Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Identificación de potenciales probióticos bacterianos aislados de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo con actividad antimicrobiana frente a *Yersinia ruckeri*

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Acuícola

AUTOR

Marco César MEDINA MORILLO

ASESOR

Mg. Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Medina M. Identificación de potenciales probióticos bacterianos aislados de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) de cultivo con actividad antimicrobiana frente a Yersinia ruckeri [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código ORCID del autor	0000-0001-7335-2902
DNI o pasaporte del autor	44623351
Código ORCID del asesor	0000-0003-0112-9183
DNI o pasaporte del asesor	07011047
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola (GRINASAC)
Agencia financiadora	**PAIS**
	Perú
	NOMBRE Y SIGLAS DE LA AGENCIA FINANCIADORA
	VRI - UNMSM
	NOMBRE DEL PROGRAMA FINANCIERO:
	Proyectos con Financiamiento Para Grupos de Investigación - PCONFIGI
	N° DE CONTRATO
	A17080581
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	**LUGAR**
	Perú, Lima, Lima Perú, Lima, Callao, Callao
	COORDENADAS GEOGRAFICAS
	Latitud -12.081319686042036 Longitud -76.98786331021459 Latitud -12.066931131440128 Longitud -77.1579288608078
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2017 -2018
Disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SANIDAD ACUÍCOLA

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día viernes 20 de diciembre de 2019, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Mg. Siever Miguel Morales Cauti y constituido por los siguientes miembros: Mg. Nancy Nieves Sandoval Chaupe (**Asesora**), Mg. Sandra Gracia Bezada Quintana y Dr. Jefferson Yunis Aguinaga, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Identificación de potenciales probióticos bacterianos aislados de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo con actividad antimicrobiana frente a *Yersinia ruckeri* ", presentado por el Bachiller:

MARCO CÉSAR MEDINA MORILLO

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Acuícola y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE, (19) DIECINUEVE___**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Acuícola**, al Bachiller: **Marco César Medina Morillo.**

Siendo las 12:00 horas del día viernes 20 de diciembre de 2019, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Mg. Siever Miguel Morales Cauti (P.Asoc.T.C.)
Presidente

Mg. Sandra Gracia Bezada Quintana (P.Asoc.D.E)
Miembro

Dr. Jefferson Yunis Aguinaga
Miembro Externo

Mg. Nancy Nieves Sandoval Chaupe (P. P. D.E)
Miembro (Asesora)

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

DEDICATORIA

A mis padres, Gabriel Medina y Tereza Morillo, de quienes recibí mi primera formación. Estoy infinitamente agradecido por sus enseñanzas

A mi esposa y compañera de vida, Evelyn Dávila, gracias por animarme en todo momento y por todo tu apoyo en los días de clases y en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias Dra. Nieves Sandoval por sus enseñanzas, consejos y guía en esta etapa de aprendizaje y formación de mi vida profesional.

A la Mg. Blga. Violeta Flores, Blga. Carla Fernández y Mg. Blga. Giovanna Sotil, por su apoyo en el transcurso de la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a los productores de trucha arco iris que permitieron que este trabajo sea realizado.

Proyectos con Financiamiento para Grupos de Investigación PCONFIGI - A17080581

INNOVATE Perú – Proyecto "Desarrollo de un programa de vacunación que incluye una vacuna polivalente como método de inmunoprotección contra enfermedades producidas por Yersinia ruckeri, Aeromonas salmonicida y Flavobacterium psychrophilum en el cultivo de trucha arco iris" Convenio N° 078-INNOVATEPERU-IAPIP-2017

ÍNDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA…….iii
AGRADECIMIENTOS……. iv
RESUMEN……...vi
ABSTRACT……...vii
LISTA DE TABLAS…….viii
LISTA DE FIGURAS…….ix

I. INTRODUCCIÓN……...01
II. REVISIÓN DE LITERATURA…….....…….02
2.1 Acuicultura mundial……..... 02
2.2 Acuicultura en el Perú…….....03
2.3 La acuicultura de la trucha arco iris en el Perú…….....04
2.3.1 Características generales de la trucha arco iris…….. 04
2.3.2 Ciclo productivo……06
2.3.3 Enfermedad de la boca roja en trucha arco iris…….07
a) Agente etiológico……..07
b) Signos clínicos y proceso infeccioso…… 08
c) Tratamientos…… 09
Antibioterapia……. 09
Vacunación…….. 10
Probióticos……... 10
III. MATERIALES Y MÉTODOS…… 12
IV. RESULTADOS……... 18
V. DISCUSIÓN…….. 27
VI. CONCLUSIONES……...31
VII. RECOMENDACIONES…… 31
VII. LITERATURA CITADA……...32

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar potenciales probióticos bacterianos aislados de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo con actividad antimicrobiana frente a *Yersinia ruckeri*, agente causal de la Enfermedad de la Boca Roja (Enteric Red Mouth - ERM), patología que causa alta mortalidad en los salmónidos. Para esto, se tomó el intestino de ejemplares de trucha arco iris con el propósito de aislar bacterias adheridas a las vellosidades intestinales. Posteriormente, se purificaron los cultivos a través de siembras sucesivas hasta obtener colonias aisladas. Para la selección de aquellas que muestran actividad antimicrobiana, las bacterias fueron enfrentadas con cepas patógenas de *Y. ruckeri* aisladas de brotes de ERM en varias regiones del país y cepas estándares. Para discernir cuál bacteria cumplía con los criterios para ser considerada como potencial probiótico y pueda actuar en el huésped, los aislados seleccionados fueron evaluados en la resistencia a las sales biliares, producción de enzimas y efectos patógenos en el huésped. Las cepas *Bacillus amyloliquefasciens* 131, *Paenibacillus* sp. 134, *Paenibacillus* sp. 1c, *Paenibacillus* sp. 1d, *Paenibacillus* sp. 1k y *Paenibacillus* sp. 2cc fueron seleccionadas de 521 cepas evaluadas, las cuales exhibieron capacidad antimicrobiana frente a los aislados peruanos de *Yersinia ruckeri* y contra la cepa *Y.ruckeri* ATCC 29473, además, mostraron viabilidad ante la exposición a diferentes concentraciones de bilis de trucha, pH, capacidad de adhesión, producción de enzimas y fueron inocuos para el huésped. Estas características las califica como potenciales probióticos para su utilización en el cultivo de la trucha arco iris.

Palabras clave: *Yersinia ruckeri,* aislamiento¸ probióticos, *Paenibacillus, Bacillus.*

ABSTRACT

The aim of this work was to identify bacterial probiotics candidates isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with antimicrobial activity against *Yersinia ruckeri*, the causal agent of the enteric red mouth disease (ERMD), a pathology that is responsible for high mortality in salmonids. Rainbow trout gut samples were taken for the isolation of bacteria attached to intestinal villi. Subsequently, the cultures were purified through successive passaging until obtaining isolated colonies. In order to select those who showed antimicrobial activity, isolated bacteria were confronted both with pathogenic strains of *Y. ruckeri* isolated from different ERM outbreaks in Peruvian fish farms and with the *Y. ruckeri* type strain. To select which bacteria meet the criteria to be determined as a potential probiotic and can act into the host, the selected strains were evaluated for resistance to biliary salts, enzyme production, and pathogenic effects in the host. *Bacillus amyloliquefasciens* 131, *Paenibacillus* sp. 134, *Paenibacillus* sp. 1c, *Paenibacillus* sp. 1d, *Paenibacillus* sp. 1k, *Paenibacillus* sp. 2 cc were selected from 521 strains evaluated, which exhibited antimicrobial properties against Peruvian strains of *Y. ruckeri* and against *Y.ruckeri* ATCC 29473 type strain, in addition, selected strains were able to survive the exposure to different concentrations of trout bile, pH, and showed adhesion capacity, enzyme production and were harmless to the host. These characteristics qualify the selected strains as potential probiotics for use in the rainbow trout aquaculture.

Keywords: *Yersinia ruckeri,* isolation, probiotics, *Paenibacillus, Bacillus.*

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de *Yersinia ruckeri* utilizadas en este estudio

Cuadro 2. Número de bacterias aisladas procedentes de diferentes orígenes para su posterior evaluación.

Cuadro 3. Inhibición de cepas de *Yersinia ruckeri* por parte de las bacterias seleccionadas del intestino de trucha arco iris.

Cuadro 4. Inhibición de las cepas de *Yersinia ruckeri* por los extractos libres de células (ELC) de las bacterias seleccionadas de trucha arco iris.

Cuadro 5. Crecimiento (+) o inhibición (-) de *Yersinia ruckeri* en cocultivo, como evidencia de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas del intestino de trucha arco iris a diferentes temperaturas.

Cuadro 6. Identificación de las bacterias seleccionadas del intestino de trucha arco iris

Cuadro 7 Identificación de bacterias con potencial probiótico aisladas de intestino de trucha arco iris utilizando el kit API 50CH/B y el gen 16S rRNA

Cuadro 8. Resistencia de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente a la exposición de líquido biliar.

Cuadro 9. Resistencia de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente a la exposición de diferentes concentraciones de p H.

Cuadro 10. Hidrofobicidad de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente al xileno.

Cuadro 11. Perfil enzimático de las bacterias con potencial probiótico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de la pesca y acuicultura. Fuente: FAO 2018.

Figura 2. Trucha arco iris. Fuente: FAO 2019b.

Figura 3. Niveles de oxígeno disuelto en el agua para el cultivo de trucha arco iris. Fuente: Arregui, 2013.

Figura 4. Ciclo de vida de la trucha arco iris. Fuente: Arregui, 2013.

Figura 5. Seguimiento bioluminiscente de *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris infectados vía inmersión. La bioluminiscencia emitida por las bacterias fue capturada tres días postinfección. Fuente: Méndez y Guijarro, 2013.

Figura 6. Diversidad de cepas bacterianas aisladas del tracto gastrointestinal de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss.*

Figura 7. Enfrentamiento primario para la detección de bacterias con potencial antagonista frente a cepas de *Yersinia ruckeri.* Los halos de inhibición indican capacidad de las cepas aisladas de inhibir el crecimiento de los patógenos enfrentados (flechas).

Figura 8. Halos de inhibición producidos por las cepas 112, 35,131 y 134 como consecuencia de la inhibición contra cepas de *Yersinia ruckeri.* Se aprecian halos de inhibición turbios cuando las cepas 112 y 35 fueron enfrentadas con *Yersinia ruckeri*. En comparación con b), en a) no se evidencia inhibición por parte de las cepas 112 y 35 frente a una cepa de *Y.ruckeri.* ZI= Zona de inhibición considerada.

Figura 9. Zonas de inhibición producidas por las cepas bacterianas aisladas. C= control Caldo TSB.

