



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



**BACTERIAS PROBIÓTICAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE
JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS Y SU EFECTO
INHIBITORIO EN *Escherichia coli* AISLADAS DE ESTANQUES
DEL CIPBS – CHUCUITO Y MERCADOS DE LA CIUDAD DE
PUNO**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. JHON CRISTHIAN VELASQUEZ MAQUERA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

A Nuestro Señor Dios.

Por guiarme espiritualmente e iluminar mi camino con salud, sabiduría y fortaleza en todo momento.

A mi querida madre Celestina Maquera Encinas, parte fundamental de mi vida gracias por brindarme tu amor, cariño y confiar en mí, siempre eres y serás mi motivo de salir adelante, agradecido por tener una gran madre que me enseñó lo hermoso que es la vida, gracias por todo.

A mi querido padre Donato Velásquez Ordoñez, un ejemplo de lucha constante para sacar adelante a su familia un excelente padre que me enseñó a nunca darme por vencido, que defienda mis ideales, que defienda con fuerza a la familia. Gracias querido padre eres mi ejemplo de superación de un hombre que admiro y que respeto.

Jhon Cristhian Velásquez Maquera



AGRADECIMIENTOS

- Mi más cordial agradecimiento a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, que compartieron sus conocimientos para crear buenos profesionales.
- A mi Director de tesis Ph. D. Sabino Atencio Limachi y mi asesor el Dr. Juan José Pauro Roque, por su guía y apoyo con sabiduría en la realización de la presente tesis.
- A mis jurados conformados por el D. Sc. Belisario Mantilla Mendoza, M. Sc. Félix Rodolfo Meza Romualdo y M. Sc. Edwin Federico Orna Rivas, que con sus observaciones y sugerencias mejoraron la realización de la presente tesis.
- A mis amigos, gracias por las alegrías, el apoyo que me brindaron en todo momento, las anécdotas divertidas que pasamos que nunca se acabe y que nuestra gran amistad sea larga y duradera.
- A mis amigos y compañeros de la Facultad que forman parte de esta travesía con las diferentes ocurrencias y anécdotas.
- A mis tíos, primos y demás familiares que con sus consejos y ánimos me ayudaron a cumplir esta meta.

Jhon Cristhian Velásquez Maquera



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 11

ABSTRACT..... 12

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL 15

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 15

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES..... 16

2.2 MARCO TEÓRICO 21

2.2.1 Bacterias probióticasDefinición 21

2.2.2 Mecanismo de Acción de los Probióticos 22

2.2.3 Clasificación..... 23

2.2.4 Bacterias que prevalecen en la microflora intestinal de organismos acuáticos 25

2.2.5 Efecto inhibitorio de las bacterias probióticas 27

2.2.6 Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)..... 29

2.2.7 Propiedades fisicoquímicas del agua para la crianza de truchas 33

2.2.8 La alimentación de la trucha arco iris 34

2.2.9 Colonización bacteriana de la mucosa intestinal..... 36

2.2.10 *Escherichia coli*..... 36

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONAS DE ESTUDIO 38

3.2 TIPO DE ESTUDIO 39

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA 39

**3.4 EVALUACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS
(*Lactobacillus* sp Y *Bacillus* sp) EN CONTENIDO INTESTINAL DE**



JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS DEL CIPBS CHUCUITO Y MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO	40
3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> AISLADAS DE ESTANQUES DE CRIANZA DE TRUCHAS DEL CIPBS CHUCUITO..	43
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 CARGA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (<i>Lactobacillus</i> sp Y <i>Bacillus</i> sp) EN CONTENIDO INTESTINAL DE JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS DEL CIPBS CHUCUITO Y DOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO.	46
4.2 EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS AISLADAS SOBRE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> AISLADAS DE ESTANQUES DE CRIANZA DE TRUCHAS DEL CIPBS CHUCUITO – UNA PUNO	53
V. CONCLUSIONES	61
VI. RECOMENDACIONES	62
VII.REFERENCIAS.....	63
ANEXOS.....	75

Fecha de sustentación: 28 de enero 2022.

ÁREA: Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Acuicultura



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de actividad probiótica (Ewaschuk & Dieleman, 2006).....	23
Figura 2. Estructura morfológica de <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Arregui, 2013).....	30
Figura 3. Ubicación de los puntos de muestreo de truchas arco iris (CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno), agosto – octubre 2019.....	38
Figura 4. Procedimientos a realizar para la cuantificación de <i>Lactobacillus</i> sp y.....	42
Figura 5. Comparación de recuentos de la carga bacteriana de <i>Lactobacillus</i> sp en el tracto intestinal de trucha arco iris según puntos de muestreo, agosto – noviembre 2019.....	48
Figura 6. Comparación de recuentos de la carga bacteriana de <i>Bacillus</i> sp en el tracto intestinal de trucha arco iris según puntos de muestreo, agosto – noviembre 2019.....	50
Figura 7. Comparación de diámetros de halos de inhibición bacteriana de <i>Lactobacillus</i>	55
Figura 8. Colecta se muestras de agua de tres estanques de cultivo (foto superior: estanque mayor de forma irregular; foto intermedia: estanque mediano cuadrangular; yfoto inferior: estanques longitudinales) de trucha arco iris y rotulado de muestras en el CIPBS Chucuito de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.....	75
Figura 9. Colecta de individuos de trucha arco iris en estanque de crianza y transferencia en un cooler, CIPBS Chucuito de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.	76
Figura 10. Disección de individuos de trucha arco iris para el aislamiento de bacterias probióticas intestinales, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.	76
Figura 11. Procedimientos de cultivos y diluciones para la cuantificación de bacterias probióticas intestinales, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.	76
Figura 12. Colonias bacterianas de <i>Bacillus</i> sp (placas de la izquierda) y <i>Lactobacillus</i> sp (placas de la derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.	77
Figura 13. Prueba de catalasa realizada a las colonias de <i>Bacillus</i> sp (derecha) y <i>Lactobacillus</i> sp (izquierda) sobre láminas portaobjetos, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.	77



- Figura 14.** Tinción Gram y observación al microscopio de láminas de *Bacillus* sp y *Lactobacillus* sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto –noviembre 2019. 77
- Figura 15.** Observación de bacterias Gram positivas *Lactobacillus* sp (derecha) y *Bacillus* sp (izquierda), laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019..... 78
- Figura 16.** Preparación de medios, crecimiento en agar EMB y pruebas bioquímicas para identificación de *E. coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 78
- Figura 17.** Preparación de agar MRS con diferentes concentraciones de NaCl para la identificación de *Lactobacillus* sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNAPuno, agosto – noviembre 2019..... 78
- Figura 18.** Preparación de medios para las pruebas de antibiograma, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 79
- Figura 19.** Prueba de hidrólisis de almidón (izquierda) y de azúcares fermentables para la identificación bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 79
- Figura 20.** Resultados del antibiograma con Gentamicina (izquierda), *Bacillus* sp(centro) y *Lactobacillus* sp (derecha) frente a *E. coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 80
- Figura 21.** Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp entre truchas colectas según fecha de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 81
- Figura 22.** Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp según puntos de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 81
- Figura 23.** Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos bacterianos de *Bacillus* sp entre truchas colectas según fecha de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019. 81
- Figura 24.** Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos bacterianos de *Bacillus* sp (centro) y *Lactobacillus* sp (derecho) frente a *E. coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019 81
- Figura 25.** Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición bacteriana, según meses de evaluación, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno,



agosto –noviembre 2019.	82
Figura 26. Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición bacteriana de <i>Lactobacillus</i> sp y <i>Bacillus</i> sp y gentamicina (10 µg), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.....	82



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones manejadas por las corporaciones científicas para prebióticos, simbióticos y probióticos (WGO, 2011).....	22
Tabla 2. Probióticos manipulados en acuicultura y secuela en el hospedador (Pérez, 2011).....	23
Tabla 3. Rangos óptimos de los parámetros fisicoquímicos del agua para la producción de truchas.....	33
Tabla 4. Valores promedios de parámetros fisicoquímicos del agua de estanques del CIPBS – Chucuito.	34
Tabla 5. Distribución de muestras por zonas y meses de muestreo.....	39
Tabla 6. Carga probiótica de <i>Lactobacillus</i> sp (x10 ⁶ UFC/ml) en el contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno, agosto a octubre 2019.....	47
Tabla 7. Carga probiótica de <i>Bacillus</i> sp (x 10 ⁶ UFC/ml) en el contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno, agosto a octubre 2019.....	49
Tabla 8. Halo de inhibición (mm) de bacterias probióticas <i>Lactobacillus</i> sp y <i>Bacillus</i> sp, sobre <i>Escherichia coli</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto a noviembre 2019.....	54



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C	: grados centígrados
µg	: microgramos
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: bacterias ácido lácticas
C. V.	: coeficiente de variabilidad
células/ml	: células por mililitro
<i>et al.</i>	: y colaboradores
ha	: hectárea
mg/Kg/h	: miligramo por kilogramo por hora
mg/l	: miligramos por litro
msnm	: metros sobre el nivel del mar
P	: probabilidad
pH	: potencial de hidrogeniones
Prom	: promedio
UFC/g	: unidades formadoras de colonia por gramo
UFC/ml	: unidades formadoras de colonia por mililitro



RESUMEN

La investigación se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano de la ciudad de Puno, durante los meses de agosto a noviembre del 2019. La presencia de bacterias patógenas entre ellas *Escherichia coli* en el tracto digestivo de las truchas y las muestras de agua de los estanques de cultivo, constituye un factor negativo importante ya que produce toxinas disminuyendo la ganancia de peso, la cual podría ser disminuida ante la presencia de bacterias *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, gracias a la producción de ácidos orgánicos y péptidos con actividad bactericida. Los objetivos específicos fueron: a) Evaluar la carga de bacterias probióticas (*Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp) en contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS – Chucuito y mercados Unión - Dignidad y Central de la ciudad de Puno y b) Evaluar el efecto inhibitorio de bacterias probióticas sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de los estanques de crianza de trucha del CIPBS – Chucuito de la UNA – Puno. Los métodos fueron: los juveniles de trucha arco iris fueron adquiridos en el CIPBS – Chucuito y dos mercados de la ciudad de Puno, a partir de ellos se colectaron los tractos digestivos y mediante la técnica del recuento en placa en agar *Lactobacillus* se obtuvo el recuento de bacterias de los géneros *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp; el recuento de bacterias *E. coli* se realizó mediante el NMP/100ml a partir de muestras de agua de los estanques de cultivo del CIPBS - Chucuito. La inhibición bacteriana de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp sobre *E. coli* se realizó mediante el método de ensayo *in vitro* de Kirby Bauer, donde las diluciones de las bacterias ácido lácticas fueron obtenidas mediante el método de McFarland. Los resultados fueron: la carga de *Lactobacillus* sp variaron entre 37.00×10^6 y 41.33×10^6 UFC/ml en el CIPBS Chucuito, de 44.33×10^6 a 54.67×10^6 UFC/ml en el mercado Unión – Dignidad y de 29.00×10^6 a 49.00×10^6 UFC/ml en el mercado Central y *Bacillus* sp fluctuaron entre 215.33×10^6 y 232.00×10^6 UFC/ml en el CIPBS Chucuito, de 201.00×10^6 a 221.00×10^6 UFC/ml en el mercado Unión – Dignidad y de 175.33×10^6 a 187.00×10^6 UFC/ml en el mercado Central; *Lactobacillus* sp originó halos de inhibición sobre *E. coli* entre 23.00 y 25.67 mm, *Bacillus* sp entre 17.67 y 20.67 mm, ambos fueron superiores al control con Gentamicina que originó un halo de 12.00 mm. Se concluye que *Bacillus* sp presentó mayor carga bacteriana probiótica, pero *Lactobacillus* sp obtuvo un mayor rango de inhibición bacteriana en *E. coli* superando al tratamiento control Gentamicina.

Palabras clave: *Escherichia coli*, juveniles, probióticos. trucha arco iris,



ABSTRACT

The research was carried out at the National University of the Altiplano in the city of Puno, during the months of August to November 2019. Problem: The presence of pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, in the digestive tract of trout and water samples from culture ponds, is an important negative factor since it produces toxins reducing weight gain, which could be decreased in the presence of bacteria *Lactobacillus* sp and *Bacillus* sp that inhibit the growth of pathogenic bacteria, thanks to the production of organic acids and peptides with bactericidal activity. In this sense, the following specific objectives are proposed: a) Evaluate the load of probiotic bacteria (*Lactobacillus* sp and *Bacillus* sp) in intestinal content of juvenile rainbow trout from CIPBS - Chucuito and Unión - Dignidad and Central markets of the city of Puno and b) Evaluate the inhibitory effect of probiotic bacteria on *Escherichia coli* strains isolated from the trout farming ponds of the CIPBS - Chucuito of the UNA - Puno. The methods were: rainbow trout juveniles were acquired at CIPBS - Chucuito and two markets in the city of Puno, from them the digestive tracts were collected and by means of the plate count technique in *Lactobacillus* agar the count was obtained. of bacteria of the genera *Lactobacillus* sp and *Bacillus* sp; the *E. coli* bacteria count was performed using the NMP/100ml from water samples from the culture ponds of the same CIPBS - Chucuito. Bacterial inhibition of *Lactobacillus* sp and *Bacillus* sp on *E. coli* was performed by the Kirby Bauer *in vitro* test method, where the dilutions of lactic acid bacteria were obtained by the McFarland method. The results were: the load of *Lactobacillus* sp varied between 37.00×10^6 and 41.33×10^6 UFC/ml in the CIPBS Chucuito, from 44.33×10^6 to 54.67×10^6 UFC/ml in the Unión - Dignidad market and from 29.00×10^6 to 49.00×10^6 UFC/ml in the Central market and *Bacillus* sp fluctuated between 215.33×10^6 and 232.00×10^6 UFC/ml in the CIPBS Chucuito, from 201.00×10^6 to 221.00×10^6 UFC/ml in the Unión - Dignidad market and 175.33×10^6 to 187.00×10^6 UFC/ml in the Central market; *Lactobacillus* sp originated inhibition halos on *E. coli* between 23.00 and 25.67 mm, *Bacillus* sp between 17.67 and 20.67 mm, both were superior to the control with Gentamicin that originated a halo of 12.00 mm. It is concluded that *Bacillus* sp presented a higher probiotic bacterial load, but *Lactobacillus* sp obtained a greater range of bacterial inhibition in *E. coli*, surpassing the Gentamicin control treatment.

Key words: *Escherichia coli*, juveniles, probiotics, rainbow trout.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped” (FAO, 2006), en experiencias anteriores *Vibrio alginolyticus* permitió mejorar sustancialmente el rendimiento en viveros de camarones en Ecuador y México (Verschuere *et al.*, 2000); bacterias lácticas, bifidobacterias y levaduras probióticas se comercializan bajo la forma de preparados, conteniendo uno o varios microorganismos vivos, los cuales permitieron mejoras en el crecimiento, sobrevivencia y resistencia a enfermedades de diferentes organismos acuáticos (Dotta *et al.*, 2011), como se observa, la aplicación de probióticos poseerían ventajas en la producción de organismos acuáticos como son los juveniles de trucha arco iris.

Sin embargo, la mayoría de bacterias *Lactobacillus* sp, han sido aislada del ser humano y de otros mamíferos, por lo que es indispensable caracterizar la microbiota intestinal de peces, moluscos y crustáceos, con el fin de seleccionar cepas específicas y obtener mayores beneficios que los obtenidos hasta ahora como lo señalan Duwat *et al.* (2000), donde los microorganismos probióticos deben ser seleccionados de manera específica de los hospederos en los que se van aplicar, lo que permite minimizar los efectos provocados por las amplias diferencias entre los ambientes en los que se desarrollan los organismos.

Los probióticos no son antibióticos, no obstante, son bacterias que se imponen por sobre los agentes patógenos a través de la exclusión competitiva, el agotamiento nutritivo y por la producción de metabolitos naturales para inhibir su crecimiento. Las bacterias benéficas también habitan en las branquias y el tracto digestivo impidiendo así que estas áreas sean invadidas. Adicionalmente mejoran la inmunidad no específica en



camarones y peces, siendo este un fundamento importante para la aplicación de probiótico en todo el ciclo de producción.

