superior a 1 cm, mientras que de los dos antibióticos sólo la oxitetraciclina produjo inhibición de crecimiento. Como se puede ver en la figura 3.9, a la izquierda la amoxicilina no tuvo un efecto antagonístico sobre el patógeno y a la derecha la oxitetraciclina fue la que mejor inhibición presentó de todos los 4 tratamientos, con un halo aproximado a 1.5 cm.

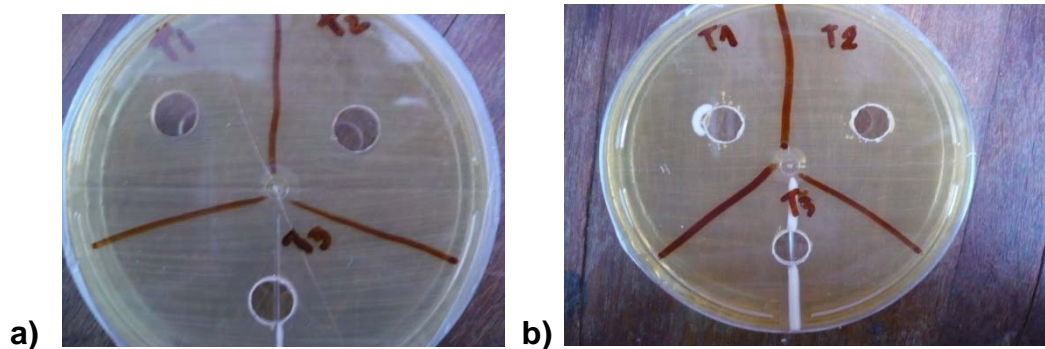


Una vez hecha la prueba piloto y practicada la técnica se procedió a hacer los 27 tratamientos con tres repeticiones y se tomó los datos por 5 días seguidos.

### Primero y quinto día

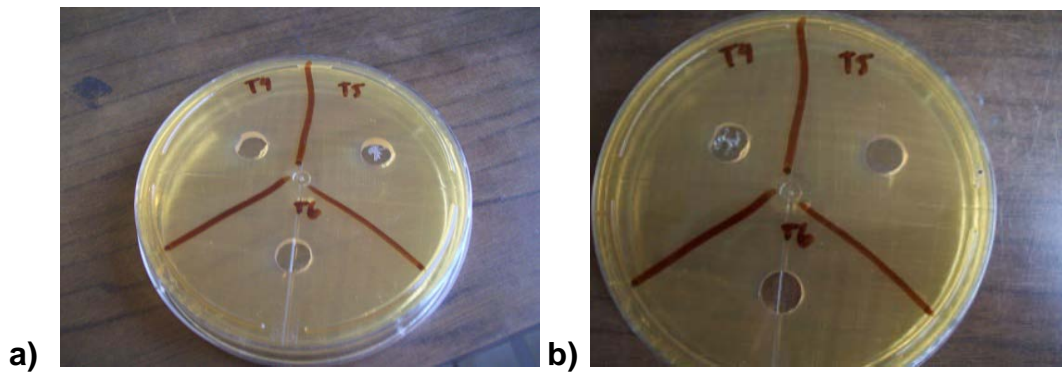
#### *Lactobacillus plantarum*

Para el primer día en los tratamientos 1, 2 y 3 a temperatura de 8°C y concentraciones de  $10^5$  ufc/ml,  $10^7$  ufc/ml y  $10^9$  ufc/ml, respectivamente, no se observó ningún efecto antagónico, ya que el patógeno no presentó mayor crecimiento en la caja; transcurridos cinco días no se presentó ningún halo de inhibición porque el crecimiento del patógeno no se notó (Anexo C).



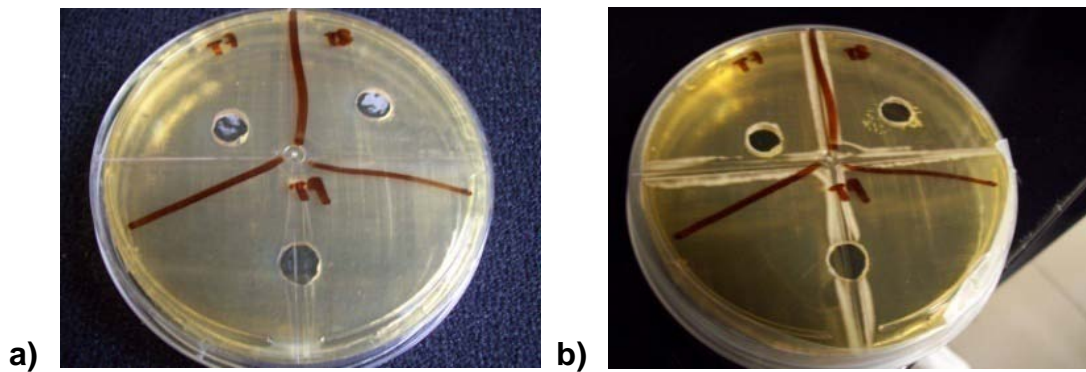
**Figura 3.12 Efecto antagónico de los tratamientos 1, 2 y 3 a) primer día y b) quinto día.**

Para los tratamientos 4 y 5 a una temperatura de 15°C a concentraciones de  $10^5$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/ml respectivamente no se observó ningún efecto antagónico durante los cinco días, pero para el tratamiento 6 a una concentración de  $10^9$  ufc/ml hubo una inhibición de 0.9 cm en el primer día y de 1.8 cm para el quinto día, obteniendo un buen antagonismo y el patógeno no presentó mayor crecimiento (Anexo B).



**Figura 3.13 Efecto antagónico de los tratamientos 4, 5 y 6 a) primer día y b) quinto día.**

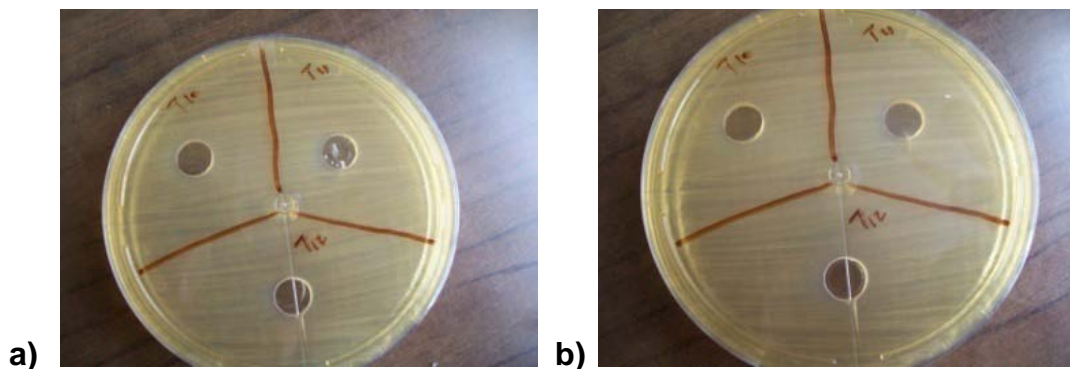
En los tratamientos 7 y 8 a una temperatura de 20°C a concentraciones de  $10^5$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/ml, no presentó efecto antagónico a lo largo de los cinco días, sin embargo para el tratamiento 9 a una concentración de  $10^9$  ufc/ml hubo una inhibición de 2.60 cm en el primer día y 4.5 cm en el último día, mostrando un marcado efecto antagónico y el patógeno no tuvo mayor presencia. (Anexo C).



**Figura 3.14 Efecto antagónico de los tratamientos 7, 8 y 9 a) primer día y b) quinto día.**

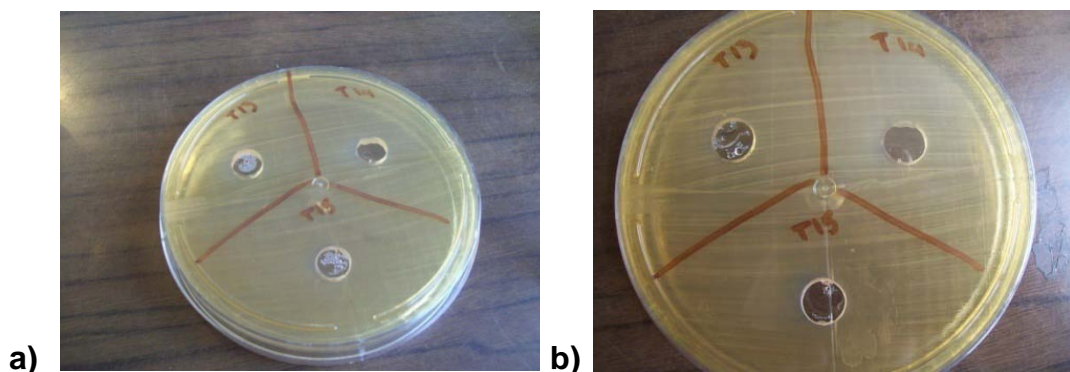
*Lactobacillus casei*

Para el primero día en los tratamientos 10 y 11, a una temperatura de 8°C, a concentraciones de  $10^5$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/ml, respectivamente, no se determinó ningún efecto antagónico hasta el quinto día que se midió, pero el tratamiento 12 a una concentración de  $10^9$  ufc/ml produjo una inhibición al primer día de 0.9 cm a 1.1 cm en el día cinco y el patógeno presentó un buen crecimiento en la caja (Anexo C).