Figura 10. *Yersinia ruckeri* (flechas rojas) sembrada por diseminación en placa a 12°C (control). Se observa crecimiento exclusivo de las cepa 131 y 1c (flechas negras) a 22°C como evidencia de la capacidad de estas bacterias de inhibir el crecimiento de *Yersinia ruckeri.* Además, se muestra crecimiento de *Yersinia ruckeri* y la cepa 131 a 15 y 12°C. La cepa 1c inhibió el crecimiento de *Yersinia ruckeri* a 15°C pero no a 12°C. Sin embargo, el crecimiento de la cepa 131 y 1c preincubadas por 48h y posteriormente cocultivada con *Yersinia ruckeri* por 48h adicionales a 12°C permitió la inhibición total de la cepa patógena.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura se refiere al cultivo de organismos acuáticos en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción (FAO, 2019a). En esta línea, se han desarrollado numerosos esfuerzos para elevar la producción en los cuerpos de agua alrededor del mundo, debido a la demanda de alimento y ante la estabilidad de la producción de la pesca de captura desde finales de la década de 1980 (FAO, 2018).

Sin embargo, conforme se va intensificando la acuicultura, la mortalidad en los organismos acuáticos cultivados aumenta debido principalmente a enfermedades infecciosas, las que representan un factor limitante para el éxito de la actividad (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018). Estas enfermedades son causadas por diversos agentes etiológicos como bacterias, virus y parásitos. En el Perú, la acuicultura se encuentra en constante crecimiento (PRODUCE, 2017; FAO, 2018) y ya experimenta las complicaciones de este crecimiento tales como mortalidad elevada, pérdidas económicas, desconfianza de los inversores en la actividad, entre otras consecuencias.

Entre las enfermedades que causan altas mortalidades en el cultivo de la trucha arco iris se encuentra la yersiniosis o la enfermedad de la boca roja (Enteric Red Mouth Disease - ERMD) causada por *Yersinia ruckeri*. Para controlar la enfermedad se han evaluado diferentes tratamientos con limitado éxito ya que se conoce que las variantes de la especie aparecen causando brotes incluso en peces previamente vacunados (Austin *et al.,* 2003; Fouz *et al.,* 2006; Kummar *et al.,* 2015; Marana *et al.,* 2019), para los cuales se requiere el uso de antibióticos para reducir la mortalidad (Marana *et al.,* 2019).

La utilización desmedida de antibióticos en acuicultura puede acelerar el proceso de generación de bacterias resistentes, las cuales podrían afectar directamente en los tratamientos de las enfermedades en los seres humanos (Pandiyan *et al.*, 2013; Capkin *et al.,* 2017). En ese sentido existe la necesidad de tratamientos alternativos a los antibióticos (Founou *et al.*, 2016). Las bacterias probióticas aparecen como una alternativa viable y amigable con el medio ambiente (Pandiyan *et al.*, 2013, Dawood *et al.,* 2016), además, las bacterias probióticas pueden mejorar diversos aspectos en el huésped relacionados con los procesos metabólicos, inmunológicos y nutricionales (Lazado y Caipang, 2014; Van Doan *et al*., 2019), por eso la importancia del estudio y caracterización de los principales grupos bacterianos capaces de potenciar o coadyuvar en la lucha contra las enfermedades.

En ese sentido, dado que en el Perú la mortalidad por ERM es frecuente y aún los tratamientos son escasos, el presente trabajo pretende dar a conocer los resultados del aislamiento de bacterias del intestino de ejemplares de trucha arco iris las cuales presentan características antimicrobianas frente a cepas patógenas de *Y.ruckeri*, además, evidencian la posibilidad de colonizar el intestino del huésped y producir enzimas las que finalmente las hacen potenciales probióticos para el uso en el cultivo de esta especie.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Acuicultura mundial

El constante crecimiento de la población mundial, que a mediados del 2015 era de 7,300 millones de personas y se estima que para el 2030 ascenderá hasta 8,300 millones (ONU, 2018), conlleva al aumento de la demanda de alimentos, principalmente proteínas de alta calidad provenientes de organismos acuáticos proveídos por la pesca. Esta actividad ha experimentado una estabilidad de las capturas desde finales de la década de 1980 (Figura 1), en consecuencia, la acuicultura ha permitido compensar el estancamiento de esa actividad, permitiendo que el alimento de origen acuático llegue a miles de millones de personas en el mundo, tanto así que al 2016, la producción mundial de la acuicultura, incluidas las plantas acuáticas, ascendió a 110,2 millones de TM (FAO, 2018).

La contribución de la acuicultura a la producción mundial de productos de origen acuático ha venido aumentando de forma constante, tanto así que la acuicultura es el sector que crece más rápido en el mundo, respecto a otros sectores principales de producción de alimentos. Al 2016, la producción acuícola llegó a representar el 47% de la producción de organismos de origen acuático, la pesca de captura, por otro lado, sumó el 53% de la producción mundial. China, India, Indonesia, Vietnam, Bangladesh, Egipto y Noruega, son, a la fecha, los principales productores de productos provenientes de la acuicultura (FAO, 2018).

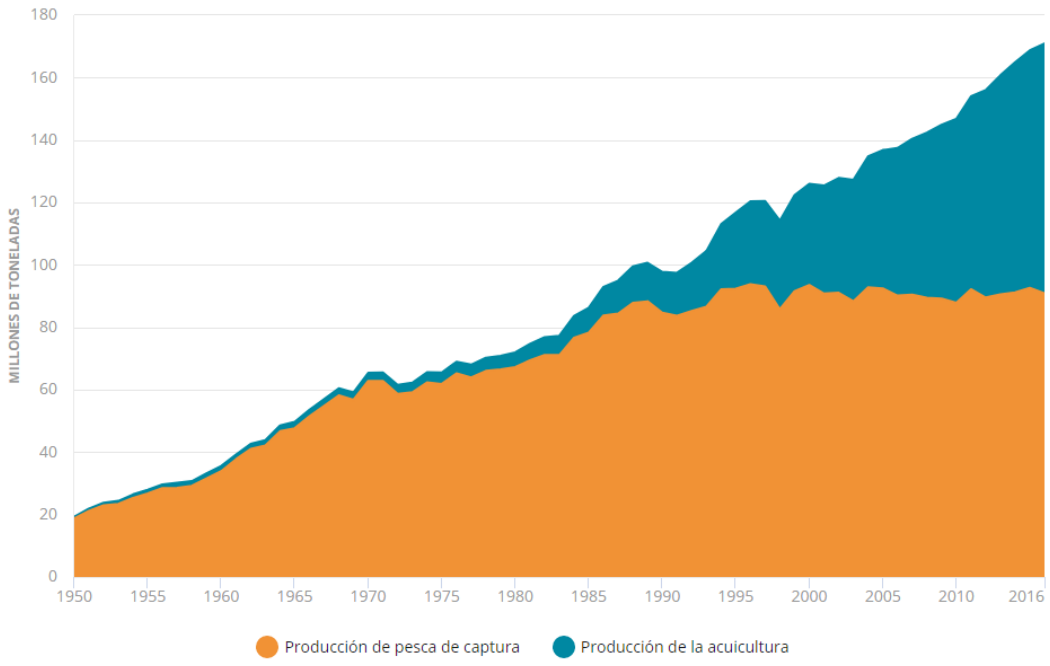


Figura 1. Producción mundial de la pesca y acuicultura. Fuente: FAO, 2018

2.2 Acuicultura en el Perú

El estancamiento de la pesca no solo ha afectado a los principales productores del mundo, el Perú no ha sido ajeno a esta dinámica, ya que, sumado a las repercusiones que ocasionan los fenómenos naturales como El Niño en las costas peruanas, el país ha dejado de capturar alrededor de 1,1 millones de toneladas (dato sumado al de Chile) de la pesquería más importante, la anchoveta (FAO, 2018). En ese sentido, el impulso que dará la actividad acuícola al sector será de vital importancia para la previsión de proteína de origen acuático.

Las cosechas de recursos hidrobiológicos originados de la acuicultura del Perú representaron 100 454,82 TM al 2017 (PRODUCE, 2017), y se estima que el país produzca 221 000 TM de al 2030 (FAO, 2018), lo que haría un incremento del 120% respecto al 2017. La concha de abanico *Argopecten purpuratus*, el langostino *Litopenaeus vannamei*, la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y la tilapia *Oreochromis* sp. son las principales especies cultivadas. Sin embargo, existen más especies que se cultivan en el país, entre algas y peces, las cuales se encuentran en etapa de desarrollo. Las principales regiones productoras del país están dispersas tanto en la costa como en la sierra. La maricultura se desarrolla tanto en Tumbes como en Ancash, en donde se cultivan crustáceos peneidos y moluscos bivalvos en estanques seminaturales y en sistemas de linternas suspendidas respectivamente. Por otro lado, la acuicultura continental en Puno, Junín y Huancavelica se centra en el cultivo de trucha arco iris en sistemas de jaulas suspendidas y tanques de concreto. Además, se encuentra en crecimiento el cultivo de tilapia en Piura y peces amazónicos en la selva del Perú.

2.3 La acuicultura de la trucha arco iris en el Perú

La trucha arco iris es nativa de los ríos y lagos de aguas frías de la costa del Pacífico de Norte América y Asia, y ha sido introducida a cerca de 82 países (Arregui, 2013; FAO, 2019a).En el Perú, esta especie fue introducida en 1934 con fines deportivos, de ahí en adelante y con el avance tecnológico, se ha venido cultivando en el país en jaulas flotantes y estanques de concreto.

La trucha arco iris ha sido una de las especies que ha impulsado el mayor crecimiento de la producción acuícola nacional, alcanzando 54 424, 5 TM en el 2017 (PRODUCE, 2017), y en el 2018 representó el 53.1% de la producción nacional (PRODUCE, 2019), convirtiéndose, por lo tanto, en el principal recurso acuícola en el país. Las principales zonas de cultivo se concentran en la sierra, siendo Puno la principal región de cultivo del país, representando el

82.4% de las cosechas de trucha arco iris (PRODUCE 2019).

2.3.1 Características generales de la trucha arco iris

La trucha arco iris está ubicada taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Animmalia
Phyllum: Chordata
Sub phylum: Vertebrata
Super Clase: Pisces
Clase: Osteichthyes
Sub clase: Actinopterygii
Orden: Salmoniformes
Sub orden: Salmonoidei
Familia: Salmonidae
Género: *Oncorhynchus*
Especie: *O. mykiss*
Nombre común: Trucha, Trucha Arco Iris.
Nombre inglés: Rainbow Trout

La trucha arco iris presenta un cuerpo comprimido lateralmente, además, presenta escamas de diferentes tonalidades a lo largo de la línea lateral, manchas de color negro sobre la cabeza, el cuerpo, aletas dorsales y cola (FAO, 2019b).