La región Puno, se caracteriza por estar considerada como la primera en la producción nacional de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*), pero que el normal crecimiento de esta especie viene siendo mermada por diversos factores entre ellos la presencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli* en las aguas donde son cultivadas, dicha proliferación de agentes patógenos es producto de malos procedimientos como la descarga de agua contaminada en los cursos de agua comunes, el uso indiscriminado de antibióticos y no mantener las Buenas Prácticas de Acuicultura, pero diversas investigaciones aducen que las bacterias probióticas podrían disminuir la población de bacterias patógenas, y así mejorar las variables zootécnicas como ganancia de peso y longitud, conversión alimentaria y tasa de crecimiento específico (Gutiérrez, 2016).

Las bacterias *Lactobacillus* sp están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en diferentes productos de leche fermentada como jocoque y yogurt, también se encuentran en quesos frescos y madurados, en diferentes carnes y sus productos y en algunas hortalizas (Mateos, 2002) y poseen actividad antimicrobiana debido a los productos que sintetizan como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etc. o a la producción de bacteriocinas (Lindgren & Dobrogoz, 1990), que son péptidos biológicamente activos con propiedades bactericidas en contra de otras especies bacterianas (Sablon *et al.*, 2000), entre ellas se mencionan a Pediocina PA – 1, Sakacina P, Plantaricina E/F, Lactococcina G, Helveticina, entre otros (Del Campo *et al.*, 2008), en tal sentido la inhibición de *E. coli* se lograría aplicando diluciones de *Lactobacillus* sp.



Por lo tanto, la investigación se plantea con la finalidad de determinar si las bacterias *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp posean la capacidad de un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria patógena *Escherichia coli* y así definir las ventajas o desventajas del uso de esta propiedad antibacteriana ejercida por *Lactobacillus* en las truchas juveniles arco iris.

Por tal razón, esta investigación tuvo los siguientes objetivos:

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar bacterias probióticas en el tracto digestivo de juveniles de trucha arcoiris y su efecto inhibitorio en *Escherichia coli* aislados de estanques del CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la carga de bacterias probióticas (*Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp) en contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS Chucuito y mercados Unión – Dignidad y Central de la ciudad de Puno.
- Evaluar el efecto inhibitorio de bacterias probióticas sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de estanques de crianza de truchas del CIPBS Chucuito – UNA Puno.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Cargas bacterianas probióticos en peces

Zatan (2020) caracterizó microorganismos intestinales del robalo (*Centropomus* sp), colectados en cautiverio y en medio natural, identificando bacterias probióticas, llegando a aislar géneros de *Clostridium*, *Photobacterium*, *Cetobacterium* y *Rubritepida*, así como también *Klebsiella* sp, *Weisiella cibaria* y *Lactococcus* sp crecieron en agar MRS en el tracto intestinal, de los cuales *W. cibaria* mostró mejores efectos antagónicos. En su estudio Guluarte (2020) caracterizó el potencial inmunoestimulante de la levadura *Kluyveromyces lactis* cepa M3 y sus β -glucanos en peces dorada (*Sparus aurata*) y huachinango (*Lutjanus peru*), llegando a la conclusión que *K. lactis* estimuló el sistema inmune de dorada, reduciendo la toxicidad por *Vibrio parahaemolyticus*, demostrándose así el potencial probiótico para peces. Por otro lado, se caracterizaron fenotípicamente bacterias *Lactobacillus*, provenientes del tracto gastrointestinal de cerdos, mediante pruebas bioquímicas básicas en condiciones gástricas *in vitro* como pH, sales biliares y temperaturas extremas, estas poseen actividad inhibitoria frente a *Salmonella enteritidis*, lográndose la mejora de la producción porcina (Eyeralde *et al.*, 2018).

En otro estudio se aislaron 14 cepas de bacterias lácticas de la chicha de molle y produjeron sustancias inhibitorias de amplio espectro y las de mayor diámetro fueron *Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum* y *L. maltaromicus* (Rodríguez & García, 2017). En estudios similares se logró aislar cepas bacterianas de *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus* con actividad probiótica



comprobada, al adicionar en la dieta de tilapias mejoraron sus variables zootécnicas como ganancia de peso y longitud, conversión alimentaria y tasa de crecimiento específico (Gutiérrez, 2016). Por otra parte, desde la mucosa intestinal de trucha arco iris, se aislaron bacterias *Lactobacillus* y *Bacillus*, mostrando inhibición frente a *Yersinia ruckeri*, con halos superiores a 9 mm de diámetro, lo cual indica la presencia de bacterias en su tracto intestinal con potencial probiótico (Quispe, 2017).

Castillo *et al.* (2017), determinaron el efecto bioconservante de dos cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, los cuales presentaron recuentos de 87×10^4 UFC/g de BAL y el control presentó recuentos de 16 UFC/g de BAL luego de 10 días, logrando inhibir a la microflora que deteriora al pescado y disminuyó la formación de nitrógeno volátil, por otro lado, Puello *et al.* (2018), caracterizaron la microbiota del intestino de *Piaractus brachyomus* (cachamablanca), con recuentos bacterianos en individuos juveniles fue de 630 UFC/g de *Lactobacillus* sp y 3 UFC/g de *Bacillus* esporulados; en adultos de 398 UFC/g de *Lactobacillus* sp y 50118 UFC/g de *Bacillus* esporulados; y en de engorde de 1 UFC/g de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* esporulados, respectivamente.

Vela *et al.* (2017), reportan que las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. rhamnosus* aisladas desde el tracto digestivo del *Hypostomus plecostomus*, originaron diversos resultados en la conversión alimenticia, tasa de eficiencia proteica, tasa de crecimiento específico y eficiencia alimenticia, en el cultivo de tilapia del Nilo, Mello *et al.* (2013), mencionaron que *Bacillus cereus* con recuentos de 4.0×10^8 UFC/g y *Bacillus subtilis* 4.0×10^8 UFC/g, originaron una sobrevivencia del 89.47%, siendo superior al control con una sobrevivencia del 76.61%, sin embargo, Albuquerque *et al.* (2013), indican que *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *Bacillus subtilis* C-3102, son probióticos que administradas en forma individual o en combinación en juveniles de tilapia, no



resultaron con diferencias significativas en la tasa de crecimiento luego de 127 días de cultivo.

Hovda *et al.* (2007), realizaron la identificación bacteriana tradicional y análisis de la región 16S ADNr, en las secciones intestinales porciones primera, media y posterior del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), reportando el dominio de especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* sp., *Bacillus* sp., *Photobacterium phosphoreum*, *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp y *Vibrio* sp, Yang *et al.* (2007), encontraron y clasificaron en los intestinos, la piel, el hígado y el ovario del pez globo (*Takifugu obscurus*), hasta 38 especies bacterianas, Merrifield *et al.* (2009), registró en el tracto intestinal de la trucha arco iris, bacterias transitorias y residentes, entre ellas *Pseudomonas* spp. y bacterias de la familia Enterobacteriaceae, siendo el 80% de la población alóctona y aproximadamente el 60% de la población autóctona, Wu *et al.* (2010), en el pez gato amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) reportaron bacterias *Shewanella*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Myroides* y *Vibrio*, donde su abundancia y diversidad bacteriana podría variar en la microbiota intestinal.

Efecto inhibitorio de bacterias probióticas sobre Enterobacterias

De la mucosa intestinal de trucha arco iris, se aislaron bacterias *Lactobacillus* y *Bacillus*, mostrando inhibición frente a *Yersinia ruckeri*, con halos superiores a 9 mm de diámetro, lo cual indica la presencia de bacterias en su tracto intestinal con potencial probiótico (Quispe, 2017), Ardila (2017), identificó bacterias del tracto intestinal de tilapia roja *Oreochromis sp* como *Bacillus subtilis* y bacterias ácido lácticas en donde se determinó la resistencia a pH ácido y alcalino (2.0 y 8.0), a sales biliares (0.3%), a un medio hipertónico (NaCl 3%) y actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*.



Gómez (2013), aisló bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino, de las cuales 20 fueron *Enterococcus faecium*, cuatro *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus pentosaceus*, las cepas *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35 se seleccionaron para su posterior caracterización, mostró actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. Abasolo (2015), aisló cinco cepas como *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Bacillus flexus* y *Bacillus firmus*; de todas esas *Lactobacillus graminis* mostró una gran actividad antimicrobiana frente a *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*. Mientras que las otras bacterias mostraron actividad enzimática para amilasa, proteasa, lipasa y celulasa.

Sica (2013), aisló los géneros de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus*, tuvieron efecto inhibitorio frente a *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Lactococcus garvieae*. Las cepas aisladas tenían la capacidad de competir con patógenos salmónidos, resistencia a pH gástrico y a la bilis de trucha y así comprobando su capacidad probiótica, Sánchez *et al.* (2015), caracterizaron 17 cepas de *Lactobacillus* spp. extraídas del tracto intestinal de terneros neonatos, encontrando que cuatro cepas impidieron el crecimiento de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, Jurado & Jarrín (2015), establecieron la susceptibilidad de *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* frente *Lactobacillus lactis*, *Salmonella tiphymurium*, mientras que por el método de sensidiscos impregnados del sobrenadante de *L. lactis* inhibió a *S. aureus*, *C. perfringens* y *S. tiphymurium* y *E. coli* no fue inhibida y se encontró que *S. aureus* era susceptible a todas las concentraciones y *S. tiphymurium*.

Por otra parte, Barahona & Zuleta (2014), evaluaron el efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* en yogurt sobre tres cepas patógenas *E. coli*, *Salmonella*



enterica y *Vibrio cholerae* con inoculaciones de 10^3 y 10^6 UFC/g de cada bacteria patógena y luego de 30 días, confirmando el efecto inhibitorio, Pérez (2011), demostró que *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* es la cepa más acomodada para aplicación oral como probiótico frente a la Lactococosis de la trucha, ya que se libera citoquinas lo cual dio un mayor grado de protección frente a *Lactococcus garvieae*.

Por otro lado, Estrada *et al.* (2005), trabajaron con cepas como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, extraídas de productos fermentados, los extractos mostraron capacidad bactericida frente a *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, Ramírez (2005), aisló 293 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), el 24.57% mostraron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas, el 9.72% de las BAL mostraron inhibición contra *Listeria monocytogenes* Scott A; asimismo, García *et al.* (2003), con el objetivo de caracterizar la calidad microbiológica del cultivo de la trucha arco iris, obtuvieron un recuento en las superficies de los peces de 1.78 NMP/ml y 7.08 NMP/ml, en el agua recuentos de 1.66 NMP/ml y 2.09 NMP/ml y coliformes fecales entre 1.32 NMP/ml y 1.58 NMP/ml, en sistemas de producción concreto y rústico respectivamente.

Zapata *et al.* (2009), caracterizaron bioquímicamente a *Lactobacillus plantarum* a partir de una muestra de leche fermentada utilizando agar MRS, características morfológicas y la prueba del API50CHL, en donde se demostró propiedades probióticas tal como indica su crecimiento a un pH ácido de 2.0 y 0.3% de sales biliares y productora de bacteriocina, por su parte, Alvarado & Díaz (2009), obtuvieron resultados de la actividad inhibitoria de *Lb. plantarum* frente a *Salmonella tiphy* y *Listeria monocytogenes* con halos de inhibición de 9 – 11 mm, asimismo, Sánchez & Peña (2016), indican que cepas de *Lactobacillus* spp. tienen capacidad de inhibir a bacterias patógenas como *Staphylococcus* spp; sin embargo, la cepa ML5 tuvo capacidad de inhibir con halos de



inhibición de 54 – 65 mm ante *Staphylococcus chromogenes* y *St. aureus*, en otra investigación, Reyes (2010), indica que solo *Lb. plantarum* presenta un efecto inhibitorio contra *Carnobacterium piscicola* pero los antibióticos como amoxicilina y eritromicina no presentaron ningún efecto inhibitorio.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Bacterias probióticas Definición

La palabra probiótico etimológicamente deriva del latín “pro”, que quiere decir “por” y del derivado griego “bios”, que representa “vida” (Cordero *et al.*, 2014) Son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en el alimento, ayudan en forma beneficiosa al desarrollo del asociado al tracto gastrointestinal del hospedador y generar efectos benéficos como el incremento en la conversión alimentaria, en la resistencia a enfermedades y de la calidad del ambiente (Fuller, 1989). Pueden ser derivados para la producción de suplementos dietéticos, medicamentos, los microorganismos más utilizados son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* como probióticos, así como el uso de especies de *Bacillus* y *E. coli* y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* las cuales son manejados como probióticos (Velásquez, 2012). Una comparación de distintas definiciones realizadas por expertos (Tabla 1).

Tabla 1. Definiciones manejadas por las corporaciones científicas para prebióticos, simbióticos y probióticos (WGO, 2011).

Probióticos	Prebióticos	Simbióticos
Microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se los administra en cantidades adecuadas	Ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la flora gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped	Productos que contienen tanto probióticos como prebióticos

2.2.2 Mecanismo de Acción de los Probióticos

Tovar *et al.* (2008), los probióticos perturban al ambiente intestinal, la cual están estimulando los diversos mecanismos inmunitarios de la mucosa estomacal y para lo cual estimulando los otros no inmunitarios, por medio de una competencia con potenciales patógenos. Se sospecha que dichos fenómenos intervienen en la gran parte de los efectos beneficiosos. Irianto & Austin (2002) y Gómez & Balcázar (2008), señalan que la gran parte de los saberes sobre los probióticos en la acuicultura han propuesto como primordiales mecanismos de acción: optimización de la nutrición, exclusión competitiva con bacterias patógenas, enzimas esenciales en los animales, estimulación de la respuesta inmune en el hospedador y digestión por el suministro de nutrientes.

En estos pacientes el uso de probióticos se plantea con el objetivo de reestablecer la microflora intestinal, aumentar la respuesta inmunitaria, competir con las bacterias patógenas y retirar sus toxinas (Figura. 1).

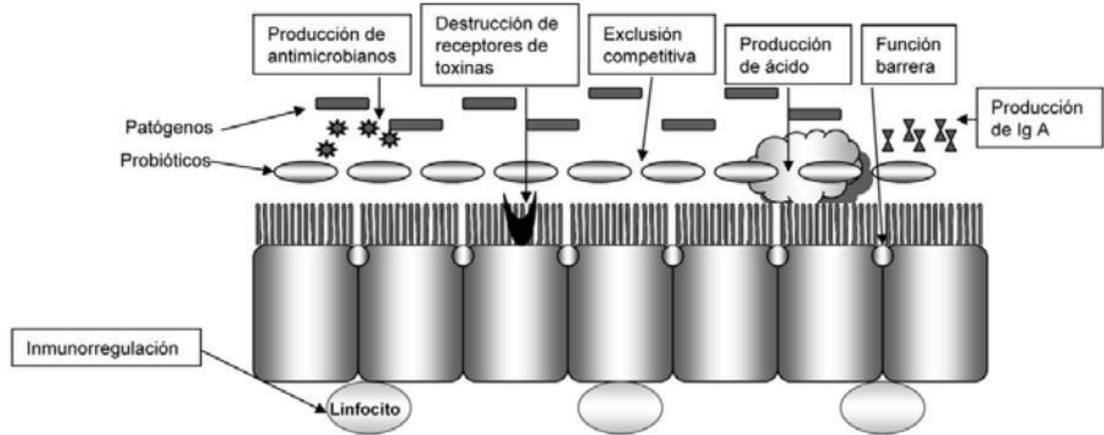


Figura 1. Mecanismo de actividad probiótica (Ewaschuk & Dieleman, 2006).

2.2.3 Clasificación

El mecanismo de la microbiota comensal, lograría ser postulante para ser probiótico, sin embargo, los que son los más utilizados corresponden a dos grupos microbianos: Bifidobacterias y *Lactobacillus*, como también QPS (Qualified Presumption of Safety) y GRAS (Generally Regarded As Safe). De igual manera, con ese mismo fin, microorganismos como *E. coli* y *Bacillus cereus*, levaduras y en especial al principalmente: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* (WGO, 2011). Ver (Tabla 2).

Tabla 2. Probióticos manipulados en acuicultura y secuela en el hospedador (Pérez, 2011).