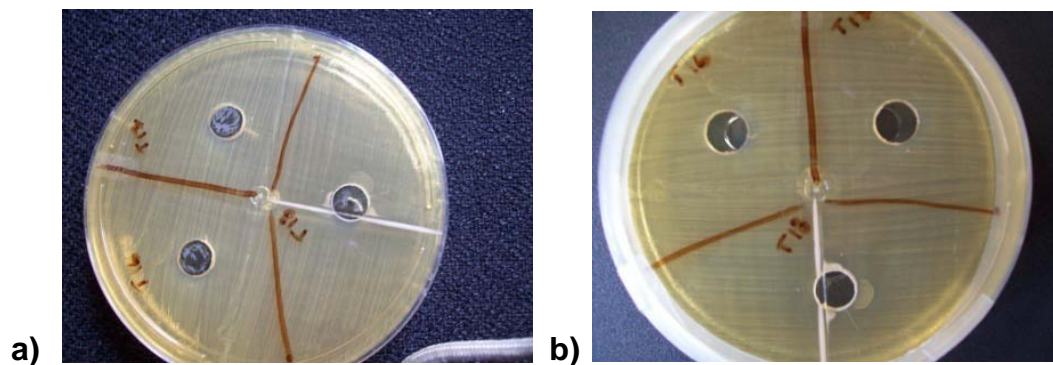
**Figura 3.15 Efecto antagónico de los tratamientos 10, 11 y 12 a) primer día y b) quinto día.**

Durante los cinco días de medición, en los tratamientos 13 y 14, a una temperatura de 15°C, a concentraciones de  $10^5$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/ml, respectivamente, no hubo ningún efecto antagónico, pero para el tratamiento 15 a una concentración de  $10^9$  ufc/ml había una inhibición de 0.9 cm al primer día y 1.1 cm al quinto día y el patógeno se desarrolló en la caja. (Anexo C).



**Figura 3.16 Efecto antagónico de los tratamientos 13, 14 y 15 a) primer día y b) quinto día.**

En los tratamientos 16 y 17 en los cinco días, a una temperatura de 20°C, a concentraciones de  $10^5$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/ml, respectivamente, no se observó algún efecto antagónico, mientras que para el tratamiento 18 a una concentración de  $10^9$  ufc/ml hubo un halo de inhibición de 1.5 que no varió desde el primer día y presentó un crecimiento del patógeno en toda la caja. (Anexo C).



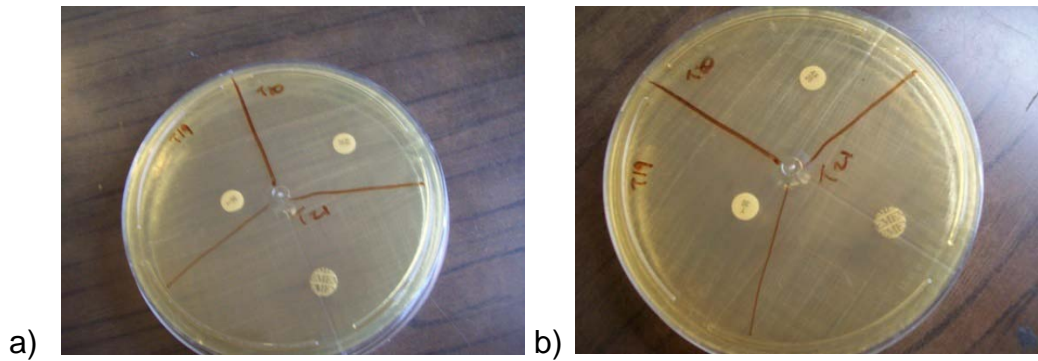
**Figura 3.17 Efecto antagónico de los tratamientos 16, 17 y 18 a) primer día y b) quinto día.**

### Antibióticos

Los tratamientos 20, 23, 26 a una concentración de 25 mcg no presentaron inhibición significativa en los cinco días de medición (Anexo B).

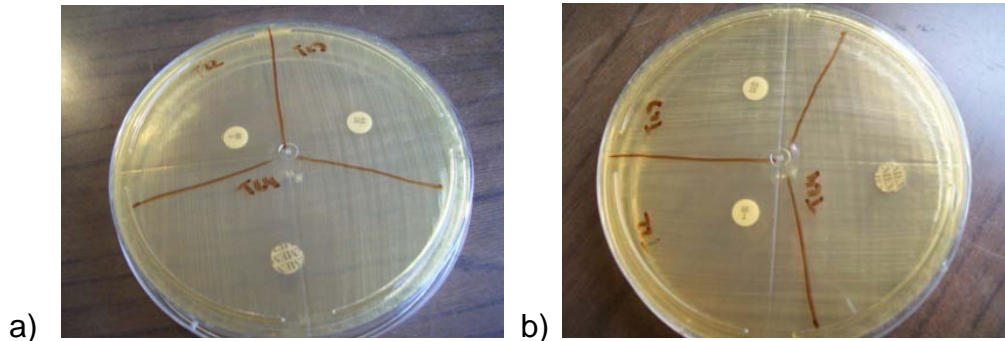
A una temperatura de 8°C el tratamiento 19 con concentración de 30 mcg, tuvo una inhibición de 1.3 cm el primer día y 2.1 cm el quinto día. Para el tratamiento 21 a una concentración de 15 mcg se encontró una inhibición de 1.10 cm en el primer día y 1.5 cm para el último día. Hubo poco crecimiento del patógeno en la caja (Anexo C).





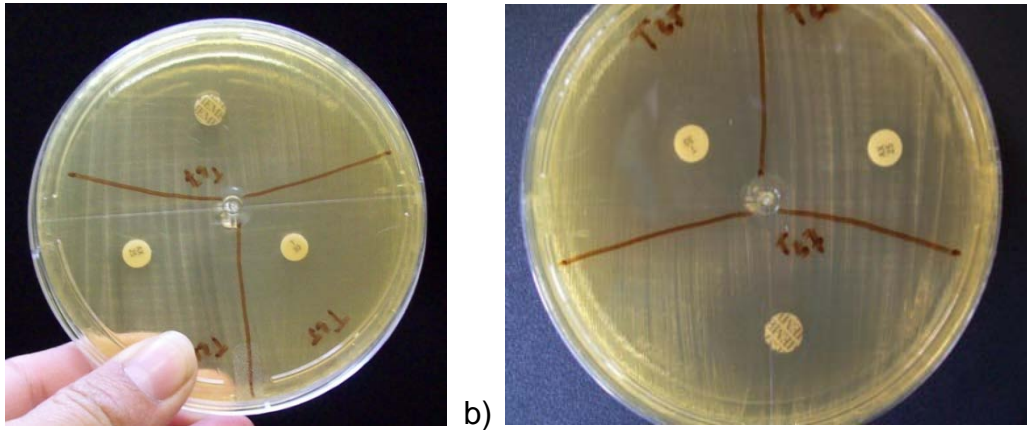
**Figura 3.18 Efecto antagónico de los tratamientos 19, 20 y 21 a) primer día y b) quinto día.**

Con una temperatura de 15°C en el tratamiento 22 a una concentración de 30 mcg se encontró una inhibición de 1.1 cm al primer día y de 2.1 cm en el quinto día. El tratamiento 24 a una concentración de 15 mcg no tuvo inhibición en los primeros días, pero para el quinto día presentó un halo de inhibición de 1.5 cm y hubo poco crecimiento del patógeno en la caja (Anexo B).



**Figura 3.19 Efecto antagónico de los tratamientos 22, 23 y 24 a) primer día y b) quinto día.**

En el tratamiento 25 a 20°C con 30 mcg de concentración se obtuvo una inhibición de 2 cm en el primer día y de 2.5 cm en el quinto día. Con el tratamiento 27, a una concentración de 15 mcg, se presentó una inhibición de 1.5 cm al primer día y 2.1 cm al quinto día y se encontró poco crecimiento del patógeno en la caja (Tabla 3.5).



**Figura 3.20 Efecto antagónico de los tratamientos 25, 26 y 27 a) primer día y b) quinto día.**

### 3.4.1 Efecto antagónico

#### Tratamientos y Grupos

**Tabla 3.3 Análisis de varianza para tratamientos y grupos de estudio bajo la acción del patógeno *Carnobacterium piscícola*, en 5 días de evaluación.**

Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
<b>Total</b>	80					
<b>Tratamientos</b>	26	0,074**	0,094**	0,121**	0,140**	0,155**
<b>entre grupos</b>	2	0,108*	0,128*	0,288**	0,376**	0,412**

Al establecer el análisis de varianza para los diámetros de los halos de inhibición se encontró diferencias estadísticas a nivel del 1%. Los grupos en estudio se diferenciaron a nivel del 5% hasta el segundo día, mientras que en el resto de evaluaciones se diferenció a nivel del 1%. (Tabla 3.3).