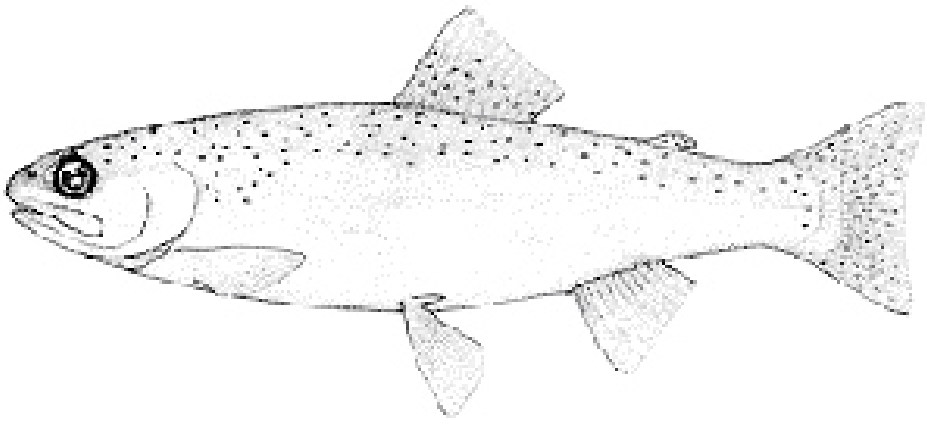


Figura 2. Trucha arco iris. Fuente: FAO, 2019b

La trucha es habitante de ambientes de aguas frías cristalinas y bien oxigenadas (Aquino, 2019), tanto así que el rango de temperatura para el cultivo de esta especie se

encuentra entre los valores de 7 – 18°C y de oxígeno entre 4 y 6 mg/l (FAO, 2019b).

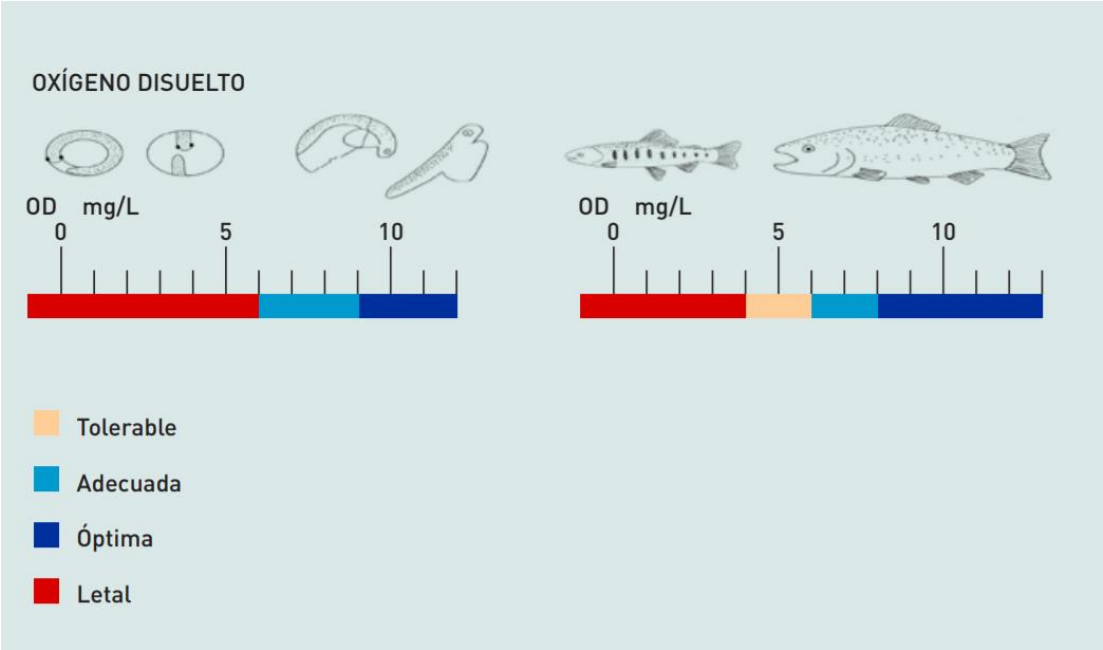


Figura 3. Niveles de oxígeno disuelto en el agua para el cultivo de trucha arco iris. Fuente: Arregui, 2013

La trucha es una especie carnívora y su alimentación depende de la edad, la talla del pez, el tamaño del alimento y el habitad. Este salmónido se alimenta en el ambiente natural de insectos, gusanos, moluscos, crustáceos, y de otros peces (FAO, 2011; Arregui, 2013; FONDEPES, 2014).

Cuando las truchas llegan a la madurez sexual, expresan características morfológicas externas que los diferencian, en el caso del macho, este se volverá más brillante y la mandíbula inferior será más pronunciada hacia arriba, por otro lado, las hembras presentarán el vientre abultado y el orificio genital aparecerá hinchado y presentará coloración rojiza (Aquino, 2009; Arregui, 2013).

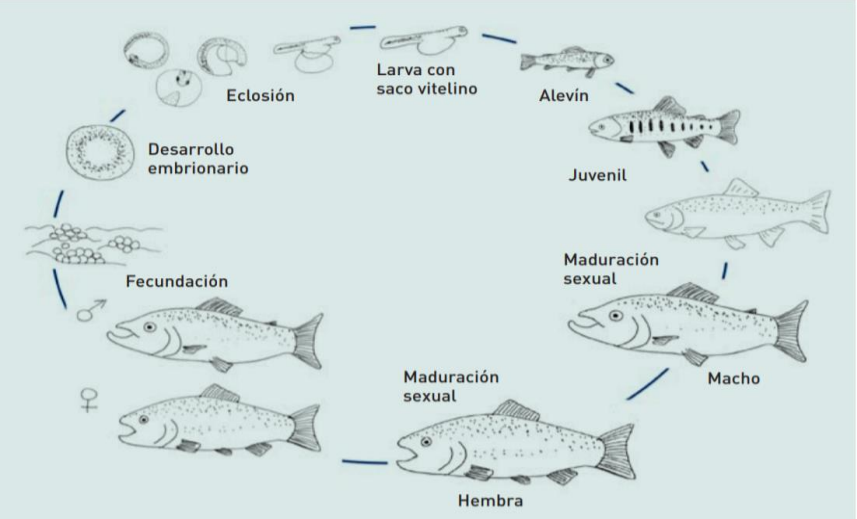


Figura 4. Ciclo de vida de la trucha arco iris. Fuente: Arregui, 2013

2.3.2 Ciclo productivo

a) Incubación de ovas y eclosión: Esta etapa inicia con la recepción de ovas importadas, en su gran mayoría de EE. UU (FONDEPES, 2014). Estas, una vez recepcionadas y listas para el cultivo, deben ser aclimatadas a la temperatura del agua de las incubadoras, la cual no debería ser superior a los 14 °C (Arregui, 2013). La aclimatación de las ovas, las cuales pueden estar entre 2 y 5°C (FONDEPES, 2014) es una etapa importante para evitar el shock térmico, se puede establecer como valor de seguridad el incremento de la temperatura de 1°C cada 20 minutos (Arregui, 2013) o 1°C cada hora (FONDEPES, 2014).

b) Eclosión: Los huevos embrionados tardan entre 3 a 15 días en eclosionar (Arregui, 2013; FONDEPES, 2014) y es cuando las larvas se alimentan de su saco vitelino.

c) Alevinaje: Los peces en esta etapa tienen las mismas características morfológicas que un adulto. La alimentación se realiza con alimento inerte con una frecuencia entre 10 a 12 veces al día (FONDEPES, 2014).

d) Engorde: En esta etapa las truchas llegan a alcanzar los 30 cm, lo que aproximadamente significan 331.5g (FONDEPES, 2014). Esta talla comercial, incluso, desde los 200g, son comercializadas en el país.

2.3.3 Enfermedad de la boca roja en trucha arco iris

a) Agente etiológico

La enfermedad entérica de la boca roja, yersiniosis o "Enteric Redmouth Disease" (ERMD), es una enfermedad infecciosa causada por *Yersinia ruckeri*, bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. La bacteria tiene forma de bacilo, de aproximadamente 0.75 µm de diámetro y 1–3 µm de longitud (Ewing, 1978), además, se han descrito cuatro serotipos: Serotipo O1, el cual está dividido en dos subtipos, O1a (serovar I) y O1b (serovar III); el serotipo O2 (serovar II) dividido en tres subtipos, O2a, O2b y O2c; el serotipo O3 (serovar V) y el serotipo O4 (serovar VI) (Romalde y Toranzo, 1993).

Y. ruckeri fermenta la glucosa, es catalase positiva, oxidase negativa, reduce el nitrato, secreta b-galactosidasa, lisina y ornitina decarboxilasa (Tobback *et al.*, 2007), las diferencias se dan en la capacidad de las cepas de producir lipasas, y en la movilidad proveída por flagelos peritricos, en ese sentido, se han descrito dos biotipos: el biotipo 1, las cuales son positivos para la secreción de lipasas y movilidad; y el biotipo 2, los cuales son negativos para ambas pruebas (Tobback *et al.*, 2007).

El serotipo O1 es el predominante (Tinsley *et al.*, 2011) y el que ha causado la mayoría de epizootias (Romalde y Toranzo, 1993). En el Perú, Bastardo *et al.* (2011) realizaron la serotipificación de 30 cepas de *Y. ruckeri*, las cuales resultaron pertenecer al serotipo O1a.

b) Signos clínicos y proceso infeccioso

Los peces afectados manifiestan cambios en la natación, letargia, pérdida del apetito. Externamente se observa exophtalmia, oscurecimiento de la piel y hemorragias alrededor de la boca. Internamente se observan hemorragias petequiales en el hígado, páncreas, ciegos pilóricos, vejiga natatoria músculo lateral, bazo alargado, intestino hemorrágico (Tobback *et al.*, 2007). La histopatología revela la invasión de la bacteria en diferentes órganos y tejidos como el riñón, el bazo, el hígado, el corazón y branquias (Tobback *et al.,* 2009).

Además, se ha descrito que *Y. ruckeri* puede acceder al interior de la

trucha arco iris por al menos tres vías diferentes: Las branquias, la línea lateral y el tracto digestivo. A partir de estos lugares la bacteria podría propagarse hacia el sistema circulatorio para de ahí infectar otros órganos, sin embargo, la presencia significativa de la bacteria en el intestino y también los signos de la enfermedad sugieren que la ruta digestiva juega un rol relevante (Guijarro *et al.* 2018). En ese sentido, *Y.ruckeri* se disemina en el agua por medio de la eliminación del patógeno en las heces de peces infectados o portadores asintomáticos (Capkin y Altinok, 2008, Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010, Tkachenko *et al.* 2016), ya que estos últimos poseen al agente en la parte posterior del intestino (Romalde y Toranzo, 1993; Ryckaert *et al.*, 2010).