Especies de peces	Probióticos	Efecto
<i>Epinephelus coloides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Streptococcus</i> sp o iridovirus



<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Vibrio fluvialis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Carnobacterium</i> sp <i>Micrococcus luteus</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Lactococcus garvieas</i> y <i>Streptococcus inias</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	Expresión genética de citoquinas y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas salmonicida</i> y <i>Yersinia ruckeri</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Estimulación de la respuesta inmune y expresión genética de citoquinas



<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas</i> sp
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Exclusión competitiva y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Lactococcus garvieae</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas sobria</i> <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Estimulación de la respuesta inmune y mejora de la supervivencia tras una infección experimental con <i>Aeromonas bestiarum</i> y <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>
<i>Sparus aurata</i>	<i>Lactobacillus</i> sp <i>Bacillus subtilis</i>	Estimulación de la respuesta inmune

2.2.4 Bacterias que prevalecen en la microflora intestinal de organismos acuáticos

Numerosas investigaciones dan a conocer que en tracto digestivo de peces marinos se halla conformada por microorganismo de distintos géneros como: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Carnobacterium*, *Micrococcus* y *Alcaligenes*, en cambio para los peces de agua dulce predominan géneros como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactococcus* y *Aeromonas* (Monroy *et al.*, 2012), sin embargo gracias al uso de otros técnicas de aislamiento las cuales se tiene al método de PCR, del ADN polimórfico (RAPD) Y ADN_r16S, donde se identificaron especies de *Kluyvwwra*, *Citrobacter gillenin*, *Bacillus* sp, *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp y *Shewanella marinus* (Balcázar *et al.*, 2006).

La biopreservación es la conservación manipulando muchas condiciones con



la finalidad de incrementar la vida útil y asimismo incrementar la seguridad de los alimentos de consumo humano, el cual utiliza la microbiota natural y las sustancias antimicrobianas que producen (Lewus & Montville, 1991), una de las más tradicionales es el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales se aíslan desde pescados, lácteos, vegetales y productos cárnicos, quienes poseen propiedades antibacterianas, gracias a los productos de su metabolismo entre ellos el ácido acético, láctico, diacetaldehído, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y reuterina (Hugas, 1998). Las BAL, sobreviven y se desarrollan en condiciones de pH bajo, a diferencia de otros que poseen metabolismo respiratorio, debido a que producen ácido láctico, donde liberan protones al exterior celular, logrando la homeostasis del pH interno (Urrego & Cadavid, 2005).

Asimismo, el efecto antibacteriano por las BAL se debería a los siguientes compuestos químicos:

- **Compuestos no proteicos.** Entre ellos se cita a la reuterina, que solo es sintetizada por *Latobacillus reuteri*, es aislado del tracto gastrointestinal de seres humanos y a partir de los animales, posee actividad antimicrobiana muy amplia sobre bacterias Gram negativas y positivas, mohos, levaduras y protozoos debido a que la reuterina desactiva la actividad enzimática del ribonucleótido reductasa que está relacionada con la biosíntesis del DNA, originando así un amplio espectro antimicrobiano (García *et al.*, 1995).
- **Metabolitos del oxígeno.** En condiciones aerobias, las BAL biosintetizan aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres, los cuales poseen un efecto bacteriostático y bactericida sobre la flora láctica y no láctica (Requena & Peláez, 1995), donde el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene una función oxidante produciendo radicales libres que dañan los componentes intracelulares esenciales, como lo son los lípidos, proteínas y el DNA (Jangho *et al.*, 2008), y

se acumulan en los medios debido a que las BAL no producen catalasa (Moreira, 1993).

- **Bacteriocinas.** Son proteínas o péptidos bactericidas fabricados en los ribosomas de las BAL, se produce en la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (Feria, 2007), dichas moléculas son estables a pH ácido o neutro, poseen un espectro reducido y que solo tiene efecto sobre bacterias sensibles (Requena & Peláez, 1995). García *et al.* (1995), manifiesta que las bacterias Gram negativas son sensibles a las bacteriocinas, y aquellas de amplio espectro es propia de bacterias de origen alimentario procedentes de la carne y sus derivados, tales como las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* quienes producen bacteriocinas activas sobre bacterias Gram negativas (Moreira, 1993).

2.2.5 Efecto inhibitorio de las bacterias probióticas

Los probióticos originan una gran diversidad de agregados químicos de un vasto espectro (Bidhan *et al.*, 2013). Es por ello que la gran elaboración de antibióticos como: lisozimas, proteasas, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, sideróforos y la elaboración de ácidos orgánicos por cambio del pH (Sihag & Sharma, 2012); (Bidhan *et al.*, 2013). Es así que establecen un aspecto inhibitorio frente a patógenos oportunistas (Strom y Wiklund, 2011; Sihag y Sharma, 2012). La elaboración de enzimas y metabolitos en cepas probióticas pueden causar distintos efectos inhibitorios en contra de microorganismos patógenos, dentro de los cuales se encuentran enzimas (proteasas y lisozima), bacteriocinas, ácido láctico, sideróforos, CO₂, etanol y peróxido de hidrógeno (Gatesoupe, 2008).

Entre las bacterias probióticas reportadas para el control biológico de bacterias patógenas se mencionan a *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, *Lactococcus* sp, *Enterococcus*



sp, *Carnobacterium* sp, *Vibrio alginolyticus*, *Pediococcus* sp, *Streptococcus* sp, entre otras y los mecanismos que originan impactos positivos deseados en los peces, se mencionan:

a. Excluye de forma competitiva a las bacterias patógenas.

Según Snyderman (2008), las bacterias probióticas compiten por las zonas de adhesión al epitelio intestinal, disminuyendo así los microorganismos patógenos del intestino (Mohapatra *et al.*, 2013), lo cual es refrendado por los estudios realizados por Irianto & Austin (2002) quienes afirman que existen bacterias que se asocian a la mucosa intestinal de Turbot (*Scophthalmus maximus*), y logran disminuir el crecimiento de la bacteria patógena *Vibrio anguillarum*, por otra parte Ramos *et al.* (2013), registraron un gran número de BAL como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* luego de una epidemia de forunculosis, a su vez Ng *et al.* (2014), reportan que *Citrobacter freundii*, *Bacillus firmus*, *B. pumilus* presentaron actividad probiótica sobre *Aeromonas hydrophila* en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

b. Es fuente de nutrientes y contribuye en la síntesis de enzimas a la digestión.

Consiste en que las bacterias sintetizan metabolitos como los ácidos láctico, fórmico y acético, éstos incrementan su crecimiento y la inmunidad, otorgándoles resistencia a las enfermedades por medio de la exclusión competitiva, tales como la combinación de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, inducen un incremento en las tasas de crecimiento de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Larsen *et al.*, 2014).



c. Potencian la respuesta inmune frente a los microorganismos patógenos.

Los probióticos promueven la producción de anticuerpos en el hospedero, protegiéndose de los patógenos, en especial frente a *Plesiomonas* sp y *Aeromonas* sp (Enterobacteriaceae), *Bacteroides* sp (bacterias anaerobias obligadas), *Fusobacterium* sp y *Eubacterium* sp (Nayak, 2010) e inclusive poseerían efectos antivirales.

d. Mejoran la calidad del agua.

Se asocia a la presencia de *Bacillus* sp, ya que transforma la materia orgánica en productos desdoblados asimilables para animales, entre ellos polisacáridos, dextrinas y aminoácidos, tal como los registraron Sugita *et al.* (1998) quienes, en camarones jóvenes, al utilizar *Bacillus* sp, lograron mejorar la sobrevivencia, las tasas de crecimiento y los parámetros de calidad de agua donde habitaba la especie.

2.2.6 Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

a. Biología de la trucha arco iris

La trucha arco iris se caracteriza por presentar un cuerpo con finas escamas y forma fusiforme (forma de huso), su coloración varía según su estado de maduración sexual, el ambiente donde vive, su edad, la influencia del ambiente en riachuelos, originando un color plomo oscuro, expuestos a los rayos del sol presentan una tonalidad verde oliva en la región superior, una franja rojiza que finaliza en un abdomen blanco, también posee muchas máculas negras en la piel (Maiz *et al.*, 2010). La trucha arco iris habita ambientes acuáticos cristalinos y no contaminadas, con cauces y desniveles topográficos que originan movimientos rápidos y cascadas comunes en ríos de alta montaña con aguas frías, claras, cristalinas y bien oxigenadas (Camacho *et al.*, 2000).

Según la FAO (2019) con respecto a su anatomía, la trucha arco iris posee una forma fusiforme, entre 60 y 66 vértebras, de 3 a 4 espinas dorsales, con 19 rayos caudales, de 3 a 4 espinas anales, de 8 a 12 rayos anales blandos y de 10 a 12 rayos dorsales blandos, también posee una aleta adiposa de borde negro sin tubérculos nupciales, con ciertos cambios en la boca y cabeza, una coloración azul a verde oliva a lo largo de la línea lateral (Figura 2).

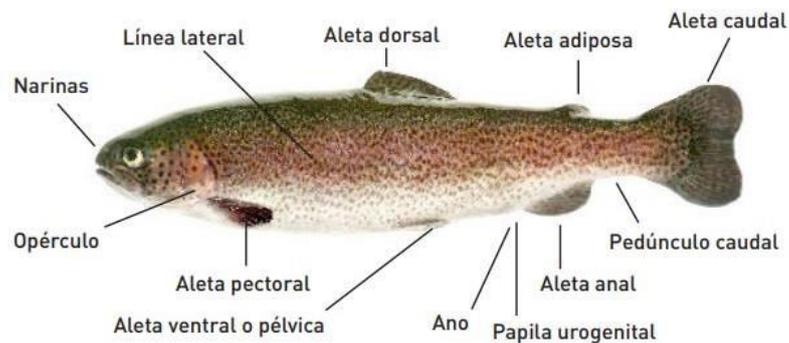


Figura 2. Estructura morfológica de *Oncorhynchus mykiss* (Arregui, 2013).

b. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris

Dominio	: Eucarya
Reyno	: Animalia
Sub Reino	: Metazoa
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Grupo	: Gnatostomata
Súper Clase	: Pisces
Clase	: Osteichthyes
Sub clase	: Actinopterygii
Super orden	: Clupeomorpha
Orden	: Salmoniformes
Sub orden	: Salmonoidei
Familia	: Salmonidae
Género	: <i>Oncorhynchus</i>
Especie	: <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)



Nombre común : Trucha “arco iris” (Camacho *et al.*, 2000).

Fuente: Adaptado por Smith y Stearley, Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos, Comité de nombre científicos de peces, American Fisheries Society (<http://web.fisheries.org/main/2006>).

c. Etapas de desarrollo

Según Atencio (1998), el desarrollo biológico de la trucha arco iris comprende las siguientes etapas:

- **Embrión.** Se caracteriza por la germinación de un cuerpo organizado, se denomina así desde el momento en que la esperma fecunda a la ova y comienza el desarrollo embrionario hasta llegar a la eclosión.
- **Larva.** Esta etapa comienza desde que las truchas están eclosionando del huevo y pesa un aproximado de 0.2 gramos y tiene una medida menos o igual a 18 milímetros. Las larvas para continuar con su desarrollo se caracterizan por tener un saco vitelino como su reserva alimenticia.
- **Alevino.** Son cuando las especies de trucha alcanzan una medida desde los 2 a 10 centímetros, con un peso que varía de 0.15 a 13 gramos Durante esta etapa requiere alimentarse mínimo unas ocho veces durante cada día.
- **Juvenil.** Las truchas juveniles logran una medida de 10 hasta los 20 centímetros, cuyo peso alcanza generalmente de 16 a 90 gramos. Un adecuado hábitat como las corrientes de agua son indispensables para que las truchas desarrollen buenos músculos.
- **Adulto.** Considerada como la etapa final debido a que la trucha alcanza un incremento adecuado en su peso para su comercialización, estos logran obtener unas medidas que varían de 20 a 33 centímetros. Llegando a un peso promedio de 105 hasta los 330 gramos.



d. Sistema digestivo de la trucha arco iris

Según Bretón (2007) y Núñez & Somoza (2010), el tracto digestivo de la trucha está conformado por:

- **Boca.** Se encuentra conectado simultáneamente con la cavidad de respiración, posee una función digestiva diferente, diseñada para escoger y administrar el alimento para así pasar al estómago. Se encuentra asociada a la selección y prensión de los alimentos.
- **Esófago.** Órgano, recto, corto y musculoso, comienza en la boca y finaliza en los cardias estomacales.
- **Estómago.** Posee una forma de saco extensivo sigmoideo, cubierto de un gran número de pliegues la cual es rica en poseer glándulas productoras de mucus, ácido clorhídrico y pepsina.
- **Ciegos pilóricos.** La trucha arco iris presenta ciegos pilóricos ubicados en la región de la válvula pilórica del intestino anterior, fijados por los nódulos del páncreas que se ubican esparcidos entre la grasa del mesenterio (Galindo, 2003). Los ciegos pilóricos son únicos en los peces, constituyen apéndices tubulares, de forma, número y tamaño variable, se ubican entre la región pilórica estomacal y la región proximal intestinal anterior (Albrecht *et al.*, 2000), presentando ciertas diferencias entre especies (Hossain & Dutta, 1988), que generalmente son consideradas como adaptaciones del sistema digestivo (Pérez-Espan & Abitia- Cárdenas, 1996). Entre sus funciones se menciona que incrementa el área de superficie intestinal para aumentar la absorción y secreción, son también considerados órganos accesorios que almacenan alimentos y es un ambiente donde se realiza la reproducción de la flora y fauna intestinal (Dimes *et al.*, 1994).

- **Intestino.** Órgano que toma la forma de un tubo sin ninguna dilatación, constituye el colon, mediado entre el píloro y el ano, se fracciona en ciegos pilóricos, intestino craneal, caudal y por el recto.
- **Recto.** Posee una pared muscular mucho más gruesa que el intestino, la cual posee una túnica interna, inmersa en glándulas mucosas y con una facultad de realizar distensión.

2.2.7 Propiedades fisicoquímicas del agua para la crianza de truchas

Tabla 3. Rangos óptimos de los parámetros fisicoquímicos del agua para la producción de truchas.

Parámetros	Rango óptimo
Temperatura del agua	10 – 16 °C
Oxígeno disuelto	6.5 – 9 ppm
pH	6.5 – 8.5
CO ₂	< 7 ppm
Alcalinidad	20 – 200 mg/l CaCO ₃
Dureza	60 – 300 mg/l CaCO ₃
NH ₃	No mayor de 0.02 mg/l
H ₂ S	Máximo aceptado de 0.002 mg/l
Nitratos	No mayor de 100 mg/l
Nitritos	No mayor de 0.055 mg/l
Nitrógeno Amoniacal	No mayor de 0.012 mg/l
Fosfatos	Mayores de 500 mg/l
Sulfatos	Mayor de 45 mg/l
Fierro	Menores de 0.1 mg/l
Cobre	Menores de 0.05 mg/l
Plomo	0.03 mg/l
Mercurio	0.05 mg/l

Fuente: Ragash (2009).

Tabla 4. Valores promedios de parámetros fisicoquímicos del agua de estanques del CIPBS – Chucuito.

Parámetros	Rango óptimo
Temperatura (°C)	12.5
Oxígeno disuelto (mg/l)	5.402
Nitrito (mg/l)	0.00
Alcalinidad (mg/l)	70.4
pH (unidades)	7.1
Dureza (ppm)	92.3
Amonio (mg/l)	0.01
Caudal (l/s)	2.266

Fuente: Salamanca (2020).

2.2.8 La alimentación de la trucha arco iris

La alimentación de la trucha común es hasta satisfacer sus necesidades energéticas según su estado de saciedad y su tasa de digestión (Brett, 1971), es raro que utilice todos los organismos de su base trófica, siendo su principal fuente de alimento los invertebrados bentónicos como moluscos, crustáceos e insectos, consumiendo taxones abundantes y accesibles del bentos (Macneil *et al.*, 2000), y si habitan los ríos su dieta está a base de especies de macroinvertebrados (Montañés & Lobón Cerviá, 1986).

Las truchas son peces predadores que capturan y devoran seres vivos, su tracto digestivo está diseñado para asimilar proteínas animales y sólo digerir pequeñas porciones de productos vegetales. La dieta básica debe contener mayor cantidad de proteína de naturaleza animal, donde un pienso de baja calidad posee entre 28 y 35% y de alta calidad entre 45 - 50% (Orna, 2010). Cáritas del Perú (2015) recomienda que los requerimientos de alimentos comerciales para trucha arco iris según estadíos sean los



siguientes:

- **Pre Inicio 55:** su presentación de estos alimentos debe ser en forma de harina, deber ser suministrado en peces con saco vitelino absorbido en un 80%, con una frecuencia entre 10 a 12 veces al día.
- **Pre Inicio 50:** contiene una alta concentración de proteínas de alta calidad y digestibilidad, debe poseer también vitaminas del grupo B y minerales como hierro, para la síntesis de hemoglobina para el transporte del oxígeno hacia los diferentes tejidos y órganos de la trucha.
- **Inicio 45:** es un alimento de alto valor nutricional, rico en nutrientes muy digestibles, suministrado a truchas en fase de alevinaje con longitudes entre 1.5 x 2.0 cm, preparando a las truchas para la fase del crecimiento y desarrollo, al igual que el alimento pre inicio posee un alto contenido de proteínas de alta calidad y digestibilidad superior al 90%, debe estar enriquecido con vitaminas y minerales que asegure un rápido crecimiento y desarrollo de los alevinos.
- **Crecimiento I:** es un alimento con un mínimo del 42% de proteína, formulado para truchas juveniles, los pellets tienen un calibre entre 2.5 x 2.5 mm según su crecimiento, con ello se debe lograr la máxima tasa de crecimiento y una elevada tasa de conversión alimenticia.
- **Crecimiento II:** posee como mínimo el 42% de proteína, también formulado para truchas juveniles, cuyo calibre del pellet se encuentra entre 4.0 x 4.0 mm según el crecimiento del pez, también asegura una elevada tasa de crecimiento y conversión alimenticia.
- **Acabado:** posee el 40 % de proteína de alta digestibilidad y óptimos niveles de energía, para asegurar la excelente formación de la masa muscular, buena textura y elevada calidad de carne, posee un calibre de pellet entre 6.0 x 6.0 mm.