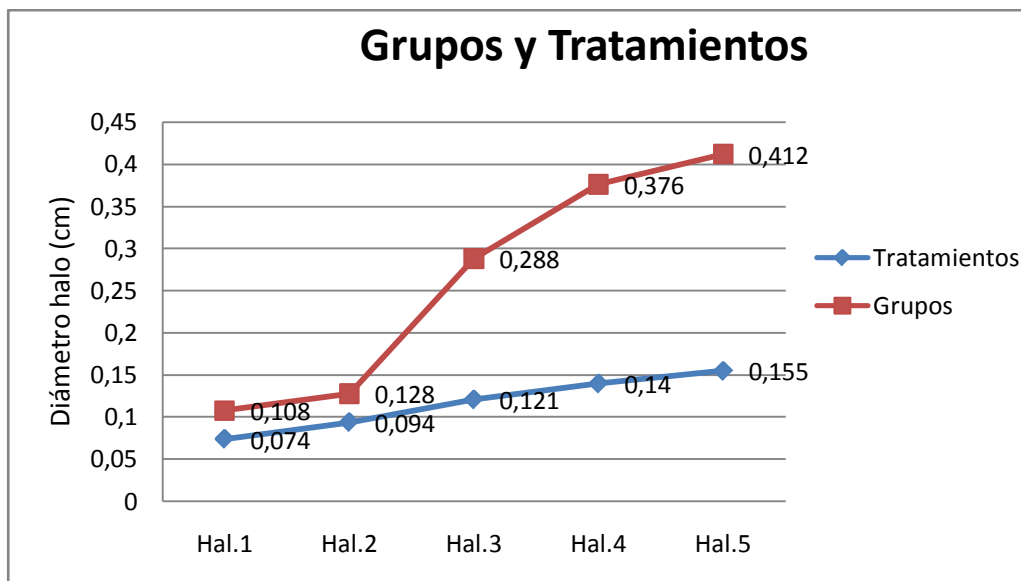


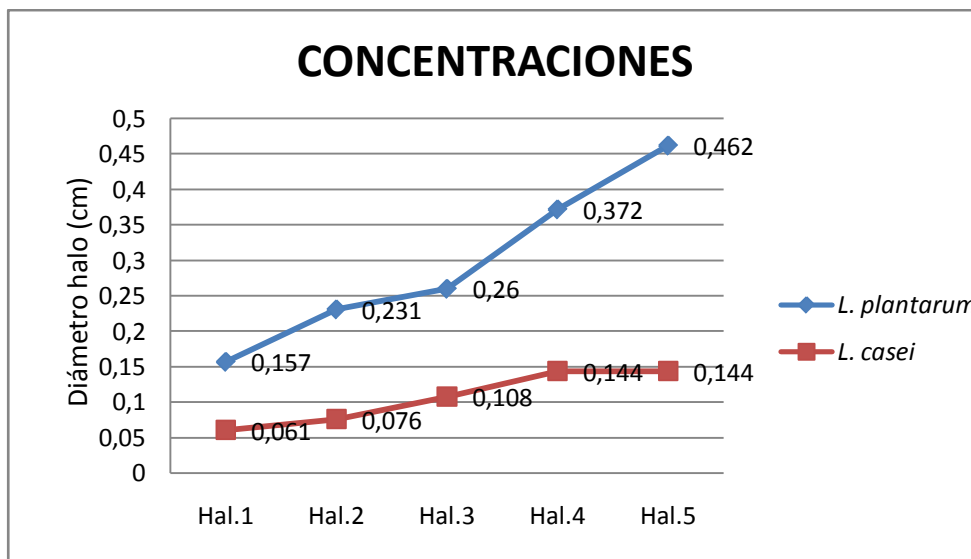
Figura 3.21 Análisis de varianza para los tratamientos y grupos en las cinco evaluaciones.

### Grupos 1 y 2

Tabla 3.4 Análisis de varianza para dosis, temperatura e interacción del grupo 1 (*L. plantarum*) y grupo 2 (*L. casei*) bajo la acción del patógeno *Carnobacterium piscícola*, en 5 días de evaluación.

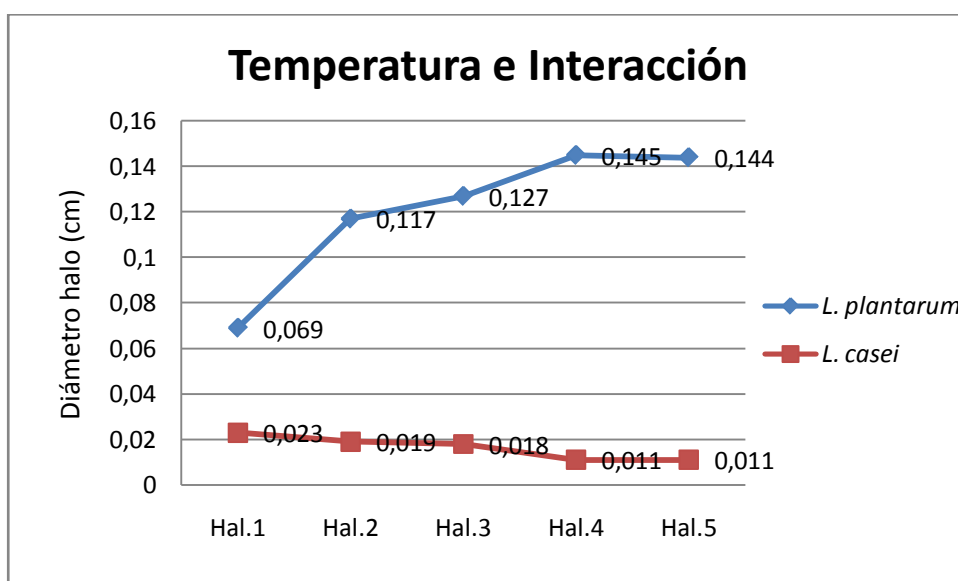
Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
DG1 ( <i>L. plantarum</i> )	8	0.091**	0,145**	0,160**	0,202**	0,223**
Dosis	2	0.157**	0,231**	0,260**	0,372**	0,462**
Temperatura	2	0.069**	0,117**	0,127**	0,145**	0,144**
DxT	4	0.069**	0,117**	0,127**	0,145**	0,144**
DG2 ( <i>L. casei</i> )	8	0,032**	0,034**	0,041**	0,044**	0,044**
Dosis	2	0,061**	0,076**	0,108**	0,144**	0,144**
Temperatura	2	0,023**	0,019**	0,018*	0,011 <sup>ns</sup>	0,011 <sup>ns</sup>
DxT	4	0,023**	0,019**	0,018**	0,011 <sup>ns</sup>	0,011 <sup>ns</sup>

Dentro del grupo 1 (*L. plantarum*) y grupo 2 (*L. casei*) las concentraciones se diferenciaron estadísticamente al nivel del 1% (Tabla 3.4).



**Figura 3.21** Análisis de varianza para las concentraciones de los grupos 1 y 2 en las cinco evaluaciones.

Mientras que las temperaturas en el grupo 1 se diferenciaron a nivel de 1% en cada una de las evaluaciones, pero en el grupo 2 se diferenciaron estadísticamente hasta el segundo día, para luego equipararse y ser estadísticamente iguales. La interacción en el grupo 1 fue significativa y se diferenció a lo largo de todas las interacciones, pero en el grupo 2 únicamente se presentó significancia estadística hasta el segundo día, lo que manifiesta que a partir del segundo día dejan de ser dependientes la concentración con la temperatura (Tabla 3.4).



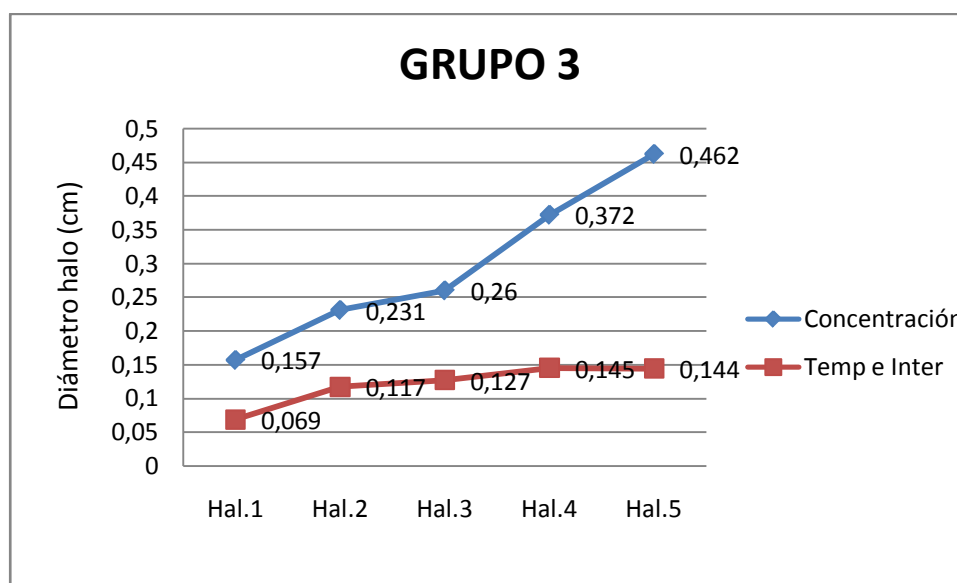
**Figura 3.22** Análisis de varianza para las temperaturas e interacción de los grupos 1 y 2 en las cinco evaluaciones.

### Grupo 3 (Antibióticos)

**Tabla 3.5 Análisis de varianza para dosis, temperatura e interacción del grupo 3 (Antibióticos) bajo la acción del patógeno *Carnobacterium piscícola*, en 5 días de evaluación.**

Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
DG1 ( <i>L. plantarum</i> )	8	0,091**	0,145**	0,160**	0,202**	0,223**
Dosis	2	0,157**	0,231**	0,260**	0,372**	0,462**
Temperatura	2	0,069**	0,117**	0,127**	0,145**	0,144**
DxT	4	0,069**	0,117**	0,127**	0,145**	0,144**

Con respecto al tercer grupo se encontró diferencias estadísticas a nivel del 1% entre los tipos de antibióticos, dosis, temperatura e interacción (Tabla 3.5).