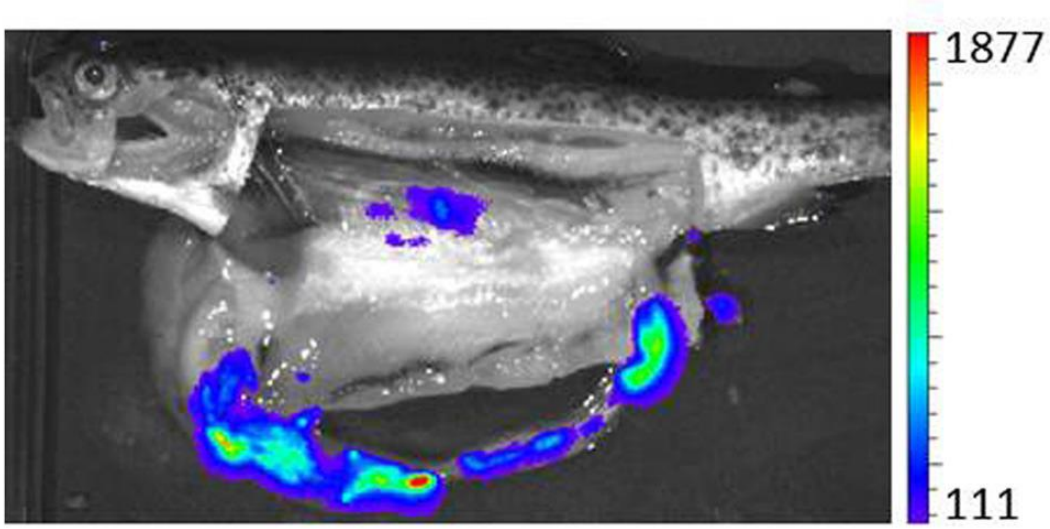


Figura 5. Seguimiento bioluminiscente de *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris infectados vía inmersión. La bioluminiscencia emitida por las bacterias fue capturada tres días postinfección. Fuente: Méndez y Guijarro, 2013

c) Tratamientos

Antibioterapia: La terapia con antibióticos es la usual para combatir esta y otras enfermedades en la acuicultura, sin embargo, el amplio uso de quimioterapéuticos de amplio espectro ha llevado a problemas de generación de cepas resistentes a los fármacos y daño al medio ambiente con consecuencias en la salud pública (Cabello *et al.,* 2013, Salah y Albutti, 2014). En el caso de *Y. ruckeri,* se ha demostrado *in vitro* que los antibióticos utilizados para el control de la enfermedad pueden perder eficacia (Rodgerds, 2001) y además se han aislado cepas resistentes a la oxitetraciclina, sulfametoxaxol trimetoprim, florfenicol, entre otros (Rodgerds, 2001; Gibello

et al., 2004; Balta *et al.,* 2010; Huang *et al.*, 2013, Duman *et al.*, 2017). Para cambiar esta situación, se ha puesto mayor énfasis en la mejora del manejo a través de la nutrición, mejora de la calidad del agua, disminución de la capacidad de carga y el uso de vacunas e inmunoestimulantes no específicos, como los β 1-3 glucanos.

Vacunación: La vacuna contra la ERM ha significado en el descenso de las mortalidades registras por *Y. ruckeri* en salmónidos en todo el mundo. Las vacunas contra la enfermedad de la boca roja han sido elaboradas y puestas a prueba utilizando la vía oral (Gosh *et al.,* 2016), por inmersión y por vía intraperitoneal (Villunsen *et al.,* 2011; Chettri *et al.,* 2013; Soltani *et al.,* 2016; Jaafar *et al.,* 2019). Esta última aparece como la más eficaz al conferir una protección larga y superior frente a otras vías de administración, sin embargo, es considerada costosa y laboriosa, pero adecuada para ejemplares más grandes (Chettri *et al.,* 2013). Generalmente se suele vacunar a ejemplares de talla pequeñas, alrededor de los 3.5 - 5g (Chettri *et al.,* 2015) por la vía de inmersión, la cual es práctica para este rango de peso. En ese sentido ha sido propuesto potenciar la inmunización utilizando refuerzos post primera vacunación, estos han demostrado ser eficaces a la hora de mejorar la supervivencia post infección en trucha arco iris (Raida *et al.,* 2011; Deshmukh *et al.,* 2012; Jaafar *et al.,* 2019). Se ha reportado que la mejora de la inmunidad utilizando un refuerzo depende de la vía de administración de la primera vacuna, así, la primera vacunación por inmersión seguida de un refuerzo por inmersión eleva la protección contra *Y. ruckeri* (Jaafar *et al.,* 2019).

Probióticos: Uno de los métodos que está ganando reconocimiento para el control de patógenos en la industria acuícola, es el uso de bacterias benéficas o probióticos (Ringo y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; Ringø y Birkbeck, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002, Chauhan y Sigh, 2018). El término "probiótico" ha sido modificado por Verschuere *et al.* (2000), para el uso en acuicultura como: "microorganismo vivo que tiene un efecto beneficioso sobre el hospedador modificando la comunidad microbiana relacionada con él o con el ambiente en el que éste se desarrolla través de una mejora del uso del alimento o de su valor nutricional, y/o de la respuesta del hospedador a las enfermedades, y/o la calidad del ambiente en el que se desarrolla". Además, "un organismo probiótico puede considerarse como vivo, muerto o componente de una célula microbiana, que se administra a través de

la alimentación o al agua, beneficiando al huésped a través de la mejora de la resistencia a las enfermedades, el estado de salud, el rendimiento del crecimiento, utilización del alimento, respuesta al estrés o vigor general, que es logrado al menos en parte mediante la mejora del equilibrio microbiano del huésped o el equilibrio microbiano del medio ambiente" (Merrifield *et al*.,2010).

Los probióticos pueden proteger al huésped contra patógenos, produciendo metabolitos que inhiben la colonización o crecimiento de otros microorganismos o por competencia con ellos por recursos tales como nutrientes o espacio (Ouwehand *et al.*, 1999, 2001; Forestier *et al.*, 2001; Pinchuk *et al.*, 2001; Servin y Coconnier, 2003; Vine *et al.*, 2004; Chauhan y Sigh, 2018), mejora de la calidad del agua (Moriarty, 1997, Ma *et al.,* 2009; Cha *et al.,* 2013), mejora del sistema inmunológico (Gatesoupe 1999; Balcazar *et al.*, 2004; Picchietti *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010, Akhter *et al.*, 2015) y la estimulación del sistema digestivo (Suzer *et al.*, 2008; Lazado *et al.*, 2012).

La mayoría de trabajos con probióticos en peces se han enfocado en la protección contra enfermedades infecciosas. En ese sentido, varios estudios han reportado el aislamiento y potencial benéfico de los probióticos en el cultivo de *O. mykiss*. Irianto y Austin (2002) aislaron bacterias del intestino de salmón Salmo salar, trucha *O. mykiss* y turbot *Scophthalmus maximus* de las cuales 11 de 177 (6% del total) mostraron actividad antimicrobiana contra *Aeromonas salmonicida*. La administración vía oral de *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* fue efectiva al controlar la infección por *Y. ruckeri* (Raida *et al.*, 2003). Además Brunt y Austin (2005) aislaron 125 bacterias del tracto digestivo de trucha *O.mykiss* y carpa *Cyprinus sp*, en la cual se obtuvo un solo cultivo potencial probiótico el que fue identificado como *A. sobria* GC2. Burbank *et al.*, 2012, aislaron 318 bacterias a partir del tracto gastrointestinal de *O. mykiss* de las cuales 16 resultaron potenciales probióticos e inhibitorios contra *F. psychrophilum*. Capkin y Altinok (2008), demostraron la reducción de la mortalidad por la infección con *Y. ruckeri* en trucha arco iris por medio de la administración de alimento suplementado con de *B. mojavensis* y *Enterobacter cloacae* aislados del intestino de trucha arco iris.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas de *Y. ruckeri*.

Cepas de *Y. ruckeri* aisladas de brotes de ERM producidas en Junín, Huaráz y Puno entre los años 2008 – 2018 y la cepa *Y.ruckeri* ATCC 29473 fueron utilizadas como cepas testigo para el aislamiento de bacterias con capacidad antimicrobiana del tracto gastrointestinal de *O. mykiss*. La confirmación molecular de las cepas testigo utilizadas en este estudio fue realizada utilizando los métodos descritos en el apartado "identificación bacteriana" en el presente manuscrito.

3.2 Aislamiento de los potenciales probióticos

Sesenta ejemplares de trucha arco iris *O. mykiss* (200 – 350g) procedentes de Puno, Junín, Lima (Canta), Lima (San Mateo) y Ancash fueron utilizadas para el aislamiento de potenciales probióticos. Se realizó la eutanasia a los peces utilizando sobredosis de MS-222 (Tricaína metanosulfonato) (AVMA, 2013). Para determinar el estado de salud de los ejemplares, muestras de bazo y riñón anterior fueron sembrados en placas con Agar Soya Tripticasa (TSA, Merck, Alemania) de tal forma que, si un ejemplar enfermo fue detectado, las muestras tomadas del mismo fueron descartadas. Los tractos digestivos fueron removidos asépticamente y el contenido eliminado. El tubo digestivo vacío fue lavado con PBS y se realizó un corte longitudinal para exponer la parte interior. En seguida, el mucus intestinal fue colectado en placas petri mediante raspados utilizando una navaja de bisturí (Burkbank *et al.*, 2012). Un gramo del mucus colectado fue homogenizado en 9 ml de PBS (Brunt y Austin 2005). Diluciones al décimo fueron realizadas utilizando PBS y 100µl fue sembrado por el método de diseminación sobre placas con Agar Tripticasa de Soya (TSA) (Merck, Alemania) por duplicado e incubadas a 22°C por hasta por 48 horas. Las colonias resultantes fueron aisladas mediante pasajes sucesivos en caldo y agar TSA.

3.3 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de bacterias aisladas *de O. mykiss* frente a cepas de *Y. ruckeri*

a) Técnica de la Doble capa

Se evaluó la capacidad de las bacterias aisladas del intestino de trucha arco iris (en adelante "las bacterias potenciales probióticas") de inhibir el crecimiento de los patógenos

bacterianos evaluados por medio de la producción de sustancias antimicrobianas utilizando el método de la doble capa (Dopazo, 1988) sobre medio de cultivo sólido. Para esto, se sembraron individualmente 10 µl de un cultivo *overnight* de las bacterias potenciales probióticas sobre placas con agar Muller Hinton (Merck, Alemania) a 22°C por 48 horas. Una vez crecidas la macrocolonias, estas fueron expuestas a vapores de cloroformo (Merck, Alemania) por 30 minutos, con el objetivo de eliminar la capacidad de reproducción de las bacterias. Posteriormente, sobre la placa de agar TSA se incluyó una segunda capa de agar TSA semisólido (70%) mezclado con 10µl de cultivos *overnight* de cepas de *Y. ruckeri*. Las placas fueron incubadas a 22°C por 24h para permitir el crecimiento de *Y.ruckeri*. Las zonas de aclaramiento fueron registradas como medida de la capacidad antimicrobiana de las cepas potenciales probióticas contra *Y. ruckeri*.

b) Técnica de difusión en pocillos de extractos libres de células

Para evidenciar la producción de compuestos antimicrobianos en el medio libre de bacterias se realizó el ensayo de difusión en pocillos (Burbank *et al.*, 2012; Didinen *et al.*, 2016). Las cepas potenciales probióticas seleccionadas del ensayo anterior, fueron cultivadas en caldo TSB e incubadas a 22°C por 24h. Posteriormente, 5 ml fueron centrifugados (3500 g) por 10 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de membrana de 0.22µ, para así obtener el extracto libre de células (ELC). Al mismo tiempo, las cepas de *Y. ruckeri* fueron sembradas por diseminación en placas con TSA, utilizando 50 µl de cultivo en TSB. Después, 100 µl del ELC fueron agregados dentro de pocillos en el agar, los cuales fueron elaborados utilizando la base de una pipeta Pasteur estéril. Los cultivos fueron incubados a 22°C por 24h. La actividad antibacteriana fue definida como el diámetro (mm) de la zona clara alrededor del pocillo sustrayendo la medida del diámetro del pocillo.

c) Evaluación de la actividad antimicrobiana en cocultivos

Se realizaron cocultivos para evaluar la capacidad de las bacterias de inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados enfrentándolos en medio de cultivo líquido (Vaseeharan y Ramasamy, 2003, Coman *et al.*, 2014). Para esto, se utilizaron placas multipocillos (48 Wells Falcon, USA) y se agregaron 800 µl de caldo TSB en cada pocillo a los cual se inoculó con 100µl de las bacterias potenciales probióticas y 100µl de las cepas patógenas de *Y.ruckeri*, las cuales estuvieron en 10^8 UFC/ml al momento de la siembra. Cada bacteria potencial probiótica fue cocultivada con cada cepa de *Y.ruckeri* por duplicado a diferentes temperaturas: 12, 15 y 22°C por 48h.