- **Acabado Pigmentante:** contiene 660 g de Astaxantina - Carophil rosado, que es un pigmentante natural del alimento, y es aplicado al alimento extra pellet para asegurar una completa pigmentación.

2.2.9 Colonización bacteriana de la mucosa intestinal

Se caracteriza debido a que las bacterias poseen afinidad por la mucosa intestinal, dentro del mucus, así como también unido a las células epiteliales, adhiriéndose y colonizándose según el principio de exclusión por competencia de espacio y de nutrientes (Westerdahl *et al.*, 1991), Conway *et al.* (1987), afirman que la colonización en el tracto gastrointestinal está influida por la persistencia de un periodo de tiempo determinado, ya que la tasa de multiplicación debería ser mayor a la tasa de eliminación del mismo, ante ello Gullian & Rodríguez (2002) manifiestan que *Vibrio* sp, mayormente coloniza el hepatopáncreas en juveniles de camarón blanco, pero, en su microbiota normal puede adicionarse artificialmente a *Bacillus* sp, al incluirlo en el agua por un tiempo de 20 días. Al respecto Gullian *et al.* (2004), mencionan dos factores que incrementarían la colonización, tales como los factores relacionados al hospedero (concentración de enzimas, temperatura corporal, resistencia genética y los niveles de potencial oxido- reducción) y los factores asociados a los microorganismos (proteasas, peróxidos de hidrógeno, bacteriocinas, lisozimas, microorganismos inhibitorios, formación de amoníaco, alteraciones del pH, compuestos diacéticos y la producción de ácidos orgánicos).

2.2.10 *Escherichia coli*

Escherichia coli representa gran parte de la flora uniforme del intestino de los animales y del hombre, estableciendo una de las especies bacterianas más copiosas en esta localización (Tannock, 1995).



Taxonomía de *Escherichia coli* (Hold & Hendricks,

1994).Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacteria
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Especie	: <i>E. coli</i> (Escherich, 1885)

Etiología. *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo con un metabolismo t fermentativo como también respiratorio. Puede ser inmóvil o móvil por flagelos peritricos (Rivas *et al.*, 2011). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son enzimas procedentes de bacilos Gram negativos fundamentalmente Enterobacterias (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*), que inactivan a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, así como las oximino-cefalosporinas y al aztreonam (García, 2013). La cual puede tolerar temperaturas de 35 – 43 °C, como es la temperatura corporal de los animales de sangre caliente, y su temperatura mínima de incremento se da alrededor de 7 °C (Benvenuto, 2017).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONAS DE ESTUDIO

Las muestras de truchas juveniles fueron colectadas en el Centro de Investigación y Producción de Bienes y Servicios (CIPBS) Chucuito, el cual pertenece a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA Puno, cuenta con la R. D. R. N° 146-2007-DIREPRO/GR-PUNO y R. D. R. N° 063-2010-DIREPRO/GR-PUNO, posee derecho de autorización y concesión respectivamente, y es de menor escala, tiene una extensión de 1.7 ha de estanques de agua, asimismo cuenta con jaulas flotantes en el muelle Barco y se ubica a 3,850 msnm, en el distrito de Chucuito, provincia y región Puno, cuyas coordenadas de ubicación geográfica fueron de 15°53'48.59" de latitud sur y 69°53'45.08" de longitud oeste (Sihuacollo, 2016). Por otra parte, también se colectaron individuos de juveniles de truchas arco iris en los mercados Unión - Dignidad y Central de la ciudad de Puno, donde se expende trucha fresca procedentes de las provincias de El Collao, Chucuito – Juli, entre otras (Figura 3).

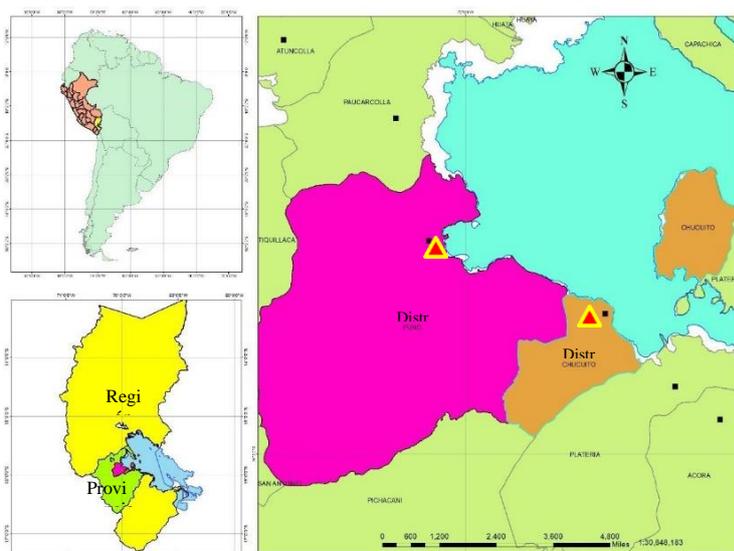


Figura 3. Ubicación de los puntos de muestreo de truchas arco iris (CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno), agosto – octubre 2019.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

Fue explicativo, porque este tipo de estudio da a conocer las causas de los fenómenos y/o eventos que se llevan a cabo en la naturaleza (Hernández *et al.*, 2014), en esta investigación se explicó si las bacterias probióticas *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp poseen efectos inhibitorios y los mecanismos de acción que los origina sobre *E. coli*. Fue experimental de corte transversal, debido a que se tuvo tratamientos y su respectivo control y durante una determinada temporalidad (Caballero, 2005).

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra fue no probabilística por conveniencia (Casal & Mateu, 2003), donde las muestras fueron colectadas al azar, es decir que las truchas juveniles fueron colectadas según el individuo que cayera a la malla de colección (chinguillo), asimismo los vendedores elegidos para la adquisición de truchas juveniles fueron al azar en ambos mercados (Unión – Dignidad y Central), el número de muestras colectadas fue tal como se detalla en la Tabla 5. En cada punto de muestreo se obtuvieron tres muestras en cada mes de evaluación (agosto, setiembre y octubre), e hizo un total de 27 unidades experimentales.

Tabla 5. Distribución de muestras por zonas y meses de muestreo.

Meses de muestreo	Puntos de muestreo			Total
	CIP Chucuito	Unión – Dignidad	Central	
Agosto	3	3	3	9
Setiembre	3	3	3	9
Octubre	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

El muestreo de los juveniles de trucha arco iris se llevó a cabo en el CIPBS – Chucuito de la UNA – Puno y dos mercados de la ciudad de Puno, se identificados como



individuos sanos, carentes de signos clínicos de enfermedad, manipulándolos con guantes descartables, los peces fueron colectados y acondicionados en un pequeño cooler y una bolsa gruesa de polietileno, luego fueron trasladados al laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.4 EVALUACIÓN DE LA CARGA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (*Lactobacillus* sp Y *Bacillus* sp) EN CONTENIDO INTESTINAL DE JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS DEL CIPBS CHUCUITO Y MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO

3.4.1 Aislamiento de cepas de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp

a. Método: Recuento en placa.

b. Fundamento: El recuento en placa es una técnica basada en la medición de “unidades formadoras de colonias” o UFC por g o ml de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección luego de un tiempo y temperatura adecuada para su crecimiento, el microorganismo o de un agregado de ellos proviene de la muestra de estudio, el cual puede originar la formación de una colonia denominándose UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009).

c. Procedimientos:

- Las muestras de individuos juveniles de trucha arco iris, fueron obtenidas del CIPBS – Chucuito y de los mercados Unión – Dignidad y Central de la ciudad de Puno.
- En los individuos juveniles se realizó la disección iniciando por el lado izquierdo de la trucha, iniciando por el poro anal y continuando por la línea



lateral, descubriéndose la cavidad celómica del pez y ubicándose el tracto intestinal con una pinza y el estilete (Quispe, 2017).

- Se colectaron 3 ml del contenido de tracto intestinal, de los cuales un ml fue transferido a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua peptonada 1% (dilución 10^{-1}), luego de disolverse con ayuda de un vórtex, a partir de ella se procedió a preparar las diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-5} , luego se realizó la siembra por extensión sobre placas Petri conteniendo agar *Lactobacillus* previamente esterilizado.
- En el medio de cultivo las colonias de *Lactobacillus* sp aparecieron como medianas grandes blancas, la identificación morfológica se realizó mediante tinciones Gram.
- La carga probiótica de bacterias *Lactobacillus*, se determinó obteniendo el promedio de recuento de colonias en placa, multiplicado con el factor de dilución inicial de la muestra, resultando las UFC/ml por muestra.
- La identificación de colonias bacterianas de *Lactobacillus* sp se confirmó mediante pruebas bioquímicas, como la prueba de azúcares fermentables (lactosa) en tubos de ensayos, preparando 10 ml de cada uno de los azúcares al 1%, 10 ml de rojo fenol al 0.1%, seguidamente se realizaron pruebas de catalasa y de tolerancia a tres concentraciones diferentes de NaCl (3.5, 4.5 y 5.5%).
- El recuento de *Bacillus* sp, se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para *Lactobacillus* sp con la diferencia de que se cultivó en agar Nutritivo (ANMAT, 2013), también se cultivó 1 ml de la muestra diluida de contenido intestinal por extensión, se incubó a 37 °C por 48 horas (Figura 4), las colonias que tengan crecimiento, fueron teñidas mediante la tinción Gram (Carrera, 2009), seguidamente se realizaron 4 pruebas bioquímicas, como son la prueba

de la catalasa (Zapata, 2012), prueba en Agar Hierro Triple Azúcar (Cuervo, 2010), Voges Proskauer (Aquiahuatl *et al.*, 2012) y la prueba de la hidrólisis del almidón (Carrera, 2009).

- El recuento se realizó al igual que con *Lactobacillus* sp.

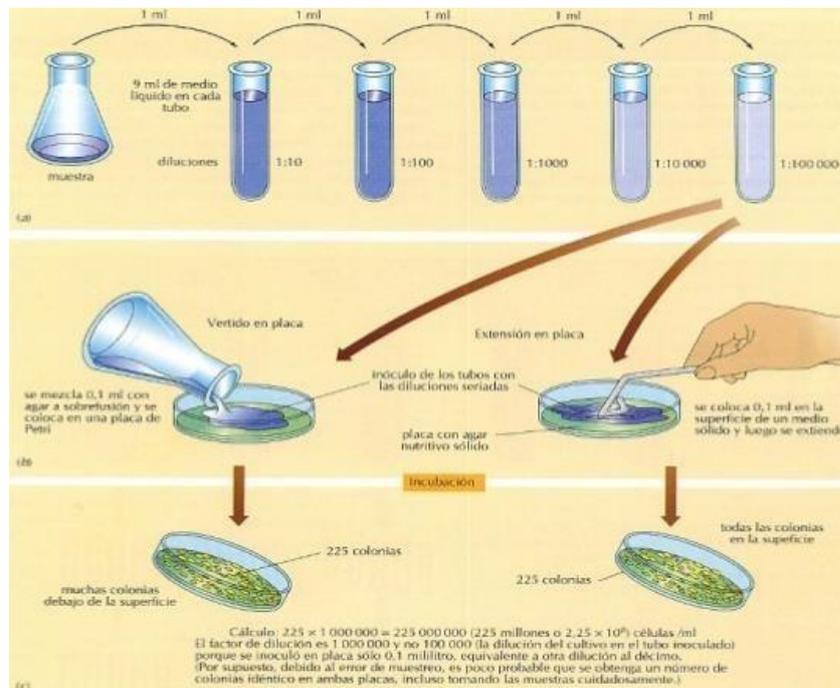


Figura 4. Procedimientos a realizar para la cuantificación de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp (Sanz, 2011)

3.4.2 Análisis bioestadístico de datos

El diseño de investigación fue experimental, la colección de muestras fue al azar y los recuentos de bacterias probióticas *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp fueron comparadas entre los tres puntos de muestreo (CIPBS Chucuito, mercado Unión – Dignidad y el mercado Central), cada experimento tuvo un total de 3 repeticiones, distribuidos en 3 meses de ejecución. Las unidades experimentales estuvieron constituidas por 27 muestras. Los recuentos bacterianos fueron analizados mediante pruebas de Kruskal Wallis y prueba de rangos, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (Ibáñez, 2009). Los análisis estadísticos se realizaron en el software INFOSTAT versión estudiantil.



3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE ESTANQUES DE CRIANZA DE TRUCHAS DEL CIPBS CHUCUITO

3.5.1 Aislamiento de cepas de *Escherichia coli*

Método: Cultivo *in vitro* por agotamiento

Fundamento: El agar Eosin Metil Blue (EMB), posee azul de metileno y eosina, que inhiben a las bacterias Gram positivas, asimismo son indicadores diferenciales de los procesos de fermentación de lactosa o sacarosa por los microorganismos cultivados, *E. coli* forma colonias de color negro azulado, exhibiendo un brillo verde metálico producto de la fermentación de la lactosa, este medio puede inhibir a las bacterias Gram positivas (Camacho *et al.*, 2009).

Procedimiento: a partir de las muestras de agua de estanques, un ml de la muestra fue transferido sobre una placa Petri conteniendo 20 ml de Agar EMB, con ayuda de un asa de Digralsky se realizó el cultivo de la muestra por extensión, lográndose una uniforme distribución de la muestra, esperando el crecimiento de bacterias, luego de 5 minutos de extendida la muestra se incubaron por 24 horas a 37 °C, las bacterias *E. coli* fueron aquellas cepas de color negro azulado con formación de un brillo metálico verde, seguidamente se realizó la coloración Gram.

3.5.2 Evaluación del efecto inhibitorio de bacterias *Lactobacillus sp* y *Bacillus sp* sobre cepas de *Escherichia coli*

Para cumplir este objetivo se tomó en consideración los procedimientos realizados por Ramírez (2010).

Método: Kirby Bauer y Escala de McFarland.



Fundamento: es un procedimiento técnico basado en la turbidimetría, la escala de MacFarland, se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico diluido, dichos estándares son necesarios para elaborar suspensiones bacterianas para realizar pruebas de antibiograma (Rojas, 2011).

Procedimiento: primeramente, en placas con agar Muller Hinton se sembró a *E. coli* con un hisopo estéril cargado de una dilución de suspensión aproximada de 1.5×10^8 células/ml (estándar 0.5 de MacFarland) por la técnica de agotamiento. Debido a recuentos bajos de bacterias probióticas (*Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp) en truchas del CIPBS – Chucuito, también se aislaron bacterias probióticas desde el tracto digestivo de juveniles adquiridos en los mercados Unión – Dignidad y Central, y para la preparación de la dilución estándar 0.5 de MacFarland, con el asa de siembra se colectó bacterias probióticas a partir de placas Petri con colonias aisladas desde ambas zonas de muestreo.

A continuación, *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp, también fueron preparados con suero fisiológico conteniendo carga bacteriana de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp colectada con el asa de siembra a partir de las colonias de cultivos puros, éstas fueron contrastadas con la dilución estándar 0.5 de McFarland, luego fueron impregnadas en discos de papel filtro estéril. posteriormente dispuestas sobre placas Petri con agar Muller Hinton cultivado con la cepa de *Escherichia coli*, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas, finalmente se midieron los halos de inhibición bacteriana originado por las bacterias *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp en el crecimiento de *Escherichia coli*, comparándose con los halos de inhibición bacteriana originada por el control positivo o discos de sensibilidad del antibiótico gentamicina (10 µg) (Corzo, 2012).