**Figura 3.23 Análisis de varianza para el grupo 3 en las cinco evaluaciones.**

## Promedios generales

**Tabla 3.6 Análisis de varianza de los promedios generales, en 5 días de evaluación.**

Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
Error	54	0,169	0,006	0,007	0,008	0,007
x transformado	54	1,320	1,330	1,360	1,380	1,390
x real	54	0,770	0,810	0,900	0,970	1,000
cv	54	4.245	5.687	6.337	6.274	6.192

Los promedios generales de los diámetros obtenidos durante los cinco días de evaluación se fueron incrementando de 0.77 cm al primer día hasta 1.00 cm, al quinto día, con coeficientes de variación entre 4.24 a 6.19 % (Tabla 3.6).

## GRUPOS

**Tabla 3.7 Promedios del crecimiento del halo entre los grupos en estudio.**

Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
G1(L. plantarum)	1	0,718 b	0,782 b	0,800 b	0,863 b	0.907 b
G2 (L. casei)	1	0,626 b	0,641 b	0,670 b	0,696 b	0,696 b
G3 (Antibióticos)	1	0,963 a	1.015 a	1.226 a	1.341 a	1.389 a

La utilización de los antibióticos se constituyó en un medio funcional para la inhibición del crecimiento de la bacteria *Carnobacterium piscícola*, pues ésta fue incrementando su diámetro a lo largo de cada una de las evaluaciones y se diferencian estadísticamente (Tabla 3.7).

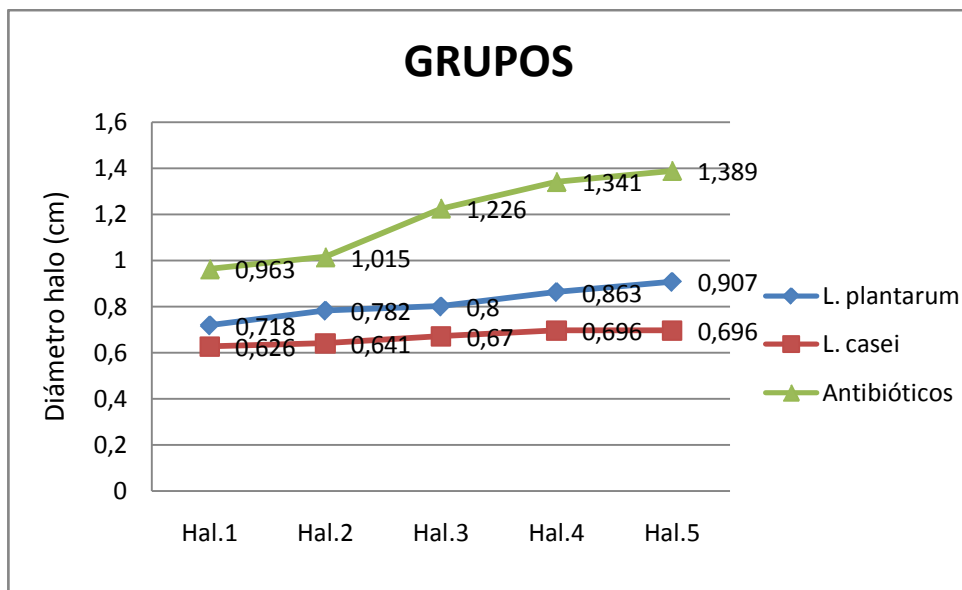


Figura 3.24 Comparación entre los tres grupos probados contra el patógeno *Carnobacterium piscícola*.

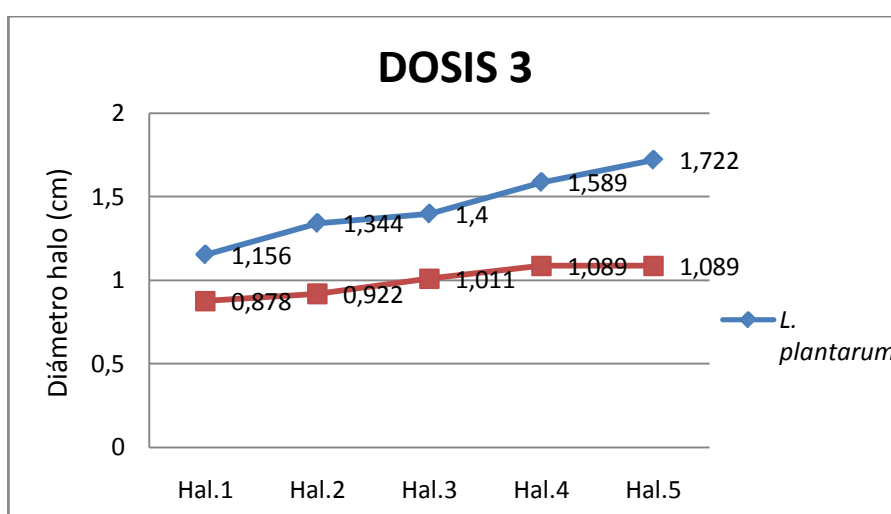
Grupo 1 y 2

Tabla 3.8 Promedios del crecimiento del halo del grupo 1 (*L. plantarum*) y grupo 2 (*L. casei*).

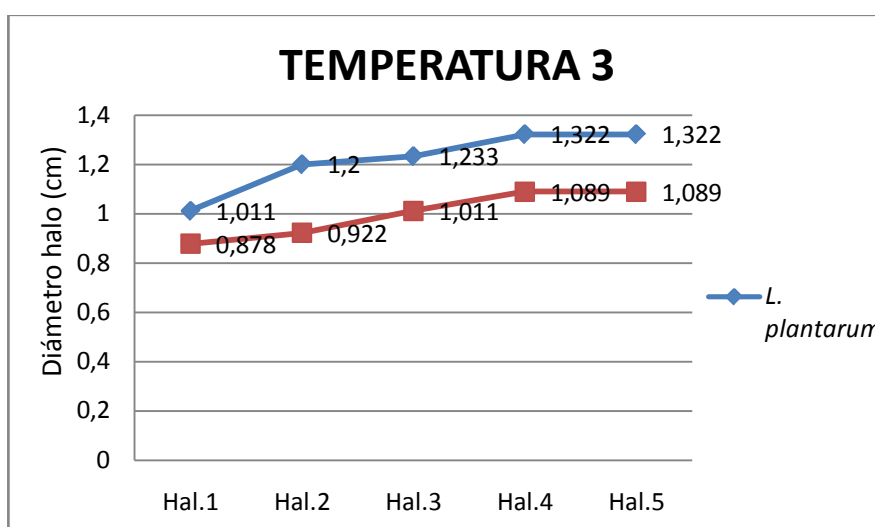
Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
<b>DOSIS GRUPO 1</b>	2					
D1 (10 <sup>5</sup> ufc/ml)		0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b
D2 (10 <sup>7</sup> ufc/ml)		0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b
D3 (10 <sup>9</sup> ufc/ml)		1.156 a	1.344 a	1.400 a	1.589 a	1.722 a
<b>TEMPERAT</b>	2					
C1 (8°C)		0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b
C2 (15°C)		0,644 b	0,644 b	0,667 b	0,767 b	0,900 b
C3 (20°C)		1.011 a	1.200 a	1.233 a	1.322 a	1.322 a
<b>DOSIS GRUPO2</b>	2					
D1 (10 <sup>5</sup> ufc/ml)		0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b
D2 (10 <sup>7</sup> ufc/ml)		0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b	0.5 b
D3 (10 <sup>9</sup> ufc/ml)		0,878 a	0,922 a	1,011 a	1,089 a	1,089 a
<b>TEMPERAT</b>	2					
C1 (8°C)		0,544 b	0,589 b	0,633 b	0,633 b	0,633 b

<b>C2 (15°C)</b>		0, 544 b	0,544 b	0,567 b	0,644 b	0,644 b
<b>C3 (20°C)</b>		0,789 a	0,789 a	0,811 a	0,811 a	0,811 a

Dentro del grupo 1 y 2 la dosis con mejor crecimiento a lo largo de las 5 evaluaciones fue la D3 ( $10^9$  ufc/ml), diferenciándose estadísticamente en todas las evaluaciones, mientras que la temperatura C3 (20°C) presentó el mejor rango de crecimiento sin presentar mayor diferencia estadística para el grupo 2 (Tabla 3.8).



**Figura 3.25 Dosis 3 ( $10^9$  ufc/ml) para los grupos 1 y 2.**



**Figura 3.26 Temperatura 3 (20°C) para los grupos 1 y 2.**



### Grupo 3

Tabla 3.9 Promedios del crecimiento del halo del grupo 3 (Antibióticos).