En otro grupo fue sembrado solamente las cepas potenciales probióticas por 48h a 12°C. Luego del tiempo de incubación, 100µl de *Y. ruckeri* fueron adicionados en cocultivo e incubado por 48h adicionales en la misma temperatura. El grupo control estuvo representado por cultivos individuales de las cepas potenciales probióticas y las cepas patógenas de *Y. ruckeri* por 96h a 12, 15 y 22°C. Para evidenciar la capacidad inhibitoria de las cepas potenciales probióticas frente a *Y. ruckeri* en cocultivo, se realizaron siembras utilizando diluciones al décimo en tubos de ensayo conteniendo PBS. Las diluciones fueron sembradas en placas con TSA e incubadas a 22° por 48 horas. Los microorganismos resultantes fueron discriminados por la morfología de la colonia. El crecimiento o ausencia de *Y. ruckeri* en las placas fue anotado como (+) o (-) respectivamente. El resultado negativo (-) fue indicativo de la capacidad inhibitoria de las cepas bacterianas aisladas del intestino de trucha arco iris frente a los patógenos.

3.4 Resistencia a diferentes concentraciones de líquido biliar y pH

Para evidenciar la capacidad de las cepas de resistir las condiciones del paso por el tracto gastrointestinal, se llevaron a cabo exposiciones de las bacterias seleccionadas en líquido biliar y en diferentes concentraciones de pH. El líquido biliar fue colectado de truchas arco iris adultas directamente de la vesícula biliar utilizando una jeringa estéril y almacenada en tubos de vidrio a -20°C hasta su uso posterior.

Un mililitro de cada cepa bacteriana potencial probiótica fue centrifugada a 3500g por 10 minutos a 4°C y el pellet resultante fue resuspendido en 1ml de PBS con y sin bilis de trucha y en tubos conteniendo diferentes concentraciones de pH por medio de la adición de HCl concentrado. Las concentraciones de bilis en PBS fueron de 1, 3, 6 y 10% v/v y de pH fueron 2, 4 y 6 unidades (Nikoskelainen *et al.*, 2001, Balcázar 2008). Los tubos de prueba fueron incubados a 22°C por 1.5 horas. Pasado el tiempo, las bacterias fueron contadas sobre placas de agar TSA utilizando el método de conteo *drop plate* (Chen, 2003).

3.5 Hidrofobicidad

Las bacterias potenciales probióticas fueron cultivadas en caldo TSB por 24h. Los cultivos fueron entonces centrifugados a 3500g por 10 minutos y el pellet resultante (10^8 UFC) fue resuspendido en 3ml de PBS e inmediatamente, la absorbancia inicial (DO_{600nm}) (A_{0min}), fue estimada utilizando un espectrofotómetro Cary UV VIS®. En seguida, cada suspensión bacteriana fue mezclada de forma individual con 1ml de Xileno (Merck, Alemania). La mezcla

fue homogenizada en un vortex por 1 minuto para luego dejar en reposo por 5 minutos para permitir la separación de las fases de la mezcla. La fase acuosa fue cuidadosamente separada e inmediatamente la concentración fue medida por espectrofotometría (DO_{600nm}) (A_{5min}). El experimento fue realizado por triplicado. La hidrofobicidad fue expresada de la siguiente manera (Xu *et al.* 2009):

$$\text{Hidrofobicidad (\%)} = (1 - A_{5min} / A_{0min}) \times 100$$

3.6 Producción de enzimas

La actividad enzimática de las bacterias potenciales probióticas fue evaluada. Para evidenciar la actividad lipolítica, se realizó según el método formulado por Sierra (1957) pero utilizando como medio base el TSA. Se inocularon las cepas seleccionadas en el centro de placas con medio de cultivo TSA suplementado con 1% v/v Tween 80 y 0.001% v/v de cloruro de calcio (Merck, Alemania). La actividad amilasa fue determinada con Agar Almidón 1% v/v (Sharlau, España) (Latorre *et al.*, 2016). La actividad proteasa se llevó a cabo utilizando Agar Caseína 0.5% v/v (Zhou *et al.*, 2009). Las placas fueron posteriormente incubadas a 22°C por 48 horas. La actividad enzimática fue registrada por observación directa en las placas con los respectivos indicadores: Formación de cristales de calcio para detectar la actividad lipolítica, halos claros alrededor de las colonias después de la adición de lugol sobre la placa para la detección de la actividad amilasa y halos claros alrededor de la colonia como evidencia de la producción de proteasas.

Por otro lado, se evidenció la producción de enzimas de las bacterias potenciales probióticas utilizando el kit API ZYM (Biomerieux, Francia). La evaluación fue conducida de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizaron suspensiones bacterianas en solución salina 0.85% (Biomerieux, Francia) a una escala de Mcfarland 5. Posteriormente, 65µl de la suspensión fue dispensado en cada cúpula y fue incubado por 5 h a 22°C. Después de la incubación, una gota de ZYM A y ZYM B fue agregado a cada cúpula para revelar el color de tal forma que se asignen valores positivos o negativos respecto a cada sustrato analizado.

3.7 Identificación bacteriana

Las bacterias potenciales probióticas seleccionadas fueron identificados utilizando API 50 CH (CHB) y API 20E (Biomerieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante, además, se realizó la extracción de ADN bacteriano utilizando el método de CTAB-NaCl y

precipitación con isopropanol. Las extracciones fueron evaluadas en cantidad y calidad utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop OneC, y llevadas a concentraciones finales de 50 ng/µL. Para la identificación de las cepas bacterianas, se realizaron las amplificaciones de los genes ARNr 16S, mediante PCR utilizando los cebadores reportados por Lane *et al.* (1991). Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa 1%, purificados y secuenciados para ambas hebras. Los electroferogramas obtenidos fueron editados visualmente utilizando el programa Chromas Lite v2.1, y las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas con las bases de datos públicas de nucleótidos GenBank del NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando la herramienta BLASTn para la identificación molecular.

3.8 Determinación de los posibles efectos patógenos de las bacterias aisladas

a) Peces

Ejemplares de 10 ± 0.7 g de peso de trucha arco iris fueron adquiridas de una piscigranjas en Canta, Lima, las cuales fueron acondicionadas en tanques de 300 litros y aclimatadas a las condiciones de laboratorio (16°C, aireación constante y recambios de agua al 100%/día) por 1 semana. El estado de salud de los ejemplares a ser utilizados en el experimento fue verificado por medio de análisis microbiológicos. Posteriormente, 20 ejemplares fueron distribuidos en tanques de fibra de vidrio de 100 litros por duplicado (10 ejemplares por tanque).

b) Inóculo

Las bacterias potenciales probióticas seleccionadas fueron cultivadas en medio de cultivo fresco y fueron centrifugadas a 2500 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet lavado en PBS dos veces. Finalmente, el pellet resultante fue resuspendido en PBS.

c) Evaluación de la patogenicidad por la vía oral

Para evaluar el potencial patogénico de las bacterias potenciales probióticas seleccionas por medio de la administración vía oral, se mezcló las bacterias potenciales probióticas con el alimento utilizando un frasco con vaporizador hasta lograr una concentración de 10^8 UFC/g de alimento (Wanka *et al.* 2018). La mezcla de alimento con las bacterias evaluadas fue preparada cada 5 días y la viabilidad de las mismas fue verificada mediante crecimiento en placas con

agar TSA según Capkin y Altinok 2008. El grupo control estuvo conformado por peces los cuales se les administró alimento sin las bacterias seleccionadas. El alimento fue administrado diariamente a razón de 5% de la biomasa, dividida en tres raciones. El experimento tuvo una duración de 20 días, en los cuales la mortalidad fue registrada. Para comprobar que las bacterias evaluadas fueron responsables de la mortalidad, se realizaron siembras en agar TSA del riñón, hígado y bazo los cuales fueron incubados a 20°C por 48h.

d) Evaluación de la patogenicidad por la vía intraperitoneal

Así mismo, otro experimento con las mismas características de cultivo que el experimento antes descrito fue llevado a cabo. Los peces fueron sedados con MSS 222 90 mg/l, una vez anestesiados, se inoculó vía intraperitoneal las bacterias potenciales probióticas en una dosis de 0.1ml/pez en las concentraciones utilizadas en el ensayo vía oral. El grupo control fue inoculado con 0.1 ml/pez de PBS. El análisis y la duración del ensayo fue el mismo que el utilizado en el ensayo anterior.

3.8Análisis de la información

Los resultados muestran el promedio de las repeticiones y la desviación estándar. Los resultados de los ensayos de resistencia a diferentes concentraciones de bilis de trucha, pH e hidrofobicidad fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post hoc para determinar diferencias significativas entre las cepas con un nivel de significancia del 0.05. Los resultados que no cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas, fueron analizados utilizando el test de Kruskal Wallis seguido por la prueba de Dunnet T3 para evidenciar diferencias significativas entre los tratamientos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando SPSS® Versión 20 para Microsoft Windows.

IV. RESULTADOS

4.1 Cepas patógenas de *Y. ruckeri*

Las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en este estudio fueron aisladas de brotes de ERM en diferentes zonas del país. Estas cepas fueron evaluadas molecularmente para confirmar el género y la especie (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cepas de *Yersinia ruckeri* utilizadas en este estudio

Origen	Marcador Molecular	pb	Especie	Accesión Genbank	%ID
6Puno	16S	1294	*Yersinia ruckeri*	MN505173	99
7Puno	16S	1294	*Yersinia ruckeri*	MN505172	100
Huaraz	16S	1308	*Yersinia ruckeri*	MN505171	100
Junín	16S	1308	*Yersinia ruckeri*	MN505170	99
ATCC 29473			*Yersinia ruckeri*		

4.2 Aislamiento de bacterias con actividad antimicrobiana.

Un total de 541 cepas (Figura 6, Cuadro 2) de diferente morfología y pertenecientes a diferentes géneros bacterianos aisladas a partir de intestino de trucha arco iris de cultivo fueron aisladas y evaluadas para evidenciar su actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas de *Y. ruckeri*.