3.5.3 Análisis bioestadístico de datos

El diseño de investigación fue experimental, el muestreo de las colonias de las tres bacterias fue al azar a partir de sus placas Petri con cultivo puro, se consideró tres tratamientos, los discos de sensibilidad de *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp y el antibiótico Gentamicina (10 µg) considerado testigo, cada experimento tuvo 3 repeticiones. Los resultados de las mediciones de los halos, fueron evaluados mediante pruebas de Kruskal Wallis y comparación de rangos. Todo el análisis se consideró un nivel de significancia de alfa =0.05 (Ibáñez, 2009). Los análisis estadísticos se realizaron en el software INFOSTAT versión estudiantil.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARGA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS (*Lactobacillus* sp Y *Bacillus* sp)

ENCONTENIDO INTESTINAL DE JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS DEL CIPBS CHUCUITO Y DOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO.

4.1.1 Recuento de *Lactobacillus* sp

La carga de bacterias probióticas *Lactobacillus* sp en contenido intestinal de truchas juveniles en los tres puntos de muestreo oscilaron entre promedios de 37.00×10^6 UFC/ml, determinado en el CIPBS Chucuito en el mes de setiembre y 54.67×10^6 UFC/ml en muestras del mercado Unión - Dignidad en el mes de setiembre (Tabla 6). En cada centro de acopio de juveniles de trucha arco iris, los valores promedios de *Lactobacillus* sp fueron: en el CIPBS Chucuito los recuentos presentaron valores entre 37.00×10^6 UFC/ml y 41.33×10^6 UFC/ml entre los meses de setiembre y agosto, respectivamente; en el mercado Unión – Dignidad, los recuentos variaron entre 44.33×10^6 UFC/ml y 54.67×10^6 UFC/ml, en los meses de octubre y setiembre, respectivamente; y en muestras del mercado Central, los recuentos variaron entre 39×10^6 UFC/ml y 49×10^6 UFC/ml, en los meses de setiembre y octubre, respectivamente.

Tabla 6. Carga probiótica de *Lactobacillus* sp ($\times 10^6$ UFC/ml) en el contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno, agosto a octubre 2019.

Centro de acopio de juveniles de trucha	Meses	Repeticiones			Prom (UFC/ml)	CV (%)
		1	2	3		
CIPBS Chucuito	Agosto	41	45	38	41.33	8.50
	Setiembre	40	35	36	37.00	7.15
	Octubre	38	39	42	39.67	5.25
Mercado Unión – Dignidad	Agosto	50	57	54	53.67	6.54
	Setiembre	55	52	57	54.67	4.60
	Octubre	45	47	41	44.33	6.89
Mercado Central	Agosto	48	45	47	46.67	3.27
	Setiembre	40	35	42	39.00	9.25
	Octubre	47	49	51	49.00	4.08

Los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp mensuales y por puntos de muestreo, presentaron valores de coeficiente de variabilidad (CV) que oscilaron entre 3.27% y 9.25%, lo cual indica que los datos obtenidos de las repeticiones presentaron una dispersión leve. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis a los recuentos de *Lactobacillus* sp entre los meses de muestreo, se determinó que no presentaron diferencia estadística significativa ($H = 1.65$; $P = 0.4375$), al resultar el valor P mayor a 0.05, pero observando los promedios, los mayores recuentos se determinó en los meses de agosto, seguidos de los colectados en los meses de octubre y setiembre, respectivamente (Figura 25). Por otro lado, también al realizar la prueba de Kruskal Wallis a los recuentos de *Lactobacillus* sp entre puntos de muestreo, se determinó que presentaron diferencia estadística significativa ($H = 13.70$; $P = 0.0010$), al resultar el valor P menor a 0.05, y según la comparación de rangos, los recuentos bacterianos fueron mayores en muestras colectadas de los puntos de muestreo mercados Central y Unión - Dignidad, si presentaron diferencia estadística entre ellos, pero fueron superiores a los obtenidos en muestras

del CIPBSChucuito (Figura 5).

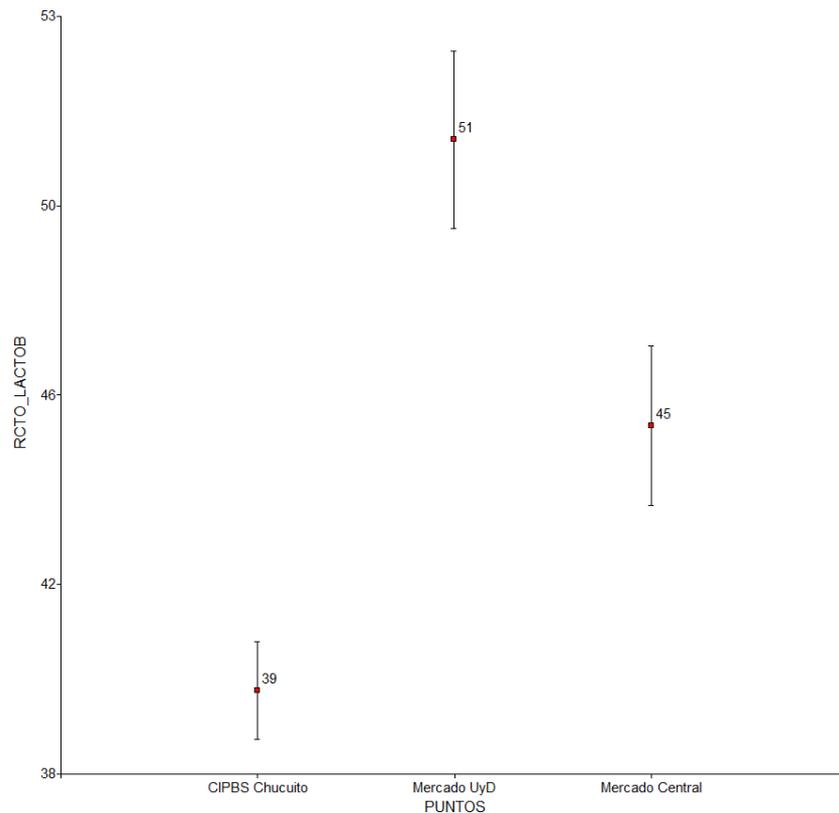


Figura 5. Comparación de recuentos de la carga bacteriana de *Lactobacillus* sp en el tracto intestinal de trucha arco iris según puntos de muestreo, agosto – noviembre 2019.

4.1.2 Recuento de *Bacillus* sp

Los recuentos bacterianos de *Bacillus* sp en contenido intestinal de truchas juveniles en los tres puntos de muestreo variaron entre promedios de 175.33×10^6 UFC/ml, determinado en el mercado Central en el mes de setiembre y 232×10^6 UFC/ml en muestras del CIPBS Chucuito en el mes de octubre (Tabla 7). En cada centro de acopio de juveniles de trucha arco iris, los valores promedios de *Bacillus* sp fueron: en el CIPBS Chucuito los recuentos presentaron valores entre 215.33×10^6 UFC/ml y 232.00×10^6 UFC/ml entre los meses de agosto y octubre, respectivamente; en el mercado Unión – Dignidad, los recuentos variaron entre 201×10^6 UFC/ml y 221×10^6 UFC/ml, en los

meses de agosto y octubre, respectivamente; y en muestras del mercado Central, los recuentos variaron entre 175.33×10^6 UFC/ml y 187×10^6 UFC/ml, en los meses de setiembre y agosto, respectivamente.

Tabla 7. Carga probiótica de *Bacillus sp* ($\times 10^6$ UFC/ml) en el contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris del CIPBS Chucuito y mercados de la ciudad de Puno, agosto a octubre 2019.

Centro de acopio de juveniles de trucha	Meses	Segmentos evaluados			Prom _ (UFC/ml)	CV (%)
		S-1	S-2	S-3		
CIPBS Chucuito	Agosto	201	210	235	215.33	8.18
	Setiembre	223	215	228	222.00	2.95
	Octubre	230	232	234	232.00	0.86
Mercado Unión – Dignidad	Agosto	190	208	205	201.00	4.80
	Setiembre	200	210	218	209.33	4.31
	Octubre	220	227	216	221.00	2.52
Mercado Central	Agosto	187	198	176	187.00	5.88
	Setiembre	175	171	180	175.33	2.57
	Octubre	190	181	186	185.67	2.43

Los recuentos bacterianos de *Bacillus sp* mensuales y por puntos de muestreo, presentaron valores de coeficiente de variabilidad (CV) que oscilaron entre 0.86% y 8.18%, lo cual indica que los datos obtenidos de las repeticiones presentaron una dispersión leve. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis a los recuentos de *Bacillus sp* entre los meses de muestreo, se determinó que no presentaron diferencia estadística significativa ($H = 2.16$; $P = 0.3394$), al resultar el valor P mayor a 0.05, pero observando los promedios, los mayores recuentos se determinó en los meses de octubre, seguidos de los colectados en los meses de setiembre y agosto, respectivamente. Por otro parte, también al realizar la prueba de Kruskal Wallis a los recuentos de *Bacillus sp* entre puntos

de muestreo, se determinó que presentaron diferencia estadística significativa ($H = 18.88$; $P = 0.0001$), al resultar el valor P menor a 0.05 , y según la comparación de rangos, los recuentos bacterianos fueron mayores en muestras colectadas de los puntos de muestreo mercados Central y Unión – Dignidad, si presentar diferencia estadística entre ellos, pero fueron superiores a los obtenidos en muestras del CIPBS Chucuito (Figura 6).

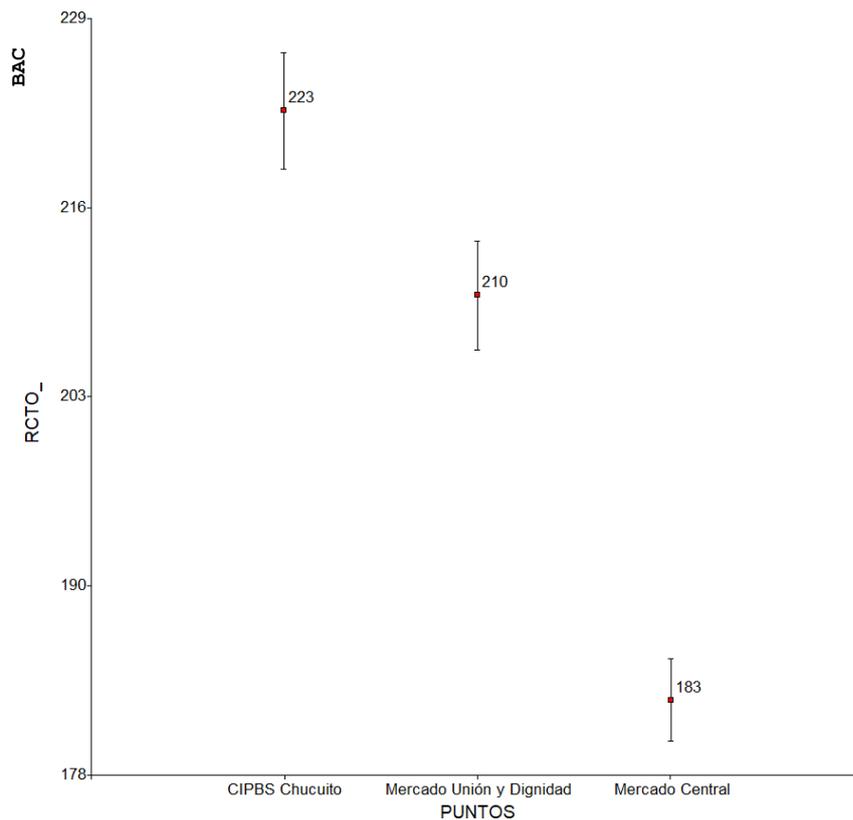


Figura 6. Comparación de recuentos de la carga bacteriana de *Bacillus* sp en el tracto intestinal de trucha arco iris según puntos de muestreo, agosto – noviembre 2019.

En el tracto intestinal de juveniles de trucha arco iris se encontraron recuentos de *Lactobacillus* sp entre 37.00×10^6 UFC/ml y 54.67×10^6 UFC/ml, y *Bacillus* sp entre 175.33×10^6 UFC/ml y 232×10^6 UFC/ml, estos resultados fueron superiores a los reportados por Puello *et al.* (2018), quienes en el tracto intestinal de juveniles de *Piaractus brachypomus* (cachama blanca), encontraron recuentos de 630 UFC/g de *Lactobacillus* sp y 3 UFC/g de *Bacillus* sp; disminuyendo en adultos de 398 UFC/g de



Lactobacillus sp y 50118 UFC/g de *Bacillus* sp y luego en engorde de 1 UFC/g de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp, entre las especies de *Lactobacillus* sp, según Vela *et al.* (2017), afirman que identificaron a *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus* y *Lb. rhamnosus*, las cuales fueron aisladas desde el tracto digestivo del pez de acuario *Hypostomus plecostomus*, pero que, al ser administradas en el cultivo de tilapia del Nilo, obtuvieron resultados en conversiones alimenticias, tasas de eficiencia proteica, tasas de crecimiento específico y eficiencias alimenticias variables, Hovda *et al.* (2007), adiona que realizar procedimientos tradicionales y análisis de la región 16S ADNr, para la identificación de bacterias, en tres secciones intestinales (primera, media y posterior), en individuos del salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), se reportaron especies dominantes tales como *Lactobacillus*, *Lactococcus* sp, *Bacillus* sp, *Photobacterium phosphoreum*, *Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp y *Vibrio* sp, lo cual concuerda con el estudio en la especie de *Lactobacillus* sp. Sin embargo, otros microorganismos son reportados con potencial probiótico entre ellos Zatan (2020), cita a la especie *Weisella cibaria* por sus propiedades inhibitorias frente a bacterias patógenas, y Guluarte (2020) quien manifiesta que la levadura *Kluyveromyces lactis* logró estimular el sistema inmune de la dorada (*Sparus aurata*).

El aislamiento de las bacterias *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp en el tracto intestinal de truchas arco iris, coinciden con el hallazgo obtenido por Quispe (2017), quien también en la mucosa intestinal de trucha arco iris, logró aislar a las bacterias *Lactobacillus* y *Bacillus*, entre los probióticos, estas bacterias poseen actividad inhibitoria sobre la microflora que deterioran los filetes en tilapias, tal como lo manifiesta Castillo *et al.* (2017), quienes concluyeron que las bacterias *Lactobacillus plantarum* JCM 1149 y *Lb. acidophilus* ATCC4356, con recuentos de 87×10^4 UFC/g de bacterias ácido lácticas (BAL), luego de 10 días de experimentación. Su administración en juveniles de la tilapia



del Nilo, trajo una alta sobrevivencia (89.4%) siendo superior al tratamiento control (76.61%), dichos resultados fueron obtenidos por Mello *et al.* (2013), y entre las especies de probióticos experimentados citaron a *Bacillus cereus* en recuentos de 4.0×10^8 UFC/g y *B. subtilis* con 4.0×10^8 UFC/g.

Los probióticos son bacterias benéficas capaces de inhibir la flora bacteriana patógena del tracto digestivo no solo en los peces, Eyeralde *et al.* (2018), lograron caracterizar fenotípicamente a bacterias *Lactobacillus* del tracto gastrointestinal de cerdos, que luego de realizar pruebas bioquímicas en condiciones gástricas *in vitro* como pH, sales biliares y temperaturas extremas, lograron presentar actividad inhibitoria sobre la bacteria patógena *Salmonella enteritidis*, mejorando así la producción porcina, por otro lado, Rodríguez & García (2017), aislaron 14 cepas bacterianas lácticas desde la chicha de molle entre las especies se mencionan a *Lactobacillus plantarum*, *L. maltaromicus*, y *L. maltaromicus*, las cuales sintetizaron sustancias inhibitorias de amplio espectro. Volviendo a los peces, motivo de la investigación, Yang *et al.* (2007), en diferentes órganos del pez globo (*Takifugu obscurus*) tales como los intestinos, la piel, el hígado y el ovario, lograron aislar hasta 38 especies bacterianas.

La presencia de las bacterias probióticas *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp son beneficiosas son importantes para la fisiología de la trucha arco iris, en razón de que no solo inhibe las bacterias patógenas intestinales, sino también incrementan ciertos índices biométricos en los peces, tal como lo confirma Gutiérrez (2016), al aislar bacterias *Bacillus megaterium*, *B. polymyxa* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus* con actividad probiótica comprobó que al ser administradas en la dieta de tilapias incrementaron la ganancia de peso y longitud, la conversión alimentaria y tasa de crecimiento específico.