Fuentes de Variación	GL	EVALUACIONES DIARIAS				
		1	2	3	4	5
<b>GRUPO3</b>	2					
<b>A1/D4</b> (Oxitetraciclina/ 30 mcg)	1	1.433 b	1.500 b	1.767 b	1,856 b	1,911 b
<b>A2/D5 (20 mcg)</b>	1	0.500 b	0.500 b	0,556 b	0,633 b	0,633 b
<b>A3/D6 (15 mcg)</b>	1	0,956 a	1,044 a	1,767 a	1,533 a	1,622 a
<b>TEMPERAT</b>	2					
<b>C1 (8°C)</b>	1	0,911 b	0,956 b	1,222 b	1,344 b	1,344 b
<b>C2 (15°C)</b>	1	0,733 b	0,789 b	1,033 b	1,167 b	1,189 b
<b>C3 (20°C)</b>	1	1,244 a	1,300 a	1,422 a	1,511 a	1,633 a

Para el tercer grupo el antibiótico 1 (Oxitetraciclina 30mcg) fue el más eficiente en contra del patógeno *Carnobacterium piscícola*; el antibiótico 2 (Amoxicilina 25 mcg) presentó una pobre inhibición, mientras que el antibiótico 3 (Eritromicina) presentó buena inhibición contra el patógeno (Tabla 3.9).

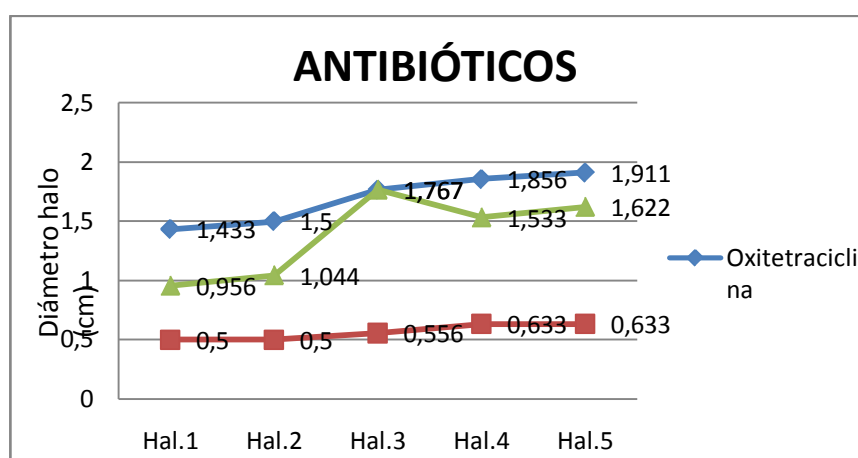
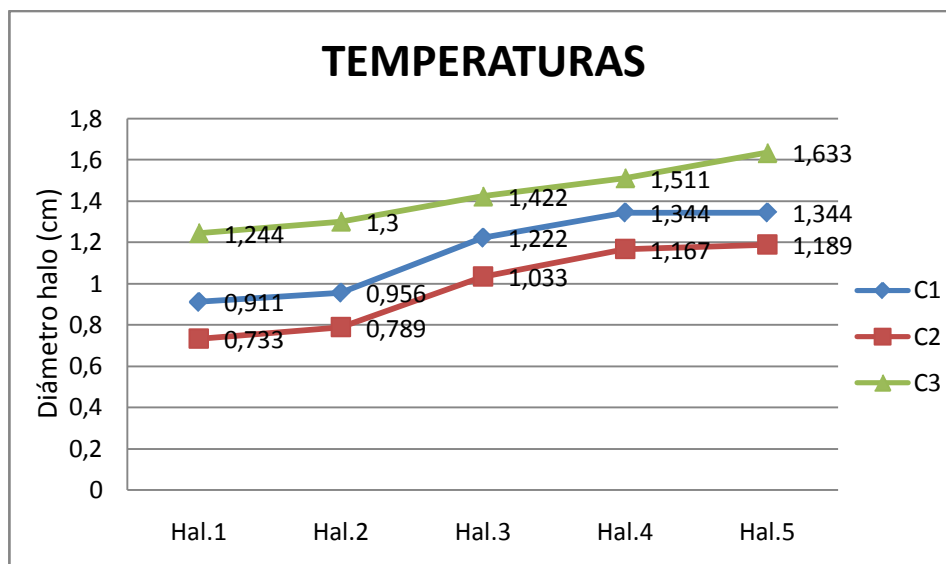


Figura 3.27 Comparación de los tres antibióticos utilizados para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola*.

La temperatura C3 (20°C) fue la mejor para prevenir el crecimiento de la bacteria patógena y tuvieron diferencia estadística a lo largo de las 5 evaluaciones (Tabla 3.9).



**Figura 3.28 Comparación de las tres temperaturas probadas para el grupo 3.**

## 5. DISCUSIÓN

A diferencia de lo citado por Starliper *et al.* (1992) que menciona la presencia de *Carnobacterium piscícola* en peces adultos o en etapa de desove, en la presente investigación se encontró el patógeno en peces juveniles con pesos entre los 55-100 gramos, como se puede observar en la tabla 3.1. Las que se recolectaron para el aislamiento bacteriano no presentaban ninguna sintomatología externa ni interna, es decir, no tenían ni la piel oscura ni algún órgano afectado, lo cual concuerda con lo mencionado por Baya *et al.* (1991) que encontró el patógeno en peces que parecían sanos, demostrándose así el oportunismo de dicha bacteria. Hay que tener en cuenta que esta bacteria solo se activa con la presencia de algunos factores externos, como la baja brusca de temperatura a menos de 15 °C, o una alta densidad poblacional que lleva a los peces a tener un ambiente de estrés.

Con respecto a las bacterias presentes en el intestino de la trucha cabe decir que varían mucho de una región a otra, inclusive las condiciones de manejo de los animales o los factores ambientales van a favorecer o perjudicar el crecimiento de una determinada microbiota intestinal. Es por esto que las bacterias identificadas en el presente trabajo son válidas para los peces que se encuentran en el proyecto paylones del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA). Como se puede observar en el anexo A las bacterias predominantes fueron *Aeromona* spp. y *Bacillus* presuntamente *alvei*, y como se puede ver en la tabla 3.2 las otras colonias identificadas en menor número fueron los géneros *Bacillus* presuntamente de la especie *coagulans*, *Proteus* spp., *Flavobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Carnobacterium piscícola*, mientras que en la bibliografía consultada de las bacterias predominantes en peces de zonas europeas fueron *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Azizpour, K. 2009), *Aeromona* spp y *Carnobacterium piscícola* (Pond, M., et al., 2006), *Citrobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. (Spanggaard, B., et al., 1999) y *Protoebacteria* de la subclase gamma (Huber, I., et al., 2003).

Para las pruebas de antagonismo se obtuvieron resultados bastante satisfactorios de acuerdo a los objetivos planteados, encontrándose un efecto antagónico en muchos tratamientos tanto probióticos como antibióticos. En lo que se refiere al efecto antagónico de los probióticos contra el patógeno había un poco de incertidumbre debido a que ambas bacterias pertenecen al grupo de las ácido lácticas, es más, el género *Carnobacterium* fue en sus principios denominado como *Lactobacillus*, entonces se podía asumir que utilicen los mismos mecanismos para sobrevivir. La temperatura fue otro factor con diferentes resultados, ya que se utilizaron temperatura ambiente para las pruebas piloto, y tres temperaturas diferentes, 20°C que es la máxima a la que se podría encontrar una piscina acuícola, 15°C la óptima para el crecimiento de las truchas, y 8°C que es la mínima a la que se encontraría una piscina acuícola.

Se hicieron pruebas preliminares a temperatura ambiente por la dificultad de encontrar incubadoras disponibles a temperaturas tan bajas como las que se necesitaban pero se obtuvo inhibición del patógeno con los dos probióticos comerciales con un halo mayor a 5 mm y con los antibióticos, la amoxicilina no presentó ningún efecto antagónico contra el patógeno mientras que la oxitetraciclina presentó el mejor efecto antagónico con un halo mayor a 10 mm. En el cuadro 1.5 se puede ver que pese a tener el mayor efecto antagónico entre los tratamientos, según el grupo de las tetraciclinas sólo con un halo de 19 mm se determina una buena sensibilidad del antibiótico, con el diámetro obtenido se clasificaría en una sensibilidad intermedia.

A diferencia de lo ocurrido a temperatura ambiente, en casi todos los tratamientos el probiótico comercial *Lactobacillus casei* no presentó un buen efecto antagónico, inclusive a la mayor concentración ( $10^9$  ufc/ml) en algunos casos casi fue imperceptible su efecto (figuras 3.25 y 3.26). Esto pudo deberse a que se encontró a temperaturas muy bajas y su rango de crecimiento es mejor a temperaturas altas, así a la temperatura de 20 °C logró provocar un halo de inhibición de 9 mm a una concentración de  $10^9$  ufc/ml que determinó un efecto antagónico contra el patógeno. Según *et al.*, 2007, esta bacteria soporta altas concentraciones de pH y altas temperaturas, siendo una buena opción como un probiótico porque afronta bien las condiciones del estómago y el intestino, sin embargo, no va a ser muy útil para la trucha arco iris (*Orchorynchus mikyss*) ya que es un animal poiquilotermo, porque la temperatura de su cuerpo está de acuerdo a la del agua. El ser una bacteria anaerobia facultativa pudo ser una desventaja del probiótico contra el patógeno, ya que *Carnobacterium piscícola* crecía bien en condiciones aerobias, entonces no hubo mayor problema en su crecimiento. Estadísticamente *Lactobacillus casei* no se diferenció y luego no aumentó su crecimiento equiparándose con los valores intermedios manifestando que con ésta bacteria la interacción de la temperatura con la dosis no actúan en dependencia. Pese a no tener un buen crecimiento, en las cajas que se encontró inhibición lo hizo con la dosis más alta D3 ( $10^9$  ufc/ml) como se puede ver en el anexo C.