Cuadro 2. Número de bacterias aisladas de trucha arco iris procedentes de diferentes orígenes para su posterior evaluación.

Número de bacterias aisladas	Centro de cultivo
42	Puno – Puno
210	Huaraz - Ancash
109	Canta - Lima
76	Huancayo – Junín
84	San Mateo - Lima
TOTAL 521	

Un total de 19 cepas mostraron actividad antimicrobiana frente a alguna de las cepas de *Y. ruckeri* evaluada (Figura 7 - 8). Sin embargo, 8 cepas mostraron inhibición ante la mayoría de cepas de *Y.ruckeri* evaluadas (Cuadro 3), empero, las cepas 112 y 35, a pesar que mostraron inhibición frente a un número importante de los patógenos evaluados, los halos de inhibición se mostraron turbios, por lo tanto, no fueron consideradas para los estudios posteriores. Las cepas seleccionadas fueron: 131, 134, 1c, 1d, 2cc y 1k.

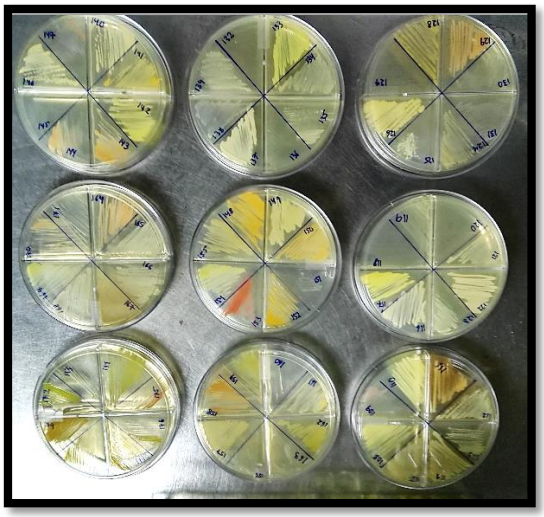


Figura 6. Diversidad de cepas bacterianas aisladas del tracto gastrointestinal de trucha arco iris *Onchorhyncus mykiss.*

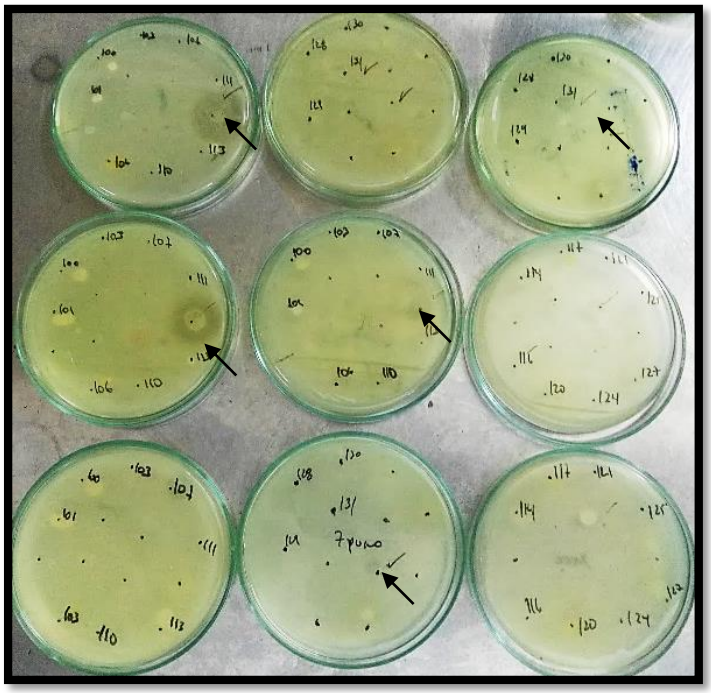


Figura 7. Enfrentamiento primario para la detección de bacterias con potencial antagonista frente a cepas de *Yersinia ruckeri.* Los halos de inhibición indican capacidad de las cepas aisladas de inhibir el crecimiento de los patógenos enfrentados (flechas).

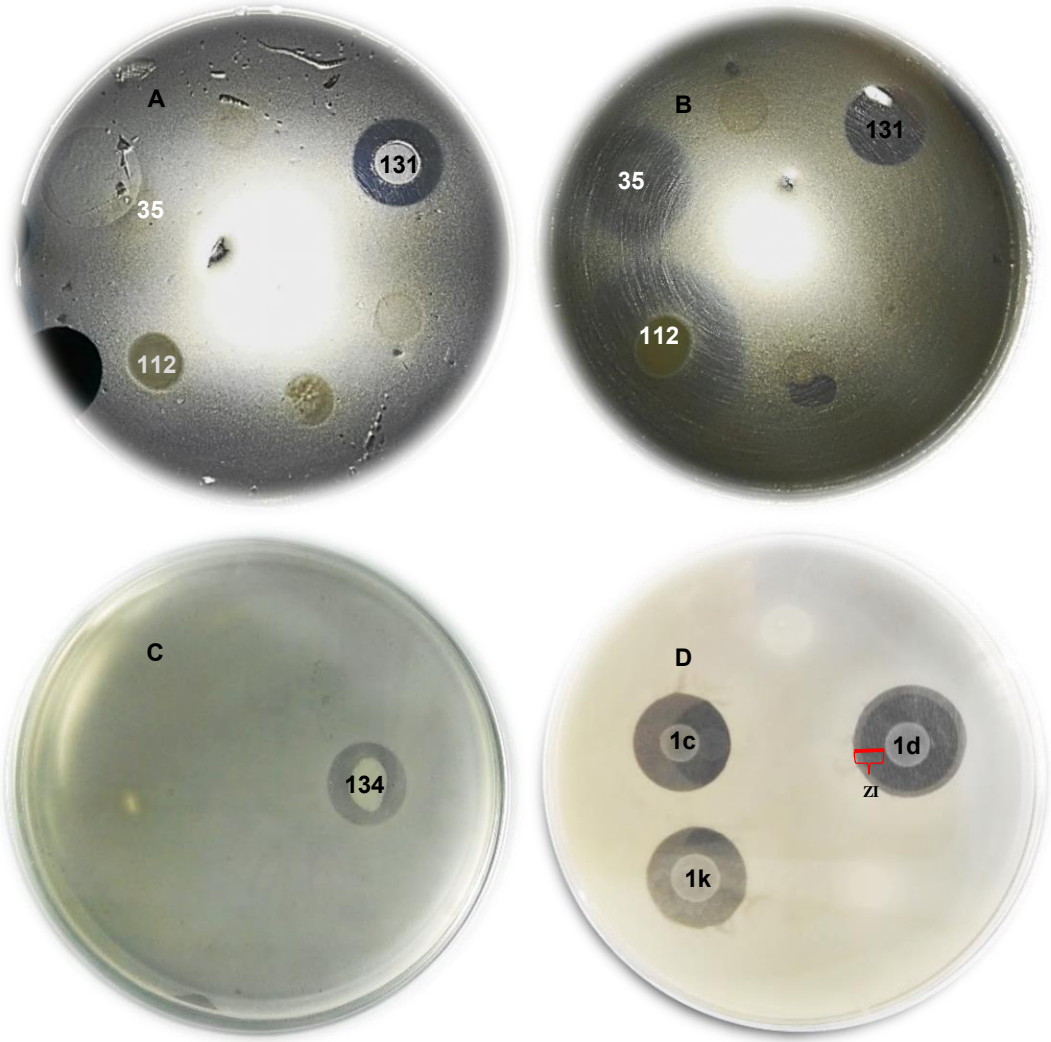


Figura 8. Halos de inhibición producidos por las cepas 112, 35,131 y 134 como consecuencia de la inhibición contra cepas de *Yersinia ruckeri.* Se aprecian halos de inhibición turbios cuando las cepas 112 y 35 fueron enfrentadas con *Yersinia ruckeri*. En comparación con b), en a) no se evidencia inhibición por parte de las cepas 112 y 35 frente a una cepa de *Yersinia ruckeri.* ZI= Zona de inhibición considerada.

Cuadro 3. Inhibición de cepas de *Yersinia ruckeri* por parte de las bacterias seleccionadas del intestino de trucha arco iris.

		Yersinia ruckeri				
Cepas*	origen	*6*Puno	*7* Puno	Huaraz	Junín	ATCC 29473
112	Huaraz	+++	-	++	+++	++
131	Huaraz	+	++	++	++	++
122	Huaraz	-	-	-	-	+
121	Huaraz	-	-	-	-	+
182	Huaraz	-	-	-	+	-
134t	Huaraz	+	-	+	+	+
167	Huaraz	++	-	-	-	-
138	Huaraz	+	-	-	-	-
35	Huaraz	++	-	++	++	+
41	San Mateo	+	-	-	-	-
8	Puno	+	-	-	-	-
37	Huancayo	-	+	-	-	-
25	San Mateo	-	+	-	-	-
53	San Mateo	-	+	-	-	-
5	San Mateo	-	-	+	-	-
1c	Huaraz	++	++	++	++	++
1d	Huaraz	++	++	++	++	++
1k	Huaraz	++	++	++	++	++
2cc	Huaraz	++	++	++	++	++

Zonas de inhibición: 0.1 – 5 mm = +, 5 mm – 1cm = ++, >1cm = ++

*** Cepas con actividad antimicrobiana**

4.3 Inhibición del crecimiento de *Y.ruckeri* por los extractos libres de células (ELC) de las bacterias potenciales probióticas seleccionadas

Los ELC de cada cepa seleccionada fueron puestos a prueba para evaluar la capacidad de los metabolitos de inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados. Los ELC de las cepas 1c, 1d, 1k y 2cc fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas de *Y. ruckeri* evidenciado por los halos de inhibición alrededor de los pocillos. Por otro lado, los ELB de las cepas 131 y 134 no inhibieron el crecimiento de los patógenos (Figura 9, Cuadro 4).



Figura 9. Zonas de inhibición producidas por las cepas bacterianas aisladas. C= control Caldo TSB.