En contraste, otros estudios, como el mencionado por Albuquerque *et al.* (2013), obtuvieron que *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *Bacillus subtilis* C-3102, al ser administradas en forma individual o combinadas a juveniles de tilapia, no resultaron eficientes en la tasa de crecimiento luego de 127 días de cultivo, la razón por la cual no se obtuvieron adecuados resultados, se debería probablemente a que faltó la inclusión de bacterias *Lactobacillus* sp, quienes acidifican el ambiente intestinal disminuyendo el pH, siendo letal para las bacterias patógenas, ya que normalmente se encuentran en el tracto intestinal de la trucha arco iris como lo son las bacterias *Pseudomonas* spp. Muchas Enterobacterias tal como lo menciona Merrifield *et al.* (2009), asimismo, en el pez gato amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) se reportó bacterias *Shewanella*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Myroides* y *Vibrio*, quienes varían en su abundancia y diversidad bacteriana en la microbiota intestinal (Wu *et al.*, 2010).

Ante la hipótesis planteada en el proyecto de investigación, y resultar que los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp no presentaron diferencia estadística significativa entre las truchas juveniles evaluadas, se acepta la hipótesis planteada que afirmaba que la carga de bacterias probióticas de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp varían en el contenido intestinal en juveniles de trucha arco iris del CIPBS – Chucuito y dos mercados de la ciudad de Puno.

4.2 EFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS AISLADAS SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* AISLADAS DE ESTANQUES DE CRianza DE TRUCHAS DEL CIPBS CHUCUITO – UNA PUNO

El efecto inhibitorio representado mediante la medición de halos de inhibición en *Escherichia coli*, originado por las bacterias probióticas, resultaron con promedios que oscilaron entre 17.67 mm en el mes de setiembre por efecto de *Bacillus* sp y 25.67

mm obtenidos en el mes de octubre por efecto de *Lactobacillus* sp (Tabla 8). Los promedios de halos de inhibición originados por *Lactobacillus* sp sobre *E. coli* oscilaron entre 23.00mm y 25.67 mm; por otro lado, los diámetros de halos producidos por *Bacillus* sp sobre *E. coli* variaron entre 17.67 mm y 20.67 mm, ambos halos originados por los probióticos se observaron entre los meses de setiembre y octubre, respectivamente. Mientras tanto que, el control positivo gentamicina (10 µg), originó halos de inhibición con 12 mm sobre *E. coli* en todos los meses y repeticiones y según el Manual de Procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, la bacteria *E. coli* aislada presentaría resistencia a la gentamicina (10 µg), pero fue sensible a los discos desensibilidad con probióticos ya que formaron halos superiores a 15 mm (Sacsquispe, 2002).

Tabla 8. Halo de inhibición (mm) de bacterias probióticas *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp, sobre *Escherichia coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto a noviembre 2019.

Probióticos y tratamiento control	Mes	Repeticiones			Prom (mm)	CV (%)
		1	2	3		
<i>Lactobacillus</i> sp	Set	17	27	25	23.00	23.01
	Oct	27	30	20	25.67	19.99
	Nov	25	26	20	23.67	13.58
<i>Bacillus</i> sp	Set	20	17	16	17.67	11.78
	Oct	20	20	22	20.67	5.59
	Nov	20	15	20	18.33	15.75
Gentamicina	Set	12	12	12	12.00	0.00
	Oct	12	12	12	12.00	0.00
	Nov	12	12	12	12.00	0.00

En el análisis estadístico descriptivo, resultó que los diámetros de halos de inhibición microbiana, presentaron coeficientes de variación entre 5.59% (octubre – *Bacillus* sp) y 23.01% (setiembre – *Lactobacillus* sp), lo cual indica que los datos presentaron entre una leve a una moderada dispersión de los datos con respecto a su promedio. Por otro lado, los diámetros de halos de inhibición contrastada entre los meses de evaluación, no presentaron diferencia estadística significativa ($H = 0.10$; $P = 0.9495$), siendo mayor los halos obtenidos en el mes de octubre (19.00 mm), setiembre (18.33 mm) y setiembre (17.67 mm). Sin embargo, los diámetros de halos de inhibición contrastada entre los tratamientos experimentados (*Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp y gentamicina), si presentaron diferencia estadística significativa ($H = 19.93$; $P < 0.0001$), y según la prueba de rangos, los halos de inhibición originados por *Bacillus* sp y *Lactobacillus* fueron similares y asimismo superiores a los obtenidos por la gentamicina, tal como se visualiza en la Figura 7.

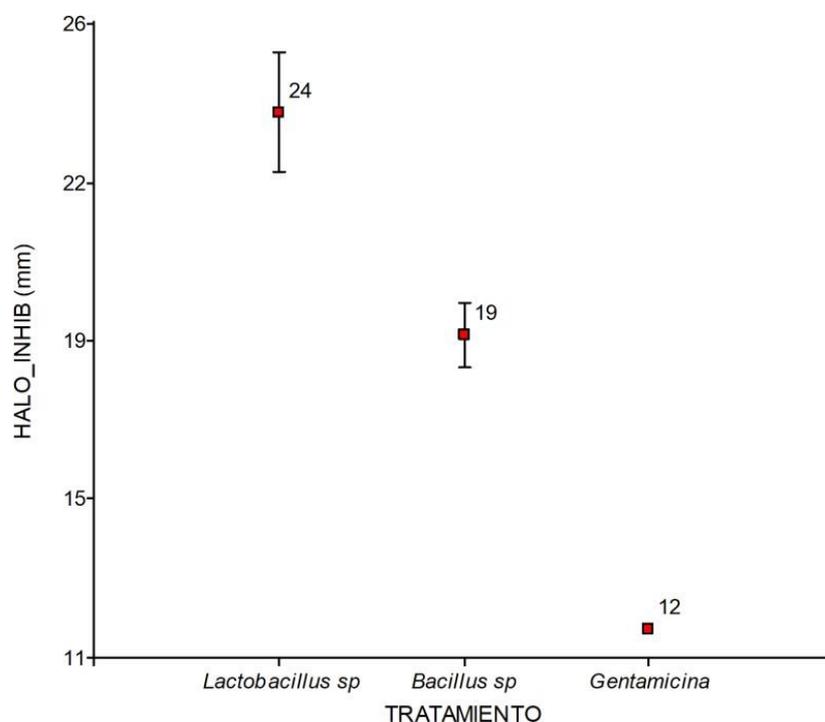


Figura 7. Comparación de diámetros de halos de inhibición bacteriana de *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp y Gentamicina (10 μ g), agosto - noviembre 2019.



Las bacterias *Lactobacillus* sp originaron promedios de halos entre 23 mm y 25.67 mm y *Bacillus* sp originaron entre 17.67 mm y 20.67 mm sobre *E. coli*, estos resultados de la investigación, fueron superiores a los obtenidos por Alvarado & Díaz (2009), quienes obtuvieron la inhibición de *Lactobacillus plantarum* sobre *Salmonella tiphy* y *Listeria monocytogenes*, formando halos de inhibición entre 9 mm y 11 mm; en contraste, Sánchez & Peña (2016), obtuvieron que cepas de *Lactobacillus* spp. inhibieron a bacterias *Staphylococcus* spp, formando halos de inhibición entre 54 mm y 65 mm ante *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Por otro lado, las bacterias probióticas poseen también efectos beneficiosos en la inmunidad de los peces frente a infecciones bacterianas, tal como lo afirma Quispe (2017), quien aisló bacterias probióticas *Lactobacillus* y *Bacillus*, desde la mucosa intestinal de trucha arco iris, e inhibieron a *Yersinia ruckeri*, formando halos de inhibición con diámetros superiores a 9 mm. Por otro lado, la presencia de bacterias probióticas incrementa sus defensas fisiológicas frente a los patógenos en los peces, es el caso que reporta Pérez (2011), quien, en truchas, logró incrementar sus defensas frente a enfermedades tales como la lactococosis, debiendo tal efecto a la liberación de citoquinas la cual inhibió al patógeno *Lactococcus garvieae*.

Las bacterias probióticas poseen el efecto inhibitorio sobre otras, tal como lo reporta Barahona & Zuleta (2014), la inhibición de *Lb. acidophilus* sobre las bacterias patógenas *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Vibrio cholerae*, confirmando el efecto inhibitorio, Gómez (2013), aisló bacterias lácticas de origen marino, como *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus pentosaceus*, las cepas *Lb. sakei* B11, *Lb. sakei* SMA17, *Lb. sakei* SMM73 y *Lb. curvatus* BCS35, el cual presentaron actividad antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes*, e indica que se debería a que las bacterias lácticas serían bacteriocinogénicas, Abasolo (2015), aisló *Lb. graminis*, *Lb. plantarum*,



Bacillus cereus, *B. flexus* y *B. firmus*, presentando mejor actividad antibacteriana la especie *Lb. graminis* sobre *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, y las demás bacterias especialmente las especies de *Bacillus*, produjeron enzimas como amilasa, proteasa, lipasa y celulasa.

Las bacterias probióticas poseen la capacidad de competir frente a las bacterias patógenas, tal como lo afirma Sica (2013), quien luego de aislar bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Weissella*, inhibieron a bacterias patógenas de salmónidos como *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* y *Aeromonas salmonicida*, mediante la capacidad de competir con los patógenos, asimismo las bacterias probióticas poseen resistencia al pH gástrico y a la bilis de las truchas, originando así la capacidad probiótica, lo cual fue confirmado por Ardila (2017) y Zapata *et al.* (2009), quienes identificaron bacterias del intestino de tilapia roja *Oreochromis sp* entre ellas *Bacillus subtilis* y BAL, que resistieron un pH ácido y alcalino (2.0 y 8.0), sales biliares (0.3 %), y un medio hipertónico (NaCl 3%), al originar esos ambientes originó inhibición bacteriana de *E. coli* y *Streptococcus agalactiae*. La competición con las bacterias patógenas con los probióticos, se debe a que compiten por establecerse en la adhesión al epitelio intestinal (Snydman, 2008), como se obtuvo en la mucosa intestinal de turbot (*Scophthalmus maximus*), donde las bacterias probióticas disminuyen el crecimiento de *Vibrio anguillarum* (Irianto & Austin, 2002).

Según los resultados de la investigación, la bacteria *E. coli* aislada resultó resistente a la gentamicina (10 µg), al presentar halos de 10 mm de diámetro, a pesar de ser resistente a la gentamicina, tanto *Lactobacillus sp* y *Bacillus sp*, lograron inhibirla produciendo halos muy superiores al control positivo (gentamicina), pero muchas veces *E. coli* no fue inhibida, tal como lo reporta Gutiérrez (2019) quien determinó la carencia de efecto inhibitorio de *Lactobacillus sp* frente a *Escherichia coli* enteropatógena y



Shiguella flexneri WHO SH-15.3. Por su parte, Jurado & Jarrín (2015) lograron mediante el método de sensidiscos impregnados con *Lb. lactis* (método utilizado en la investigación), la inhibición de *S. aureus*, *C. perfringens* y *E. coli*, excepto a *S. tiphymurium*, esto se debería probablemente a que la especie de probiótico (*Lb. lactis*) no origina mecanismos de competencia con los patógenos, no produciría compuestos antibacterianos como reuterina (García *et al.*, 1995), ya que desactiva la biosíntesis de DNA al inactivar la enzima ribonucleótido reductasa, ni produciría metabolitos de oxígeno (Requena & Peláez, 1995) con características antibióticas, o bacteriocinas (Feria, 2007), o a los mecanismos de resistencia que poseería la bacteria *E. coli*, tal como menciona Reyes (2010), quien determinó que *Lb. plantarum* inhibió a *Carnobacterium piscicola* pero fue resistente a los antibióticos amoxicilina y eritromicina.

La colonización del intestino de los peces en un mecanismo por la cual los probióticos logran desplazar e inhibir la permanencia de las bacterias patógenas, ello se debería a que poseen factores relacionados a los probióticos como lo son la biosíntesis de proteasas, lisozimas y bacteriocinas, la liberación de peróxidos de hidrógeno, formación de amoníaco, alteran el pH mediante la producción de diacetilos y ácidos orgánicos, por otro lado, el hospedero puede disminuir la carga bacteriana patógena debido a que concentra enzimas, su temperatura corporal, el individuo posee resistencia genética y los niveles de potencial oxidación – reducción (Gullian *et al.* (2004), por lo que son recomendados su utilización en la acuicultura, al optimizar la nutrición, excluye de forma competitiva a las bacterias patógenas, produce enzimas esenciales, estimulan la respuesta inmune del hospedador (Nayac, 2010) y ayuda en la digestión por el suministro de nutrientes (Irianto & Austin 2002; Gómez & Balcázar, 2008).

Asimismo, elaboran lisozimas, proteasas, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, sideróforos y la elaboración de ácidos orgánicos (ácido láctico, fórmico y acético) por



cambio del pH (Bidhan *et al.*, 2013; Gatesoupe, 2008; Larsen *et al.*, 2014), a ellos se agregaría el beneficio de las bacterias *Bacillus* sp en mejorar la calidad del agua donde habitan los peces, en razón que transforma la materia orgánica en productos como oligosacáridos, dextrinas y aminoácidos, tal como resultó en la producción de camarones jóvenes, donde la presencia de *Bacillus* sp mejoró la sobrevivencia, las tasas de crecimiento y los parámetros de calidad de agua donde habitaba la especie (Sugita *et al.*, 1997).

Las BAL poseen efectos antibacterianos e iniciarían con las cadenas de péptidos como valina – tirosina – valina, glicina – tirosina y metionina – leucina, quienes forman parte de secuencias de aminoácidos que conforman las bacteriocinas (Jurado & Jarrín, 2015). Se realizaron estudios de interacción electrostática de los péptidos mencionados con las dianas biológicas (lípidos aniónicos), los cuales permiten que las BAL puedan originar poros e ingresar a las células patógenas de tal manera se disminuye el pH intracelular ocasionando la fuga de fosfatos inorgánicos, el desequilibrio iónico y la pérdida de moléculas principales como el ADN y ARN.

La interacción hidrofílica entre las BAL y la membrana plasmática de enterobacterias no requiere de receptores, por lo tanto, estas podrían adoptar mecanismos para eludir esta acción, razón por la cual no se observa efecto alguno de las BAL en *Escherichia coli* enteropatógena y *Shigella flexneri* cuyo fenotipo es resistente a cefalosporinas de tercera generación y penicilinas (Gutiérrez, 2019). Chen *et al.* (2019) mencionaron que cinco cepas de un total de 35 aislados presentaron actividad inhibitoria en *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos presentando zonas de inhibición superiores a 20 mm.

La carencia de efecto inhibitorio de *Lactobacillus* sp sobre *E. coli*, se debería probablemente a que las cantidades de peróxido de hidrogeno sintetizado para inhibir su



crecimiento fueron insuficientes; asimismo una dosis baja de *Lactobacillus* sp empleadas en estudios de inhibición sería otra causa de falta de inhibición sobre *E. coli*, debido a que esta bacteria libera mayor cantidad de exopolisacaridos y forma el biofilm (Vuotto *et al.*, 2014).

Ante la hipótesis planteada en el proyecto de investigación, y resultar que las bacterias *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp presentaron diferencia estadística significativa frente al antibiótico gentamicina en la inhibición de *E. coli*, es que se acepta la hipótesis planteada que afirmaba que las bacterias probióticas aisladas poseen efecto inhibitorio sobre cepas de *Escherichia coli* aisladas de estanques fijos de crianza de trucha del CIPBS – Chucuito de la UNA – Puno.



V. CONCLUSIONES

- El contenido intestinal de juveniles de trucha arco iris presentaron una carga bacteriana de *Lactobacillus* sp entre 37.00×10^6 y 41.33×10^6 UFC/ml en individuos del CIPBS Chucuito, de 44.33×10^6 a 54.67×10^6 UFC/ml en el mercado Unión – Dignidad y de 29.00×10^6 a 49.00×10^6 UFC/ml en el mercado Central, *Bacillus* sp presentó recuentos entre 215.33×10^6 y 232.00×10^6 UFC/ml en el CIPBS Chucuito, de 201.00×10^6 a 221.00×10^6 UFC/ml en el mercado Unión – Dignidad y de 175.33×10^6 a 187.00×10^6 UFC/ml en el mercado Central, donde los recuentos bacterianos presentaron diferencia estadística significativa entre los puntos de muestreo ($P < 0.05$) y los mayores promedios del recuento de *Lactobacillus* sp fueron en muestras procedentes del mercado Unión – Dignidad y de *Bacillus* sp en muestras del CIPBS – Chucuito.
- Las bacterias probióticas *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp presentaron efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* aislada del agua de estanques de crianza de truchas arco iris del CIPBS – Chucuito, logrando halos superiores a los 15 mm de diámetro, confirmando que *E. coli* fue sensible ante los discos de sensibilidad de las dos bacterias probióticas, superando su efectividad al tratamiento control (Gentamicina) con halos de inhibición de 12 mm, constituyéndose una alternativa para disminuir lapoblación de microorganismos patógenos en los tractos intestinales de las truchas juveniles.