Con el probiótico comercial *Lactobacillus plantarum* se obtuvieron buenos resultados, pese a que estadísticamente haya ocupado el segundo lugar en eficacia contra el patógeno *Carnobacterium piscícola* (Figura 3.25), pero esto se debió a que para los tres primeros tratamientos fue imposible tomar medidas de los halos porque el patógeno creció de manera muy leve para luego casi desaparecer al quinto día a una temperatura de 8°C (fig. 3.12) y de esta manera los datos para estos tratamientos fueron de cero (Anexo C). Estos resultados con el probiótico *Lactobacillus plantarum* pueden deberse a que como menciona Magonova *et al.*, 2007, esta bacteria empieza a producir ácidos lácticos y acéticos por la ruta de Embden-Meyerhof disminuyendo su competencia y en condiciones aerobias, como a las que se encontraba, consume el oxígeno del medio para convertirlo en peróxido de hidrógeno que resulta tóxico para otras bacterias (Kleerebezem *et al.*, 2003). A diferencia de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* presenta un rango de crecimiento más amplio, desde 15°C a 37°C, lo que debió favorecer su acción a temperaturas tan bajas como 8°C en las que se vio prácticamente inhibido el crecimiento del patógeno en la caja. Estadísticamente presentó alta significancia, tanto en concentraciones y temperaturas como en sus respectivas interacciones demostrando que ambas variables actúan de manera dependiente (Figuras 3.26 y 3.27). Esto se pudo observar ya que no se presentó la misma reacción en las cajas que estuvieron a 15°C y 20°C, en las que fue más notoria la presencia del halo y en casi todas el crecimiento del patógeno fue poco en comparación con los demás tratamientos (Anexo C).

Los 3 antibióticos que se utilizaron no se comportaron de la misma manera en presencia del patógeno *Carnobacterium piscícola*, así la amoxicilina de 25 mcg demostró no ser efectiva contra el patógeno ya que a ninguna temperatura presentó algún tipo de inhibición significativa (figuras 3.20 y 3.28) tal vez porque es un antibiótico menos tóxico en comparación a los otros dos que se probaron pese a tener una concentración alta. La eritromicina a 15 mcg presentó un buen efecto antagónico y estadísticamente presentó diferencias estadísticas y un buen halo de inhibición (tabla 3.28) siendo casi igual a la inhibición producida por el antibiótico oxitetraciclina, y con la temperatura de

20°C (Figura 3.20 b) alcanzó valores de 18 mm lo que lo clasificaría como un antibiótico sensible contra *Carnobacterium piscícola* (tabla 3.5). La oxitetraciclina a 30 mcg presentó la mejor inhibición del grupo 3 con valores superiores a 20 mm para el último día (Anexo C) lo que lo clasificaría como un antibiótico de alta sensibilidad contra el patógeno en estudio según la tabla 1.5 y estadísticamente su mejor crecimiento se dio a 20°C (Figura 3.20). En el proyecto Paylones del IASA, no suministra antibióticos a sus peces y se ha demostrado que de los tres antibióticos probados solo la amoxicilina presentaría resistencia a la bacteria *Carnobacterium piscícola*, mientras que los otros dos se podrían utilizar para eliminar su presencia en los peces a través del alimento con piensos medicamentosos. Sin embargo, también se ha probado que los dos probióticos comerciales, especialmente *Lactobacillus plantarum* presentaría una mejor opción para evitar el uso de antibióticos en los animales.

Actualmente se está buscando mejorar las dosificaciones que se dan a los peces, debido a que existe un gran desconocimiento en la cinética de los antibióticos sobre cada una de las especies y ahora, los antibióticos que generalmente se utilizan en piscicultura como la ampicilina, amoxicilina, eritromicina, flumequina, oxitetraciclina, entre otras han empezado a ser restringidas especialmente para las especies con destino a la alimentación humana. Se está tratando de legalizar solamente el uso de aquellos antibióticos que presenten MRL (niveles mínimos de residuos) y que se encuentren expresamente autorizados para peces, disminuyendo el número de antibióticos que tengan licencia para aplicarse legalmente a peces (Padrós F. y Furones M., 2004).

## 6. CONCLUSIONES

1) De la microflora intestinal de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontró: 7 colonias bacilos gram positivos y negativos catalasas positivos y bacilos gram positivos catalasas negativos, con diferente morfología.

2) De las 10 colonias predominantes se identificó los géneros bacterianos: *Bacillus (alvei)*, *Bacillus (coagulans)*, *Aeromona spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Proteus spp.*, *Lactobacillus spp.* y *Carnobacterium piscícola*.

3) *Lactobacillus plantarum* resultó el más eficiente para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola* con un marcado efecto antagónico a concentraciones de  $10^9$  ufc/ml. Porque a 8°C y a 20°C obtuvo las mejores inhibiciones de todos los tratamientos.

4) *Lactobacillus casei* a 20°C y concentración de  $10^9$  ufc/ml produjo un halo de inhibición de 15 mm mostrando un efecto antagónico no muy efectivo.

5) El antibiótico oxitetraciclina a concentración de 30 mcg y eritromicina a concentración de 15 mcg presentaron alta sensibilidad según su diámetro de inhibición, contra la bacteria *Carnobacterium piscícola* constituyéndose en buena opción contra el patógeno.

6) El antibiótico amoxicilina 25 mcg no presentó efecto antagónico contra *Carnobacterium piscícola* a ninguna de las tres temperaturas de prueba y demostró ser resistente para este patógeno.

7) La dosis más efectiva en los probióticos comerciales *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola* fue de  $10^9$  ufc/ml.

8) La temperatura más eficiente resultó a 20°C para la mayoría de tratamientos, excepto para *Lactobacillus plantarum* que fue la de 8°C.

9) El probiótico comercial *Lactobacillus plantarum* resultó la mejor opción para el tratamiento del patógeno *Carnobacterium piscícola* en comparación con los antibióticos que se usan frecuentemente en piscicultura.

10) *Carnobacterium piscícola* es una bacteria oportunista que se encuentra en las truchas sin causar síntomas evidentes (oscurecimiento de la piel, exoftalmia y puntos hemorrágicos en el hígado) mientras no se encuentre activa.



## 7. RECOMENDACIONES

- Usar el probiótico comercial *Lactobacillus plantarum* para el control del patógeno *Carnobacterium piscícola*.
- Determinar la dosis más adecuada y que presente la mejor cinética para ser administrada en el alimento de las truchas.
- Investigar la presencia de bacterias probióticas nativas de la flora normal de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) como alternativa al uso de antibióticos.
- Emplear técnicas moleculares para tipificación de géneros y especies bacterianos, como por ejemplo el primer 16S rRNA, análisis por RFLP, PCR o RAPD.
- Utilizar oxitetraciclina y eritromicina como una alternativa de control ya que muestran sensibilidad al patógeno *Carnobacterium piscícola*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aquahoy. (2007 a). Producción de trucha arco iris. Ecuador Extraído el 4 de marzo, 2008, de [http://www.aquahoy.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1043](http://www.aquahoy.com/index.php?option=com_content&task=view&id=1043).
- Aquahoy. (2007 b). El CREA abastece de truchas a 205 familias. Ecuador. Extraído el 4 de marzo, 2008, de [http://www.aquahoy.com/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1083](http://www.aquahoy.com/index.php?option=com_content&task=view&id=1083).
- Blanco, M. (1994). La trucha Crianza industrial. Segunda edición. España: MundiPrensa.
- Briones, V. (1994). La crianza de Truchas en estanques. Quito: Regional Latacunga. Ecuador.
- Castro, M., Castro, J., Castro, T., Estrada, E. y García, V. (2005). Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. México.
- Chiu, C., Y. Guu, C. Liu, T. Pan y W. Cheng. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish. Shellfish. Immunol.*, 23 (2): 364-77.USA.
- Cedeño R., Rodríguez J. (2006). Uso de los Probióticos *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus* sp. (P64) en el cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei*. Ecuador. Extraído el 23 de abril, 2008, de [www.cenaim.espol.edu.ec/download/probioticos.pdf](http://www.cenaim.espol.edu.ec/download/probioticos.pdf).
- Collins, M., Farrow, E., Phillips, B., Fergus, S. and Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some

catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:310-316.USA.

- Cristóbal, R., Maurtua, D. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Perú. Extraído el 3 de abril, 2008, de [http://journal.paho.org/index.php?a\\_ID=587](http://journal.paho.org/index.php?a_ID=587) .

- Drummond, S. (1988). Cría de la Trucha. España: Acribia S.A.

- Estrada, A., Gutiérrez, L., y Montoya, O. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *lactobacillus* sp. contra *salmonella* sp. y *escherichia coli*. México. Extraído el 4 de marzo, 2008, de [www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v58n1/a03v58n1.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v58n1/a03v58n1.pdf).

- García, Y. (2002). Efecto del tratamiento térmico en la actividad hipocolesterolémica de un hidrolizado enzimático de crema de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestro en Ciencias en Procesos Biotecnológicos. Instituto de Ciencia Animal e Instituto de Farmacia y Alimento. La Habana-Cuba.