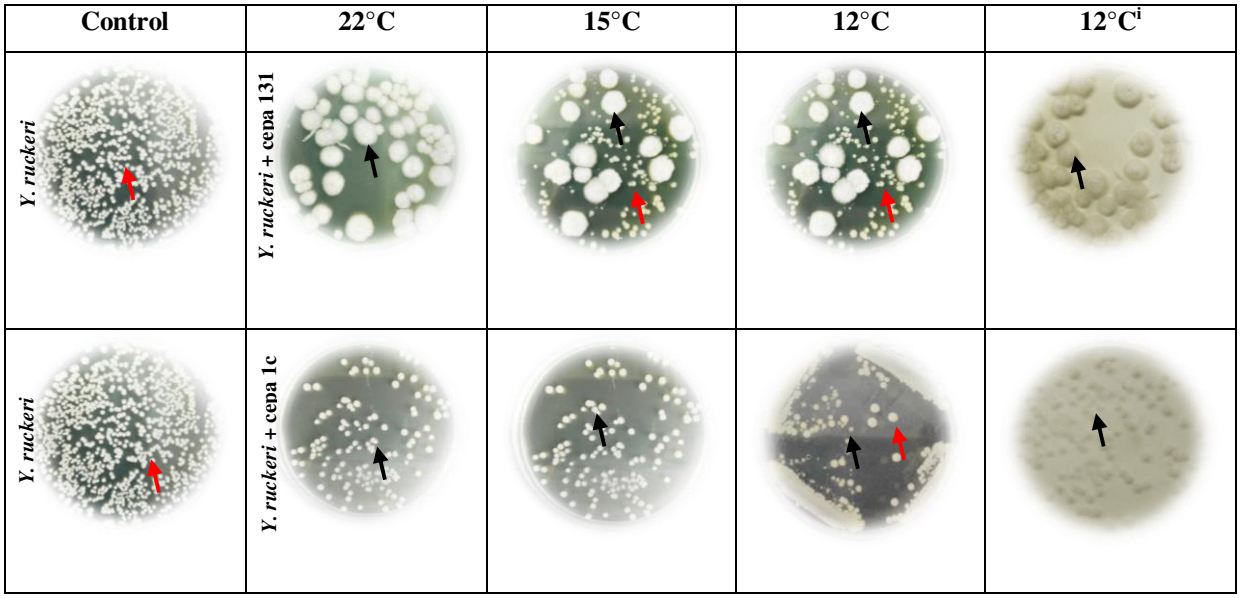
Cuadro 4. Inhibición de las cepas de *Yersinia ruckeri* por los extractos libres de células (ELC) de las bacterias seleccionadas de trucha arco iris

	Y. ruckeri				
Cepas	***6*Puno**	***7* Puno**	**Huaraz**	**Junín**	**ATCC 29473**
131	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-
1c	+	++	++	++	+
2cc	++	+	++	++	+
1k	++	+	++	++	+
1d	++	+	++	++	++

Zonas de inhibición: 0.1 – 5 mm = +, 5 mm – 1cm = ++

4.4 Inhibición en cocultivo

La mayoría de cepas potenciales probióticas seleccionadas del intestino de trucha arco iris mostraron inhibir completamente el crecimiento de las cepas patógenas de *Y. ruckeri* en cocultivo a 22 y a 15°C, no evidenciándose la misma respuesta a 12°C. En ese sentido, para comprobar el efecto de la temperatura en la producción de antimicrobianos, fue necesario una pre incubación a 12°C de las cepas potenciales probióticas por 48 h previos al cocultivo, posterior a este procedimiento, se obtuvo inhibición total de las cepas patógenas evaluadas (Figura 10, Cuadro 5). La respuesta inhibitoria fue similar en todos los cocultivos realizados con las cepas potenciales probióticas y los patógenos evaluados.



i cocultivo con *Yersinia ruckeri* posterior al crecimiento inicial de las cepas potenciales probióticas por 48h

Figura 10. *Yersinia ruckeri* (flechas rojas) sembrada por diseminación en placa a 12°C (control). Se observa crecimiento exclusivo de las cepa 131 y 1c (flechas negras) a 22°C como evidencia de la capacidad de estas bacterias de inhibir el crecimiento de *Yersinia ruckeri.* Además, se muestra crecimiento de *Y. ruckeri* y la cepa 131 a 15 y 12°C. La cepa 1c inhibió el crecimiento de *Yersinia ruckeri* a 15°C pero no a 12°C. Sin embargo, el crecimiento de la cepa 131 y 1c preincubadas por 48h y posteriormente cocultivada con *Y.ruckeri* por 48h adicionales a 12°C permitió la inhibición total de la cepa patógena.

Cuadro 5 Crecimiento (+) o inhibición (-) de *Yersinia ruckeri* en cocultivo, como evidencia de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas del intestino de trucha arco iris a diferentes temperaturas.

Cepas	22°C	15°C	12°C	12°C[i]
131	-	+	+	-
134	-	-	+	-
1c	-	-	+	-
1d	-	-	+	-
2cc	-	-	+	-
1k	+	+	+	-

i Cocultivo con *Yersinia ruckeri* posterior al crecimiento inicial de las cepas probióticas por 48h

4.5 Identificación de bacterias seleccionadas con potencial probiótico

Las bacterias potenciales probióticas seleccionadas del intestino de trucha arco iris fueron identificadas por métodos bioquímicos y moleculares. Las cepas fueron asignadas al género *Penibacillus* excepto por la cepa 131 la cual fue identificada dentro del género *Bacillus*. Los análisis de las secuencias del gen 16S rRNA resultaron en la identificación de los aislados 1c, 1k, 2cc, 1d y 134 como *Penibacillus,* mientras que la cepa 131 les correspondió la identifiación como *Bacillus* sp. (Cuadro 6 - 7).

Cuadro 6. Identificación de las bacterias seleccionadas del intestino de trucha arco iris

	Gram	Oxidasa	Catalasa	ONPG	Indol	H2S	ADH	LDC	UREA	VP
131	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
134	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1c	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1d	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
2cc	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
1k	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+

Cuadro 7 Identificación de bacterias con potencial probiótico aisladas de intestino de trucha arco iris utilizando el kit API 50CH/B y el gen 16S rRNA

Cepa	Identificación bioquímica	%Id	Identificación Molecular	%Id 16S	Accesión Genbank
131	*Bacillus subtilis / amyloliquefasciens*	99.9	*Bacillus amyloliquefasciens*	99.9	MN505169
134	*Paenibacillus polymyxa*	62.6	*Paenibacillus* sp.	99.00	MN505156
1c	*Paenibacillus polimyxa*	98.8	*Paenibacillus* sp.	98.74	MN505165
2cc	*Paenibacillus polimyxa*	94.4	*Paenibacillus* sp.	99.10	MN505166
1k	*Paenibacillus polimyxa*	92.3	*Paenibacillus* sp.	99.50	MN505163
1d	*Paenibacillus polimyxa*	99.6	*Paenibacillus* sp.	99.08	MN505162

4.6 Resistencia sales biliares y pH

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las bacterias potenciales probióticas seleccionadas de resistir las condiciones gastrointestinales de la trucha arco iris, fueron sometidas a cultivos con diferentes concentraciones de sales biliares y unidades de pH. Las cepas bacterianas evaluadas resistieron a la exposición de las sales biliares de trucha arco iris aún en concentraciones de hasta 10% en 1.5h de cultivo (Cuadro 8). Por otro lado, hubo una reducción significativa ($P < 0.05$) de la viabilidad de las bacterias seleccionadas cuando estas fueron expuestas a diferentes concentraciones de pH. Mientras más ácido el pH, mayor fue la reducción de la viabilidad, excepto por la cepa 131, la cual mostró ser viable incluso a rangos de pH de 2 unidades en 1.5h de exposición (Cuadro 9).

Cuadro 8 Resistencia (Log UFC±SD) de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente a la exposición de líquido biliar.

Cepas	0%	1%	3%	6%	10%
131	7.92 ± 0.01	7.89 ± 0.04	7.91 ± 0.07	7.99 ± 0.15	7.95 ± 0.09
134	8.29 ± 0.01	8.13 ± 0.06	8.12 ± 0.05	8.31 ± 0.24	8.20 ± 0.10
1c	8.02 ± 0.02	8.02 ± 0.28	7.90 ± 0.60	7.89 ± 0.56	8.05 ± 0.44
2cc	8.05 ± 0.06	8.07 ± 0.01	8.07 ±0.03	8.10 ±0.05	7.87 ± 0.74
1k	8.04 ± 0.07	8.02 ± 0.65	7.99 ± 0.49	8.20 ± 0.13	7.97 ± 0.56
1d	8.15 ± 0.12	8.13 ± 0.35	7.93 ± 0.46	8.18 ± 0.07	8.00 ± 0.65

Cuadro 9. Resistencia de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente a la exposición de diferentes concentraciones de pH.

			pH	
cepa	Inicio	6	4	2
131	7.92^{a}±0.01	7.99^{a}±0.003	7.90^{a}±0.01	7.90^{a}±0.01
134	8.29^{a}±0.01	7.24^{ab}±0.98	7.38^{ab}±0.73	6.36^{b}±0.39
1c	8.08^{a}±0.07	7.75^{a}±0.68	5.73^{b}±0.48	5.69^{b}±0.57
2cc	8.32^{a}±0.07	7.90^{b}±0.05	6.58^{c}±0.18	6.28^{c}±0.15
1k	8.32^{a}±0.25	6.53^{b}±0.62	6.53^{b}±0.13	6.54^{b}±0.16
1d	8.05^{a}±0.44	7.33^{a}±0.65	5.44^{b}±0.64	5.54^{b}±0.64

Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0.05)

4.7 Hidrofobicidad

La mayoría de bacterias potenciales probióticas seleccionadas del intestino de trucha arco iris evidenciaron características hidrofóbicas con valores por encima del 12% (Cuadro 10), sin embargo, las cepas 1k,1c y 1d, mostraron características hidrofóbicas significativamente ($p<0.05$) mayores a las cepas 131 y 2cc.

Cuadro 10. Hidrofobicidad de las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris frente al xileno.

cepa	Xileno
131	$12.85^{a}\pm3.46$
134	nd
1c	$31.60^{b}\pm5.37$
2cc	$21.73^{a}\pm3.09$
1k	$34.85^{b}\pm1.32$
1d	$32.15^{b}\pm2.80$

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$)

4.8 Producción de enzimas

Las bacterias seleccionadas como potenciales probióticos presentaron actividad enzimática fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), fosfoamidasa, entre otras (Cuadro 11). Además, se pudo evidenciar la capacidad de las cepas seleccionadas de producir enzimas lipolíticas, amilolíticas y proteolíticas sobre placas con sustrato (Figura 11).

Cuadro 11. Perfil enzimático de las bacterias con potencial probiótico

Método	Enzima	131	134	1c	2cc	1k	1d
API ZYM	**Fosfatasa alcalina**	+	+	+	+	+	+
	Esterasa (C4)	+	+	+	+	+	+
	Esterasa Lipasa (C8)	+	+	+	+	+	+
	Leucina aminopeptidasa	-	-	-	-	+	+
	Quimiotripsina	-	-	+	+	-	+
	Fosfatasa ácida	+	-	-	-	+	-
	Fosfoamidasa	+	-	+	+	+	+
	α-galactosidasa	-	-	+	+	+	+
	β - galactosidasa	-	-	+	+	+	+
	α-glucosidasa	+	+	-	-	-	-
SUSTRATO EN PLACA	**Amilasas**	+	+	+	+	+	+
	Lipasas	+	+	+	+	+	+
	Proteasas	+	-	+	+	+	+

4.9 Evaluación de la patogenicidad

Para evaluar el potencial patogénico de las cepas 131, 134, 1c,1d 1k y 2cc, se llevaron a cabo experimentos vía oral y vía intraperitoneal. Los peces alimentados con las cepas potenciales probióticas no evidenciaron cambios aparentes en su comportamiento ni evidencia de lesiones externas asociado a infecciones bacterianas. En la misma vía, los peces a quienes se les administró por vía intraperitoneal las cepas seleccionadas del intestino de trucha arco iris, no presentaron ningún cambio aparente. Los análisis microbiológicos de los órganos internos de los ejemplares evaluados fueron negativos, por lo tanto, no se aislaron las bacterias administradas desde los órganos internos.