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación bioquímica de las especies de bacterias probióticas tanto *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp aisladas del tracto intestinal de individuos de truchas en diferentes estadios.
- Realizar la evaluación fisicoquímica y microbiológica del contenido intestinal de truchas arco iris tales como el pH, la temperatura, la carga de bacterias aerobias mesófilas, el recuento de coliformes totales y termotolerantes, ya que ayudarían a una mejor interpretación del efecto de las bacterias probióticas.
- Correlacionar la cuantificación de la carga bacteriana intestinal probiótica de *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, entre otras en truchas juveniles con respecto a sus parámetros biométricos en un determinado tiempo de experimentación.



VII. REFERENCIAS

- Abasolo, F. (2015). Evaluación del carácter probiótico de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas aisladas de intestinos de tilapia (*Oreochromis*) en estado de preceba. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Programa de estudios de Postgrado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 180 p.
- Albrecht, M., Ferreira M. & Caramashi E. (2000). Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *J. of Fish Biol.* Vol. 56: 419-430.
- Albuquerque, D., Marengoni G., Boscolo W., Ribeiro R., Mahl I. & Moura C. (2013). Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. *Cienc Rural*, Vol. 43 (8): 1503-1508.
- Alvarado, C. & Díaz C. (2009). Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado depastizal de finca lechera. *Revista Salud Publica y Nutrición*. Vol. 10 (1).
- ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. (2013). Análisis microbiológico de los alimentos, Metodología Analítica Oficial, Microorganismos Patógenos. Volumen 2. Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Argentina. Disponible en:
http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_II.pdf
- Aquiahuatl, M., Volke T., Prado L., Shirai K., Ramírez F. & Salazar M. (2012). Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México D.F. p. 78.
- Ardila, M. (2017). Evaluación del carácter probiótico de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas aisladas de intestinos de tilapia (*Oreochromis*) en estado de preceba. Tesis para optar el título de Zootecnista. Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas-Antioquia. 39 p.
- Arregui, L. (2013). El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). DiScript Preimpresión S. L. Madrid – España. 123 p.
- Atencio S. (1998). Manual de importación y reincubación de ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*). Gobierno Regional Puno y La Universidad Nacional del Altiplano.



- Balcázar, J., De Blas I., Ruiz I., Cunningham D., Vendrell D. & Muzquiz L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* Vol. 114: 173-186.
- Barahona, E. & Zuleta R. (2014). Efecto antagónico de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* sobre microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Vibrio cholerae*. Tesis de Maestro. Maestría en Microbiología en Inocuidad de Alimentos, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. San Salvador. 142 p.
- Benvenuto, V. (2017). Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Ricardo Palma. Lima – Perú. 78 p.
- Bidhan, C., Meena, D. K., Behera, B. K., Pronob, D., Das Mohapatra, P. K., & Sharma, A. P. (2013). Probiotics in fish and shellfish culture: immunomodulatory and ecophysiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry*. p. 1-51
- Boeuf, G & Medina, A. (1988). Evolución de la piscicultura en Chile. *La Pisciculture Française*. Vol. 93: 3-23.
- Bretón, B. (2007). El cultivo de la trucha. Editorial Omega. 420 p.
- Brett, R. (1971). Station time, appetite, and maximum food intake of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *J. Fish Bd. Can.* Vol. 28: 409-415.
- Caballero, A. (2005). Guías metodológicas para los planes y tesis de maestría y doctorado. Editorial Ugraph SAC. Lima – Perú. 672 p.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. & Velásquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2da Edición. Facultad de Química. UNAM. México.
- Camacho, B., Moreno, R., Rodríguez, G., Romo, L., & Vásquez, M. (2000). Guía para el cultivo de trucha. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México D.F. 135 p.
- Cáritas del Perú (2015). ¿Cómo alimentar mis truchas?. Primera edición. Editorial JPG Corporación S. A. C. Lima – Perú. 34 p.
<http://draapurimac.gob.pe/sites/default/files/revistas/MANUAL%20TRUCHAS%20f.pdf>.
- Carrera, M. (2009). Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. ESPOCH. Riobamba – Ecuador. p. 87.



- Casal, J. & Mateu E. (2003). Tipos de muestreo. Rev. Epidem. Med. Prev. Vol. 1: 3 – 7.
- Castillo, A., Montalvo, C., Ramírez, C. & Bolívar, G. (2017). Control del deterioromicrobiológico de filetes de tilapia mediante la aplicación de bacterias lácticas. Rev. Orinoquia – Universidad de Los Llanos – Villavicencio, Meta. Colombia. Vol. 21 (2): 30 – 37. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v21n2/0121-3709-rori-21-02-00030.pdf>
- Chen, C., Lai C., Huang H., Huang W., Toh H., Weng T., *et al.* (2019) Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Front Microbiol. PubMed. 10:789. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31057508>.
- Conway, L., Gorbach L. & Goldin, R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. Journal of Dairy Science. Vol. 70: 1-12
- Cordero, H., Ángeles M., Cuesta E. & Cuesta A. (2014). Use of Probiotic Bacteria against Bacterial and Viral Infections in Shellfish and Fish Aquaculture. INTECH. Sustainable Aquaculture Techniques. 239-265.
- Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. Trabajo científico. Rev. Mex. Cienc. Farm. Vol. 43 (3): 81 – 86.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carreara de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá – Colombia. p. 28.
- Dejoux, C. & Iltis A. (1991). El lago Titicaca síntesis del conocimiento limnológico actual. La Paz-Bolivia. Ediciones HISBOL. 108-111 p.
- Del Campo, C., Gómez H. & Alaníz R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. Revista e – Gnosis, Universidad de Guadalajara. México. Vol. 6: 1 – 17.
- Dimes, L., García C. & Haard N. (1994). Estimation of protein digestibility studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. Comp Biochem. and Physiol. Vol. 109A (2): 349 – 360.
- Dotta, M., Pedreira L., Jatobá A., Burgos E., Pilati C. & Laterca M. (2011). Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. Maringá. Vol. 33 (3): 239 – 246.
- Duwat, P., Casselin B., Sourice S. & Gruss A. (2000). *Lactococcus lactis*, a bacterial model



- for stress responses and survival. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 55: 85 – 86.
- Estrada, A., Gutiérrez L. & Montoya O. (2005). Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol. 58 (1): 2601 – 2609.
- Ewaschuk, J., & Dieleman L. (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. Vol. 7 (12): 5941-5950.
- Eyeralde, L., Alonso M. & García C. (2018). Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de intestino de cerdos con potencial probiótico. Tesis de Licenciada en Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Buenos Aires – Argentina. 30 p.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma - Italia. 52 p.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2019). Programa de información de especies acuáticas *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). 12 p.
- feeding habits of the king angelfish and the cortes angelfish. *J. of Fish Biol*. Vol. 48: 807 – 817.
- Feria, F. (2007). Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, 84 p.
- FONDEPES, (2014). Fondo nacional de desarrollo pesquero. Manual de crianza de trucha en ambientes convencionales. Lima-Perú. Impreso por EINS PERU S.A.C. 58 p.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 6: 365-378.
- Galindo, S. (2003). Manual de crianza, alimentación y nutrición de truchas en jaulas flotantes. Care – Perú. Arequipa.
- García J., Núñez F., Chacón O., Alfaro R. & Espinosa M. (2003). Estudio microbiológico de tejido superficial de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y del agua circundante. *Rev. Hidrobiológica*. Vol. 13 (2): 111 – 118.
- García, M. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamas de espectro extendido. *Sanid. Mil*. Vol. 69 (4): 1887-8571.



- García, T., Martín R., Sanz B. & Hernández E. (1995). Extensión de la vida útil de la carne fresca. I envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácidolácticas y bacteriocinas. *Rev. Española Cienc. Tecnol.* Vol. 35 (1): 1-18.
- Gatesoupe, F. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* Vol. 14 (1-3): 107-114.
- Gómez, B. (2013). Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino, caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. España. 561 p.
- Gómez, G., & Balcázar J. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* Vol.52. 145–154.
- Gullian, M., & Rodríguez J. (2002). Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. In *Contribuciones del CENAIM durante el VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura.* Vol. 8 (1): 47-49.
- Gullian, M., Thompson F. & Rodríguez J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect on *Pennaeus vannamei*. *Aquaculture.* Vol.233: 1-14.
- Guluarte, C. (2020). Caracterización y evaluación de las propiedades inmunoestimulantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* M3 y sus β -D-glucanos en peces. Tesis de Doctora en Ciencias, uso, manejo y preservación de los recursos naturales (Orientación Biotecnología). Programa de Estudios de Posgrado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S. C. Baja California Sur. México. 143 p.
http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3033/guluarte_c%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gutiérrez, I. (2019). Efecto antagónico in vitro de *Lactobacillus* spp aislado de tocosh – *Solanum* sp proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas. Tesis de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Norbert Wiener. Lima – Perú. 106 p.
http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/3656/T061_43769



[494_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y.](#)

- Gutiérrez, L. (2016). Caracterización de cepas de *Bacillus* sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (*Oreochromis* sp) como potencial consorcio para procesos de micro encapsulación. Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín – Colombia. 105 p.
- Hernández, R., Fernández C. & Baptista M. (2014). Metodología de la Investigación. Sexta edición. Editorial McGraw Hill Education. México. 600 p.
- Hold, J., & Hendricks D. (1994). Manual of Determinative Bacteriology. (Lippincott & Wilkins, Edits.) Edición Ilustrada. 789 p.
- Hossain, A. & Dutta H. (1988). Embriology of intestinal caeca in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. Can. J. Zool. Vol. 66: 998-1003.
- Hovda, B., Lunestad B., Tore B., Fontanillas R. & Rosnes J. (2007). Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. Vol. 272 (1-4): 581-588.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. Vol. 49 (1): 139-150.
- Ibáñez, V. (2009). Diseños Estadísticos. Facultad de Ingeniería Estadística e Informática, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 274 p.
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. Vol. 25 (6): 333–342.
- Jangho, H., Annsung H., Deokkim M. & Whakim Ch. (2008). Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*, Process Biochem. Vol. 43: 225-228.
- Jurado, H. & Jarrín V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. Revista Biosalud. Vol. 14 (2): 49 – 62.
- Larsen, M., Mohammed, H., & Arias, R. (2014). Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. Journal of Applied Microbiology. Vol. 116 (6): 1396–1404.
- Lewus, C. & Montville T. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J Microbiol Meth. Vol. 13 (2): 145-150.
- Lindgren, E. & Dobrogoz J. (1990). Antagonic activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. FEMS. Microbial. Rev. Vol. 87: 149-164.



- Macneil, C., Elwood W. & Dick T. (2000). Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv. Hydrobiol.* Vol. 149: 87-107.
- Maiz, A., Valero L. & Briceño D. (2010). Elementos prácticos para la cría de truchas en Venezuela. *Rev. Mundo Pecuario.* Vol. VI (2): 157-168. https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/137-truchas.pdf.
- Mateos, A. (2002). Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En *Alimentos Funcionales. Probióticos.* [R.M. Ortega, A. Marcos, J. Aranceta, J.A. Mateos, A.M. Requejo, L. Serra.] Ed. Médica Panamericana. Cap. 6.
- Mello, D., Moraes E., Niza G., Moraes R., Ozorio A., Shimada T., Engracia R. & Claudiano G. (2013). Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq Vet Bras.* Vol. 33 (6): 724-730.
- Merrifield, D., Burnard D., Bradley G., Davies S. & Baker R. (2009). Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture. Research.* Vol. 40: 1064-1072.
- Mohapatra, S., Chakraborty T., Kumar V., Deboeck G. & Mohanta N. (2013). Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* Vol. 97 (3): 405-430.
- Monroy, M., Castro T., Castro J., Castro R. & De Lara R. (2012). Beneficios del uso de probióticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos acuáticos. *ContactoS.* Vol. 85: 11-18.
- Montañés, C. & Lobón J. (1986). Feeding ecology of a population of brown trout (*Salmo trutta* L.) in a aquifer-fed stream of Old Castile. Spain. *Ekol. Pol.* Vol. 34: 203-213.
- Moreira, L. (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado Universidad complutense de Madrid Facultad de veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III. 266 p.
- Nayak, K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology.* <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>
- Ng, K., Kim C., Romano N., Koh B. & Yang Y. (2014). Effects of Dietary Probiotics on the Growth and Feeding Efficiency of Red Hybrid Tilapia, *Oreochromis* sp., and Subsequent Resistance to *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Applied*



- Aquaculture. Vol. 26 (1): 22–31.
- Núñez, P. & Somoza G. (2010). Guía de Buenas Prácticas de Producción Acuícola para Truchas Arco – Iris. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Ed. Herrero. p. 60-62.
- Orna, E. (2010). Manual de alimento balanceado para truchas. Produce & AECID – Embajada de España en Perú. 30 p.
- Pérez, T. (2011). Selección y evaluación de cepas probióticas para la prevención de la Lactococosis en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral. Patología Animal. Universidad de Zaragoza. 133 p.
- Perez, H. & Abitia L. (1996). Description of the digestive tract and Producción de bacteriocinas. Rev. Española Cienc Tecnol. Vol. 35 (1): 19-44.
- Puello, L., Montoya O., Castañeda V. & Moreno L. (2018). Caracterización de la microbiota presente en el intestino de *Piaractus brachyomus* (cachamablanca). Revista de Salud Animal Vol. 40(2):1-12. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v40n2/2224-4700-rsa-40-02-e02.pdf>
- Quispe, W. (2017). Aislamiento de *Lactobacillus* sp de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 55 p.
- Ragash. (2009). Manual de crianza de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Ragash – Perú. p. 25. http://mia.produce.gob.pe/images/cosecha_por_region_2006_2017.pdf
- Ramírez, F. (2010). Aislamiento de bacterias *Lactobacillus* sp y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonista *in vitro*. Bogotá - Colombia.
- Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura en Químico en Alimentos. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México. 86 p.
- Ramos, M., Weber, B., Gonçalves, F., Santos, G., Rema, P., & Ozório, R. (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology. Vol. 166 (2): 302–307.
- Requena, T., & Peláez C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de



- Alimentos. Vol. 35 (1): 19-44.
- Reyes, L. (2010). Análisis del efecto antagónico de los probióticos comerciales *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y de los antibióticos oxitetraciclina, amoxicilina y eritromicina para el control de la bacteria patógena *Carnobacterium piscícola* aislada del intestino de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para obtener el grado académico o título de Ingeniera en Biotecnología. Facultad de Ciencias Aplicadas Ingeniera en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí – Ecuador. 14 p.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & Dastek, B. (2011). Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología. En *Diagnóstico y caracterización de Escherichia coli diarreigénico*. Vol. 1: 1-429.
- Rodríguez, J. & García P. (2017). Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. Rev. Soc. Quím. Perú. Vol. 83 (4): 391 – 402.
- Rojas, A. (2011). Manual de Microbiología: Conceptos y Práctica de Microbiología General. Taller de Publicaciones. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. Colombia. 161 p.
- Rust, B., John H. & Ronald W. (2003). Nutritional Physiology, in Fish Nutrition (Third Edition). Academic Press: San Diego. p. 367-452.
- Sablon, B., Contreras E. & Vandame E. (2000). Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: mode of action, Genetic and Biosynthesis. In advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Th. Scheper Springer-Verlag.
- Sacsquispe, R. & Velásquez, J. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima – Perú. 68 p.
- Salamanca, D. (2020). Inducción a la maduración sexual y desove de *Oncorhynchus mykiss* “trucha arco iris” por fotoperiodo en el CIPBS – Chucuito, UNA Puno. Tesis de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 62 p.
- Sánchez, L. & Peña J. (2016). Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. Dirección de Salud Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Vol. 38 (2).
- Sánchez, L., Omura M., Lucas A., Pérez T., Llanes M. & Ferreira C. (2015). Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Rev. Salud Anim. Vol. 37. (2): 94 – 104.