- Gómez, G. (2003). Los probióticos. Una alternativa en el tratamiento de enfermedades. España. Extraído el 2 de marzo, 2008, de <http://www.monografias.com/trabajos16/probioticos/probioticos.shtml>.

- Gonzalez, L., Carvajal, J.; Medina, A. (1997). Susceptibilidad comparativa de trucha arco iris y salmón coho a ectoparásitos de importancia económica. Chile. Extraído el 4 de marzo, 2008, de <http://www.scielo.cl/scielo.php>.

- Guevara, J., Morales, R., Quintero, L. (2005). Evaluación de la utilización de probióticos en la fase de levante del ciclo de producción de la mojarra roja

(*Oreochromis sp.*). Perú. Extraído el 24 de abril, 2008, de [www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS\\_VALIDAS/pdfs/Guevara.pdf](http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS_VALIDAS/pdfs/Guevara.pdf) .

- Gullian, M. (2001). "Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei*". Ecuador. Extraído el 24 de abril, 2008, de <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/tesismaestria.html>.

- Irianto, A. y Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.*, 25: 633-642. USA.

- Jory, D. (1998). Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquac. Manag.* 24: 62-67. USA.

- Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura y T. Kimura. (1988). Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.*, 32: 67-73. Inglaterra.

- Laloo, R., S. Ramchuran, D. Ramduth, J. Gorgens y N. Gardiner. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental Fish. *Jour. Appl. Microbiol.*, 103: 1471-1479. USA

- Le Goff, L. (2003). Ganadería industrial y antibióticos riesgos infecciosos para el hombre. Extraído el 4 de marzo, 2008, de [http://www.geocities.com/liberaccion\\_fanzine/ganaderia-antib.html](http://www.geocities.com/liberaccion_fanzine/ganaderia-antib.html). España.

- Magonova, S., Larsen, R., & Pogliano, K. (2007). *Lactobacillus brevis*. Chile. Extraído el 4 de marzo, 2008, de [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus\\_brevis](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_brevis).

- Metepec, (2008). El consumo constante de Trucha evita enfermedades del corazón. España. Extraído el 4 de marzo, 2008, de <http://www.zumpangolandia.com/modules/news/article.php?storyid=744>.
- Padrós, F; Furones M. (2004). Patología bacteriana en piscicultura. Barcelona España.
- Quintero, J. (2006). Peces de agua salobre. México. Extraído el 4 de marzo, 2008, de <http://www.monografias.com/trabajos34/peces/peces.shtml>.
- Riquelme, C., R. Araya y R. Escribano. (2000). Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*, 181: 25-36. Chile.
- Rodríguez-Méndez N, Gaitán S, Chaparro N. (2006). Evaluación del crecimiento de juveniles del Bagre *Ariopsis bonillai* utilizando alimento con probióticos en condiciones de laboratorio. *Revista AquaTIC*, nº 24. Extraído el 1 de abril, 2008, de <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=193>. Ecuador.
- Sánchez, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires- Argentina.
- Sánchez, D., Zapata, L. (2002). Los probióticos en la acuicultura. México. Extraído el 23 de abril, 2008, de [www.nicovita.com.pe/pdf/esp/boletines/bole\\_0210\\_01.pdf](http://www.nicovita.com.pe/pdf/esp/boletines/bole_0210_01.pdf).
- Shimada, A. (2003). *Nutrición Animal*. México: Trillas. México.
- Timmermans, L. (1987). Early development and differentiation in fish. *Sarsia* 72, 331-339. USA.
- Toledo, N., Melo, C., Ferrer, J., Bórquez, R. (2004). Secado y estabilidad de lactobacilos probióticos empleados en la formulación de un alimento para

uso en acuicultura. Chile. Extraído el 27 de febrero, 2008, de [http://dpi.eq.ufrj.br/ciaiq\\_22/CD/formCrCongreso/papers/13a/13a\\_132.pdf](http://dpi.eq.ufrj.br/ciaiq_22/CD/formCrCongreso/papers/13a/13a_132.pdf).

- Tinh, N. T. N., K. Dierckens, P. Sorgeloos y P. Bossier. (2007). A review of the functionality of probiotics in the larviculture food Chain. *Mar. Biotechnol.*, 10 (1): 1-12. USA
- Villamil, L., Martínez-Silva, A., (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: reseña. Santa Marta-Colombia.
- Vine, N., D. Leukes y H. Kaiser. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*,30 (3): 404-427. (2006). USA.

## ANEXOS

### Anexo A

Anexo A : Tablas con las colonias obtenidas después del aislamiento de la flora intestinal de la trucha arco iris (*Orcorhynchys mykiss*).



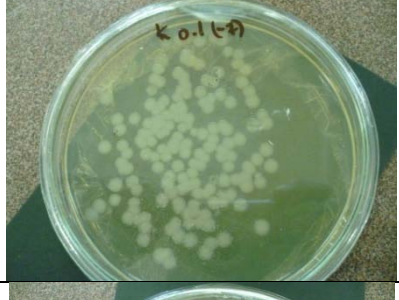


**Colonias bacterianas encontradas en el intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**




<b>Simbología</b>	<b>Especificación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Catalasa</b>
<b>A</b>	T3,-1,C,MRS	Transparente, borde irregular	+
<b>B</b>	T3,-1,C,MRS	Blanco, borde liso	+
<b>C</b>	T4,-3,C+I,TSA	8 Regiones marcadas transparentes	+
<b>D</b>	T5,-5,C,TSA	2 Regiones transparentes	+
<b>E</b>	T5,-3,C+I,TSA	dos colonias blancas borde rugoso	+
<b>F</b>	T4,-5,C+I,TSA	Crecimiento masivo y una colonia transparente borde rugoso	+
<b>G</b>	T1,-3,C,TSA	Crecimiento masivo	+
<b>H</b>	T1,-5,C,TSA	Crecimiento masivo, 1 colonia blanca en el	+

		fondo y una blanca amarillenta en la superficie	
<b>I</b>	T2,-3,C,TSA	Crecimiento masivo, 22 colonias pequeñas en la base	+
<b>J</b>	T2,-1,C+I,TSA	Crecimiento masivo	+
<b>K</b>	T3,-3,C,TSA	Crecimiento masivo	+
<b>L</b>	T3,-5,C,TSA	Crecimiento masivo	+
<b>M</b>	T5,-5,C+I,MRS	Crecimiento colonias grandes, redondas, borde liso, blancas	-
<b>N</b>	T4,-1,C+I,MRS	Colonias pequeñas, redondas, borde liso, blancas,	-
<b>O</b>	T5,-1,C+I,MRS	No hubo crecimiento	
<b>P</b>	T2,-1,C,MRS	Colonias separadas, blancas (+de 20)	+
<b>Q</b>	T1,-1,C,MRS	Crecimiento con sep. de colonias	+
<b>R</b>	T2,-5,C,MRS	No hubo crecimiento	





**Colonias predominantes del aislamiento efectuado en el intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).**

Símbolo	Descripción	Catalasa	Gramm	Figuras
<b>J (-7)B</b>	Crecimiento masivo, una partr un poco seca y presenta olor agradable	+	-	
<b>Lzz</b>	Crecimiento sin sep. de colonias	+	-	
<b>K (-7)</b>	Crecimiento masivo, olor agradable	+	-	
<b>Hzz</b>	Crecimiento masivo	+	-	
<b>J (-7)A</b>	Crecimiento sin sep. de colonias	+	-	

<b>G(-7)A</b>	Crecimiento sin sep. de colonias	+	+	
<b>Ezz</b>	Crecimiento con separación de colonias	+	+	
<b>Jzz</b>	Crecimiento con estriado sin sep. de colonias, hubo crecimiento fuera del estriado	+	+	

## MRS

<b>Nzz A</b>	Crecimiento con separación de colonias pequeñas, redondas, borde liso, blancas, olor a queso	-	+	
<b>Mzz</b>	Crecimiento sin sep. de colonias, color blanco y olor bien agradable	-	+	

## Anexo B

Anexo B: Tablas con los informes de los resultados de la identificación bacteriana tras la realización de las diferentes pruebas bioquímicas para determinación de género y especie.

### Pruebas realizadas para la identificación del género *Bacillus (alvei)*

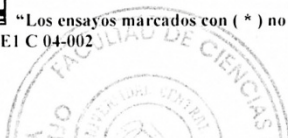
#### INFORME

OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	>5 mm
Forma	Rizoide
Elevación	Plana
Margen	Lobulado
Color	Blanca
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	Positivo
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUIMICAS	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Glucosa	+ Fermentativa
Lactosa	-
Sacarosa	-
Almidon	-
Inositol	-
Voges Proskauer	+
Nitratos	+
Gelatina	+
Urea	±
Lecitinasa	-
Crecimiento anaerobico	+
Manitol	-
Crecimiento > a 50 ° C	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Bacillus (alvei)</b>



No OAE LEI C 04-002

"Los ensayos marcados con ( \* ) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE"



Bioq. María Dolores Martínod  
JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA

## Pruebas realizadas para la identificación del género *Bacillus* (coagulans)

### INFORME

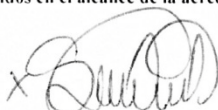
OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	> 5 mm
Forma	Rizoide
Elevación	Plana
Margen	Lobulado
Color	Blanca
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
<b>OBSERVACION MICROSCOPICA</b>	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	Positivo
Morfología celular	Bacilos
<b>PRUEBAS BIOQUIMICAS</b>	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Glucosa	+ Fermentativa
Lactosa	+
Sacarosa	-
Almidon	+
Inositol	-
Voges Proskauer	+
Nitratos	+
Gelatina	-
Urea	-
Lecitinasa	+
Manitol	-
Crecimiento ≥ a 50 °C	+
<b>BACTERIA</b>	<b>Bacillus (coagulans)</b>



"Los ensayos marcados con ( \* ) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE"

OAE LE1 C 04-002



  
 Bioq. Maria Dolores Martinod  
 JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA



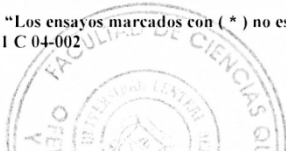
## Pruebas realizadas para la identificación del género *Aeromonas* spp.