- Sanz, S. (2011). Prácticas de Microbiología. Universidad de Rioja. España. Disponible en: <file:///C:/Users/hp/Downloads/Dialnet-PracticasDeMicrobiologia-100835.pdf>
- Sica, M. (2013). Bacterias lácticas del Estuario de Bahía Blanca. Evaluación de sus propiedades probióticas para su potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para optar el grado de Doctor en Bioquímica. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 219 p.
- Sihag, R., & Sharma P. (2012). Probiotics: The New Ecofriendly Alternative of Disease Control for Sustainable Aquaculture. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. Vol. 7 (2): 72-10.
- Sihuacollo, J. (2016). Diseño de un sistema de detección y conteo mediante el procesamiento digital de imágenes para ovas de trucha en el centro de investigación y producción (CIP) Chucuito UNA – Puno. Tesis de Ingeniero Electrónico. Facultad de Ingeniería Mecánica Eléctrica, Electrónica y Sistemas, Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 142 p.
- Smith & Starley. (2006). Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos a través del comité de nombres científicos de peces. American Fisheries Society.
- Snydman, R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46 Suppl 2, S104–S111.
- Strom, M., & Wiklund T. (2011). Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *Journal of Fish Diseases*. Vol. 34: 255–264.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., & Deguchi, Y. (1998). Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. Vol. 165 (3-4): 269–280.
- Sugita, H., Kawasaki J. & Deguchi Y. (1997). Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 24 (2): 105-108.
- Tannock, G. (1995). Normal Microflora. London: Chapman and Hall.
- Tovar, D., Reyes M., Guzman L., Gleaves V., Civera R., Ascencio F., Gracia V., Barboza V., *et al.* (2008). Probióticos en acuicultura: Avances recientes del uso de levaduras en peces marinos. 237 – 257 p.
- Urrego, C. & Cadavid A. (2005). Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte



- de carne de res (Huevo de Solomo). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín - Colombia, p. 72.
- Vela, Y., Contreras M. & Suarez L. (2017). Efecto de microorganismos probióticos aislados de *Hypostomus plecostomus* en juveniles de *Oreochromis* sp. Rev. MVZ Córdoba. Vol. 22 (1): 5694-5705. [DOI: dx.doi.org/10.21897/rmvz.929](https://doi.org/10.21897/rmvz.929).
- Velásquez, F. (2012). Uso de probióticos en la producción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en etapa de alevinaje, bajo un sistema de recirculación cerrado. Informe técnico del proyecto de investigación. Departamento de ciencias de la vida. Escuela politécnica del ejército. Sangolquí – Ecuador. 153 p.
- Verschuere, L., G. Rombaur, P. Soogerloos & W. Verstrate. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 4 (64): 655 – 671
- Vuotto, C., Longo F. & Donelli G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science*. 6:189–194. <https://www.nature.com/articles/ijos201452.pdf>.
- Westerdahl, A., Olsson J., Kjelleberg S. & Conway P. (1991). Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57: 2223-2228.
- WGO, Organización Mundial de Gastroenterología. (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. 29 p.
- Wu, S., Gao T., Zheng Y., Wang W., Cheng Y. & Wang G. (2010). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*. Vol. 303 (1-4): 1-7.
- Yang, G., Bao B., Peatman E., Li H., Huang L. & Ren D. (2007). Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus* *Aquaculture*. Vol. 262: 183–191.
- Zapata, S. (2012). Manual de laboratorio, microbiología de alimentos. Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. p. 87.
- Zapata, S., Muñoz J., Ruiz O., Montoya O., & Gutiérrez P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín – Colombia. Vol. 16 (1).



Zatan, A., Castillo D., Castañeda A., Feria M., Toledo O., Aguilar J., Cueva M. & Motte E. (2020). Caracterización de la microbiota intestinal en robalo (*Centropomus* sp) y aislamiento de bacterias probióticas potenciales. Rev. Int. Vet. Perú. Vol. 31 (3):1-9. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16036>

ANEXOS



Figura 8. Colecta se muestras de agua de tres estanques de cultivo (foto superior: estanque mayor de forma irregular; foto intermedia: estanque mediano cuadrangular; yfoto inferior: estanques longitudinales) de trucha arco iris y rotulado de muestras en el CIPBS Chucuito de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Figura 9. Colecta de individuos de trucha arco iris en estanque de crianza y transferencia en un cooler, CIPBS Chucuito de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

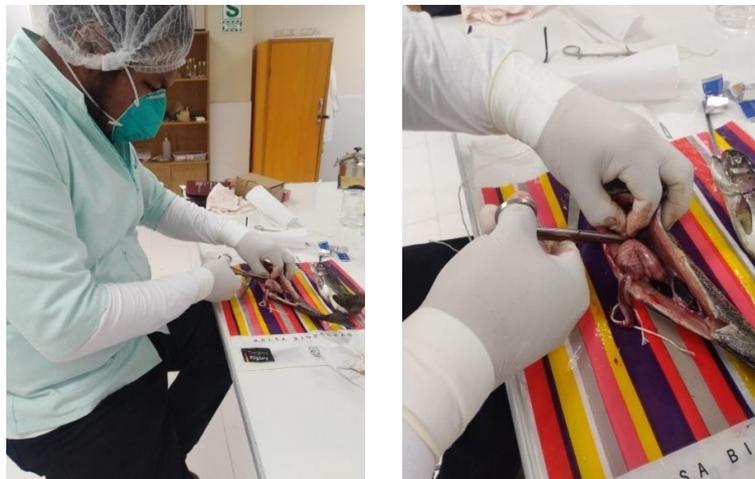


Figura 10. Disección de individuos de trucha arco iris para el aislamiento de bacterias probióticas intestinales, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Figura 11. Procedimientos de cultivos y diluciones para la cuantificación de bacterias probióticas intestinales, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

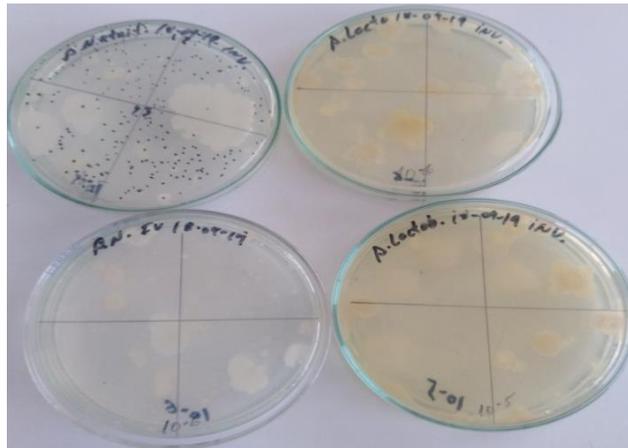


Figura 12. Colonias bacterianas de *Bacillus* sp (placas de la izquierda) y *Lactobacillus* sp (placas de la derecha), laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Figura 13. Prueba de catalasa realizada a las colonias de *Bacillus* sp (derecha) y *Lactobacillus* sp (izquierda) sobre láminas portaobjetos, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

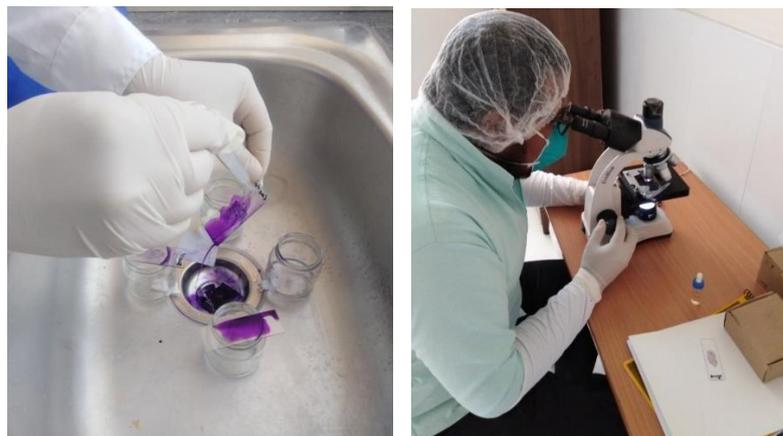


Figura 14. Tinción Gram y observación al microscopio de láminas de *Bacillus* sp y *Lactobacillus* sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

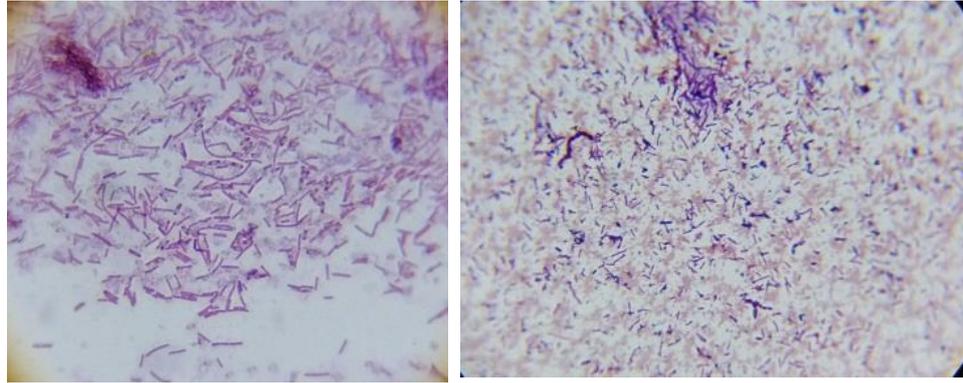


Figura 15. Observación de bacterias Gram positivas *Lactobacillus* sp (derecha) y *Bacillus* sp (izquierda), laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Figura 16. Preparación de medios, crecimiento en agar EMB y pruebas bioquímicas para identificación de *E. coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

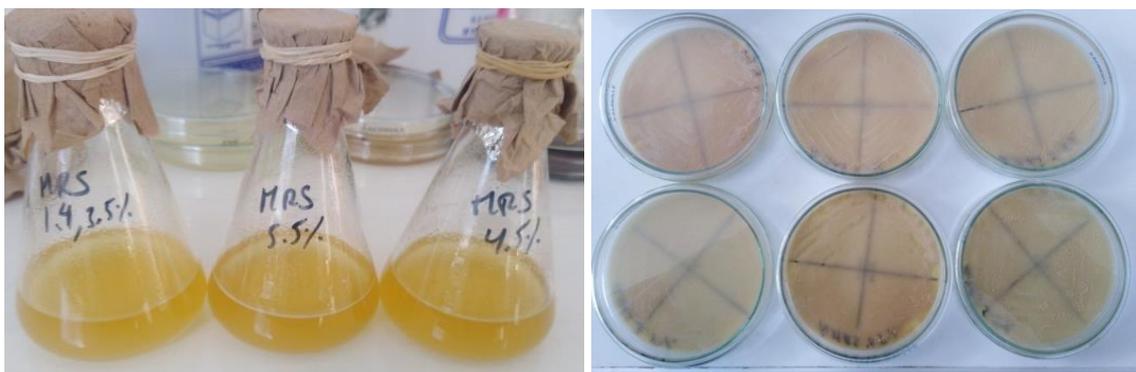


Figura 17. Preparación de agar MRS con diferentes concentraciones de NaCl para la identificación de *Lactobacillus* sp, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNAPuno, agosto – noviembre 2019.



Figura 18. Preparación de medios para las pruebas de antibiograma, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Figura 19. Prueba de hidrólisis de almidón (izquierda) y de azúcares fermentables para identificación bacteriana, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

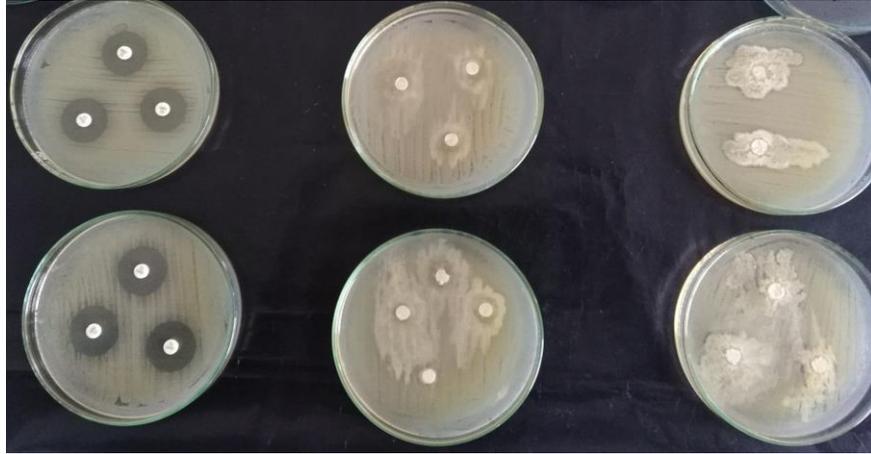


Figura 20. Resultados del antibiograma con Gentamicina (izquierda), *Bacillus* sp (centro) y *Lactobacillus* sp (derecha) frente a *E. coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología de la UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

Variable	TRUCHAS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RCTO_LACTOB T1		9	47.22	5.95	47.00	1.65	0.4375
RCTO_LACTOB T2		9	43.56	8.76	40.00		
RCTO_LACTOB T3		9	44.33	4.56	45.00		

Figura 21. Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp entre truchas colectas según fecha de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

Variable	PUNTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RCTO_LACTOB CENTRAL		9	44.89	5.04	47.00	13.70	0.0010
RCTO_LACTOB CIP CHUCUITO		9	39.33	3.08	39.00		
RCTO_LACTOB UNIÓN Y DIGNIDAD		9	50.89	5.60	52.00		

Trat.	Ranks
CIP CHUCUITO	6.89 A
CENTRAL	14.39 B
UNIÓN Y DIGNIDAD	20.72 B

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

Figura 22. Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos bacterianos de *Lactobacillus* sp según puntos de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

Variable	TRUCHAS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RCTO_BAC T1		9	201.11	16.78	201.00	2.16	0.3394
RCTO_BAC T2		9	202.22	21.75	210.00		
RCTO_BAC T3		9	212.89	21.29	220.00		

Figura 23. Prueba de Kruskal Wallis de los recuentos bacterianos de *Bacillus* sp entre truchas colectas según fecha de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

Variable	PUNTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RCTO_BAC CENTRAL		9	182.67	8.43	181.00	18.88	0.0001
RCTO_BAC CIP CHUCUITO		9	223.11	11.92	228.00		
RCTO_BAC UNIÓN Y DIGNIDAD		9	210.44	11.27	210.00		

Trat.	Ranks
CENTRAL	5.17 A
UNIÓN Y DIGNIDAD	15.67 B
CIP CHUCUITO	21.17 B

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

Figura 24. Prueba de Kruskal Wallis y prueba de rangos de los recuentos bacterianos de *Bacillus* sp según puntos de muestreo, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.

Variable	MESES	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
HALO_INHIB (mm)	Nov	9	17.67	4.85	20.00	0.10	0.9495
HALO_INHIB (mm)	Oct	9	19.00	7.09	17.00		
HALO_INHIB (mm)	Set	9	18.33	5.59	20.00		

Figura 25. Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición bacteriana, según mesede evaluación, laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto –noviembre 2019.

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
HALO_INHIB (mm)	Bacillus sp	9	18.89	2.32	20.00	19.93	<0.0001
HALO_INHIB (mm)	Gentamicina	9	12.00	0.00	12.00		
HALO_INHIB (mm)	Lactobacillus sp	9	24.11	4.20	25.00		

Trat.	Ranks
Gentamicina	5.00 A
Bacillus sp	15.50 B
Lactobacillus sp	21.50 B

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

Figura 26. Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición bacteriana de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp y gentamicina (10 µg), laboratorio de Botánica y Biotecnología, FCCBB – UNA Puno, agosto – noviembre 2019.



Universidad Nacional del Altiplano de Puno

Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



Registro: 008-2020

CONSTANCIA

LA QUE SUSCRIBE, **DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO – PERÚ.**

HACE CONSTAR:

Que el (la) Bachiller **JHON CRISTHIAN VELASQUEZ MAQUERA**, egresado (a) de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación (Tesis) titulado: **BACTERIAS PROBIÓTICAS DE JUVENILES DE TRUCHA ARCO IRIS DEL CIP CHUCUITO – UNA Y MERCADOS DE LA CIUDAD DE PUNO Y EFECTO ANTAGÓNICO SOBRE *Escherichia coli***, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de agosto a noviembre del 2019.

Se le expide la presente Constancia a solicitud del (a) interesado (a) para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 03 de noviembre del 2020.



UNA
PUNO

M. Sc. EVA LAURA CHAUCA
DECANO
FCCBB – UNA Puno

Firmado digitalmente por LAURA
CHAUCA DE MEZA EVA FAU
20145498170 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 03.11.2020 15:32:15 -0500