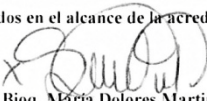
### INFORME

OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	<5 mm
Forma	Amiboide
Elevación	Plana
Margen	Ondulado
Color	Blanco
Superficie	Opaca
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	Negativo
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUIMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Glucosa	Fermentativo
Lactosa	-
Sacarosa	-
Almidón	+
Inositol	±
Rojo de metilo	-
Nitratos	+
Citatos	±
Lisina descarboxilasa	±
Gelatina	+
Urea	±
Lecitinas	-
<b>BACTERIA</b>	<b><i>Aeromonas</i> spp.</b>



"Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE"  
 No OAE LEI C 04-002



  
 Bioq. María Dolores Martínod  
 JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA

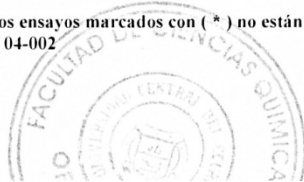
**Pruebas realizadas para la identificación del género *Flavobacterium* spp.**

**INFORME**

OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-5 mm
Forma	Amiboide
Elevación	Plana
Margen	Lobulado
Color	Blanco
Superficie	Opaca
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
OBSERVACION MICROSCOPICA	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	Negativo
Morfología celular	Bacilos
PRUEBAS BIOQUIMICAS	
Oxidasa	+
Catalasa	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Glucosa	Oxidativa
Lactosa	-
Sacarosa	-
Almidón	+
Inositol	-
Rojo de metilo	-
Nitratos	+
Citratos	+
Lisina descarboxilasa	±
Gelatina	+
Urea	+
Lecitinasa	-
<b>BACTERIA</b>	<b>Flavobacterium spp.</b>



“Los ensayos marcados con ( \* ) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE”  
OAE LEI C 04-002



*[Firma]*  
Bióq. María Dolores Martínod  
JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA

**Pruebas realizadas para la identificación del género *Proteus* spp.**

INFORME

OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA	RESULTADO
Tamaño de la colonia	1-2 mm
Forma	Circular
Elevación	Plana
Margen	Ondulado
Color	Blanca
Superficie	Brillante
Densidad	Abundante
Consistencia	Butirosa
<b>OBSERVACION MICROSCOPICA</b>	
Coloración Gram	Negativa
Esporas	Negativo
Morfología celular	Bacilos
<b>PRUEBAS BIOQUIMICAS</b>	
Oxidasa	-
Catalasa	+
Sulfuro	-
Indol	-
Movilidad	-
Glucosa	Fermentativa
Lactosa	-
Sacarosa	-
Rojo de metilo	+
Nitratos	+
Citratos	-
Lisina descarboxilasa	±
Gelatina	+
Urea	±
<b>BACTERIA</b>	<b>Proteus spp.</b>



“Los ensayos marcados con ( \* ) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE”

OAE LE1 C 04-002



Bioq. María Dolores Martínod  
JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA

**Pruebas realizadas para la identificación del género *Lactobacillus* spp.**

**INFORME**

<b>OBSERVACION MACROSCOPICA COLONIA</b>	<b>RESULTADO</b>
Tamaño de la colonia	< 1 mm
Forma	Puntiforme
Elevación	Plana
Margen	Entero
Color	Blanca
Superficie	Brillante
Densidad	Escasa
Consistencia	Butirosa
<b>OBSERVACION MICROSCOPICA</b>	
Coloración Gram	Positiva
Esporas	Negativo
Morfología celular	Bacilos
<b>PRUEBAS BIOQUIMICAS</b>	
Oxidasa	-
Catalasa	-
Glucosa	Fermentativa
Lactosa	+
Rojo de metilo	-
Crecimiento en anaerobiosis	Anaerobia estricta
<b>BACTERIA</b>	<b><i>Lactobacillus</i> spp.</b>



“Los ensayos marcados con (\*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE”  
 OAE LE1 C 04-002



*(Handwritten Signature)*  
 Bioq. María Dolores Martinod  
 JEFE AREA DE MICROBIOLOGIA



## Anexo C

Anexo C: Efecto antagónico en centímetros del primero al quinto día de los 27 tratamientos contra el patógeno *Carnobacterium piscícola*.

Tratam	Repet	Pro o Amb	Dosis	Temp	halo 1	halo 2	halo 3	halo 4	halo 5
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	3,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	1,00	1,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	3,00	1,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,00	1,00	1,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,00	2,00	1,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,00	3,00	1,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,00	1,00	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,00	2,00	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,00	3,00	1,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	1,00	1,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	2,00	1,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	3,00	1,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,00	1,00	1,00	3,00	2,00	0,90	0,90	0,90	1,30	1,80
6,00	2,00	1,00	3,00	2,00	0,90	0,90	0,90	1,30	1,80
6,00	3,00	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,20	1,30	1,50
7,00	1,00	1,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7,00	2,00	1,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7,00	3,00	1,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,00	1,00	1,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,00	2,00	1,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,00	3,00	1,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9,00	1,00	1,00	3,00	3,00	2,60	4,00	4,00	4,50	4,50
9,00	2,00	1,00	3,00	3,00	1,50	1,80	1,80	2,10	2,10
9,00	3,00	1,00	3,00	3,00	2,00	2,00	2,30	2,30	2,30
10,00	1,00	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,00	2,00	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,00	3,00	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11,00	1,00	2,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11,00	2,00	2,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11,00	3,00	2,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12,00	1,00	2,00	3,00	1,00	0,90	0,90	1,10	1,10	1,10
12,00	2,00	2,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12,00	3,00	2,00	3,00	1,00	0,00	0,90	1,10	1,10	1,10
13,00	1,00	2,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

13,00	2,00	2,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13,00	3,00	2,00	1,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14,00	1,00	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14,00	3,00	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15,00	1,00	2,00	3,00	2,00	0,90	0,90	1,10	1,10	1,10
15,00	2,00	2,00	3,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15,00	3,00	2,00	3,00	2,00	0,00	0,00	0,00	1,20	1,20
16,00	1,00	2,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16,00	2,00	2,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16,00	3,00	2,00	1,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17,00	1,00	2,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17,00	2,00	2,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17,00	3,00	2,00	2,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18,00	1,00	2,00	3,00	3,00	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
18,00	2,00	2,00	3,00	3,00	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
18,00	3,00	2,00	3,00	3,00	1,10	1,10	1,30	1,30	1,30
19,00	1,00	3,00	4,00	1,00	1,30	1,30	2,10	2,10	2,10
19,00	2,00	3,00	4,00	1,00	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
19,00	3,00	3,00	4,00	1,00	1,30	1,30	2,10	2,10	2,10
20,00	1,00	3,00	5,00	1,00	0,00	0,00	0,70	0,70	0,70
20,00	2,00	3,00	5,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,70
20,00	3,00	3,00	5,00	1,00	0,00	0,00	0,70	0,70	0,70
21,00	1,00	3,00	6,00	1,00	1,10	1,10	1,50	1,50	1,50
21,00	2,00	3,00	6,00	1,00	0,00	0,90	1,10	1,50	1,50
21,00	3,00	3,00	6,00	1,00	1,00	1,00	1,30	1,30	1,30
22,00	1,00	3,00	4,00	2,00	1,10	1,10	1,50	2,10	2,10
22,00	2,00	3,00	4,00	2,00	1,10	1,10	1,30	1,30	1,30
22,00	3,00	3,00	4,00	2,00	1,00	1,10	1,10	1,10	1,10
23,00	1,00	3,00	5,00	2,00	0,00	0,00	0,70	0,70	0,70
23,00	2,00	3,00	5,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23,00	3,00	3,00	5,00	2,00	0,00	0,00	0,70	0,70	0,70
24,00	1,00	3,00	6,00	2,00	0,00	0,00	1,30	1,50	1,50
24,00	2,00	3,00	6,00	2,00	0,90	0,90	1,30	1,30	1,50
24,00	3,00	3,00	6,00	2,00	0,00	0,90	0,90	1,30	1,30
25,00	1,00	3,00	4,00	3,00	2,00	2,50	2,50	2,50	2,50
25,00	2,00	3,00	4,00	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,50
25,00	3,00	3,00	4,00	3,00	1,60	1,60	1,80	2,00	2,00
26,00	1,00	3,00	5,00	3,00	0,00	0,00	0,70	0,70	0,70
26,00	2,00	3,00	5,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26,00	3,00	3,00	5,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27,00	1,00	3,00	6,00	3,00	1,50	1,50	1,80	2,10	2,10
27,00	2,00	3,00	6,00	3,00	1,50	1,50	1,50	1,50	2,10
27,00	3,00	3,00	6,00	3,00	1,10	1,10	1,50	1,80	1,80