V. DISCUSIÓN

En este estudio fueron aislados del intestino de trucha arco iris 541 cepas de las cuales 21 (3.88% del total de aislados bacterianos) mostraron actividad antimicrobiana frente *Y. ruckeri*, lo que sugiere la posibilidad de encontrar bacterias con potencial probiótico del intestino de peces sanos, ya que los probióticos conforman usualmente la microbiota intestinal saludable de los organismos acuáticos (Balcázar *et al.*, 2006; Kavitha *et al.*, 2018). Además, se ha sugerido que las bacterias probióticas suelen ser más efectivas en el huésped de donde originalmente fueron aislados (Gatesoupe 1999; Verschuere *et al.* 2000; Merrifield *et al.* 2010, Van Doan *et al.*, 2018) respecto de las aisladas de animales endotermos y utilizadas en acuicultura (Wanka *et al.* 2018), ya que se considera darles posibilidades de sobrevivir y colonizar el intestino. Así, Kim y Austin (2006), Capkin y Altinok (2008), Araujo *et al.* (2015), Feckaninová *et al.* (2019), quienes utilizando el intestino de trucha arco iris como fuente primaria de búsqueda de bacterias con actividad antimicrobiana, aislaron a *Carnobacterium maltaromaticum* B26, *C. divergens* B33, *Enterococcus cloacae*, *Bacillus mojavensis*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, las cuales demostraron inhibir el crecimiento de *Y.ruckeri*.

La selección de bacterias potenciales probióticos en este estudio se realizó mediante la medición de la amplitud del espectro inhibitorio de los aislados hacia cepas patógenas, ya que este criterio se ha propuesto como el principal a la hora de seleccionar probióticos (Vine *et al.,* 2006, Mingmongkolchai y Panbangred, 2018). Llama la atención el hecho de que algunas cepas de *Y. ruckeri* no fueron inhibidas por la misma bacteria que fue capaz de inhibir a otras *Y. ruckeri.* En ese sentido, se han descrito variantes de la misma especie para *Y. ruckeri* que comprenden dos biotipos, cuatro serotipos y divergencias genéticas entre cepas de diferentes zonas geográficas (Romalde y Toranzo, 1993; Bastardo *et al.*, 2015), lo que se ha visto determinado por varios factores como el nicho ecológico, geografía, medio ambiente y prácticas de manejo de la granja que influyen en la diversidad y evolución de *Y. ruckeri* (Ormsby *et al.,* 2016). Así, parece que los metabolitos antimicrobianos actúan específicamente en cada variante de la misma especie (Zidour *et al.,* 2017), porque probablemente cada variante de *Y. ruckeri* ha diversificado sus estrategias de protección frente a los metabolitos de otras bacterias.

Las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en este estudio fueron aisladas de brotes de ERM en Huaraz, Puno y Junín, ambientes diferentes donde el manejo del cultivo se da en infraestructura de jaulas o tanques en tierra utilizando agua de río o lago, etc. Todos estos factores probablemente podrían haber influenciado en las cepas de *Y. ruckeri* para generar estrategias de evasión diferentes frente a los metabolitos antimicrobianos de las bacterias evaluadas. En

ese sentido, se debería utilizar variedad de cepas aisladas de una misma región de tal forma que se pueda descubrir bacterias productoras de antimicrobianos contra varias variantes de la misma especie. Por otra parte, se requieren más investigaciones en el país acerca de las variantes de *Y. ruckeri* en el cultivo de trucha arco iris.

La inhibición de las cepas de *Y.ruckeri* utilizando los ELC probablemente indicaría que la estaría mediada por metabolitos extracelulares segregados en el medio de cultivo (Cuadro 4). Sin embargo, las cepas *Bacillus* sp.131 y *Paenibacillus* sp.134 resultaron no inhibir el crecimiento de *Y. ruckeri* en las pruebas realizadas con ELC. Es probable que la producción algunos de los metabolitos antimicrobianos estén relacionados con la presencia de los patógenos en el mismo medio para ser activados, o también por la segregación de los mismos en sustratos distintos en los métodos utilizados (Polak-Berecka *et al.*, 2009). En ese sentido, existen reportes donde los resultados de inhibición de una bacteria patógena varían respecto al método utilizado (Brunt *et al.* 2007, Coman *et al.* 2014). Además, algunos de los metabolitos podrían ser producidos en las diferentes fases de crecimiento de la bacteria evaluada, o en el proceso de preparación del ELC los metabolitos para la actividad inhibitoria fueron eliminados o utilizados como precursores de otros (Lertcanawanichakul y Sawangnop, 2008).

En ese contexto, en las pruebas de cocultivo, la mayoría de cepas enfrentadas con *Y. ruckeri* inhibió su crecimiento a 22 y a 15°C (Cuadro 5). Es posible que los metabolitos antimicrobianos producidos por las bacterias seleccionadas sean acelerados por el aumento de la temperatura ya que cuando las bacterias fueron enfrentadas al mismo tiempo a 12°C no se observó inhibición y por lo tanto colonias de *Y. ruckeri* pudieron ser observadas en las placas con medio de cultivo. Resultados contrarios fueron observados cuando se preincubó las cepas potenciales probióticas a 12 °C y se cocultivaron con los patógenos 48h después y hasta por 48h adicionales a 12°C. Este fenómeno podría explicar el efecto inhibitorio de los metabolitos extracelulares producidos por las cepas seleccionadas y el efecto de la temperatura en la estimulación de los mismos. Es relevante el hecho de haber puesto a prueba la capacidad de las bacterias potenciales probióticas de ser activas a temperaturas bajas las cuales se presentan en el ambiente de cultivo de trucha en el Perú, por ejemplo, en el Lago Titicaca, lugar de mayor producción de trucha del país, se presentan temperaturas entre 11.2 y 19.6°C (IMARPE, 2018) y los brotes de ERM principalmente se dan por encima de los 14°C.

Las bacterias seleccionadas en este estudio demostraron ser capaces de sobrevivir a la exposición de líquido biliar y en diferentes concentraciones de pH, estas características son importantes a la hora de seleccionar bacterias para utilizarlas como potenciales probióticos en acuicultura (Feckaninová *et al.,* 2017), ya que asegurarían que las bacterias probióticas lleguen

al intestino viables para actuar. A pesar que todas las bacterias resistieron a la exposición *in vitro* del líquido biliar de trucha arco iris, la cual se ha determinado que podría encontrarse en el pez en concentraciones de 0.4 a 1.3% (Balcazar *et al.*, 2008), la exposición a unidades de pH bajos como 2, disminuyeron significativamente (p<0.05) la viabilidad de las bacterias evaluadas, resultados similares a otros trabajos con aislados de trucha arco iris (Balcazar *et al.*, 2008; Pérez-Sanchez *et al.*, 2011; Didinen *et al.*, 2016). Se ha reportado que el p H en el estómago de la trucha arco iris estaría en el rango de 2.6 – 2.72 unidades de pH, y cambiaría conforme el proceso de digestión continúa (Sugiura *et al.*, 2006; Bucking y Wood, 2009). Sin embargo, a pesar de la reducción en la cantidad de bacterias en menores unidades de pH, éstas no fueron eliminadas completamente sino más bien se detectaron por encima de 5 log UFC/ml, lo que probablemente aseguraría el tránsito desde el estómago hacia el intestino, donde deberían adherirse al mucus y colonizar el epitelio intestinal (Feckaninová *et al.* 2019).

En este contexto, las pruebas de hidrofobicidad, en que las bacterias se adhieren a la fase hidrófoba del solvente utilizado, son necesarias para estimar la capacidad de las bacterias potenciales probióticas para adherirse en el intestino (Rühs *et al.*, 2014), de tal forma que se evite que las bacterias patógenas evaluadas ocupen los espacios disponibles en el tracto intestinal (Kavitha *et al*, 2018), como en el caso de *Y. ruckeri*, donde se ha sugerido que la ruta digestiva juega un rol relevante en el proceso de infección (Guijarro *et al.* 2018). Así, las cepas *Bacillus amyloliquefasciens* 131, *Paenibacillus* sp. 1c, *Paenibacillus* sp. 1d, *Paenibacillus* sp. 1k y *Paenibacillus* sp. 2cc aisladas del intestino de trucha arco iris mostraron niveles de hidrofobicidad entre 12 y 32 %. Resultados similares fueron presentados por Perez-Sanchez *et al.* (2011) quienes hallaron que las cepas ácido lácticas potenciales probióticas que aislaron de trucha arco iris resultaron entre 11 – 31% de porcentaje de hidrofobicidad. Sin embargo, los niveles de hidrofobicidad son difícilmente comparables entre los trabajos realizados ya que se han utilizado diferentes reactivos, buffers, tiempos de mezcla, volumen del solvente, periodo de crecimiento bacteriano (Saini *et al.,* 2011), factores físico químicos (Bunt *et al.*, 1993), los cuales causan que la adsorción de la bacteria cambie drásticamente (Rühs *et al.*, 2014). En consecuencia, no fue posible evidenciar que la cepa *Paenibacillus* sp. 134 posea características hidrófobas. Las pruebas realizadas por Sica *et al.* 2012 con bacterias ácido láctica evidenciaron niveles bajos de hidrofobicidad (entre 0 y 15%), no obstante, las cepas evaluadas en el mismo trabajo mostraron ser capaces de adherirse al mucus de la piel de trucha arco iris. Por consiguiente, es necesario realizar otros ensayos para asegurar que las cepas seleccionadas presentan o no definitivamente características de adhesión que permitan asegurar su estancia en el intestino del huésped.

Las enzimas producidas por bacterias podrían mejorar la digestión de alimentos en el

huésped (Hai *et al.*, 2015), ya que este criterio también ha sido recomendado cuando se seleccionan probióticos (Merrifield *et al.,* 2010). En esa vía, el presente estudio evidenció que las cepas seleccionadas producen varias enzimas las cuales están envueltas en la hidrólisis de las celulosas, degradación de proteínas, lípidos, polisacáridos entre otros. Bacterias del género *Bacillus* y *Penibacillus* aisladas de peces han sido ampliamente relacionados con productores de enzimas (Ray *et al.,* 2012; Das *et al.*, 2014), entre ellas amilasas, lipasas y proteasas (Mondal *et al.*, 2010; Ray *et al.*, 2010; Askarian *et al.*, 2012; Midhun *et al.*, 2017). Esta característica podría probablemente ser de utilidad en los procesos de digestión de alimentos para beneficio del huésped (Liu *et al.*, 2016).

La identificación bacteriana dio como resultado la ubicación de las cepas dentro del género *Bacillus* y *Paenibacillus*. Las bacterias del género *Bacillus* han sido ampliamente evaluados como probioticos en varios organismos acuáticos en acuicultura (Irianto y Austin 2002; Vine *et al.* 2004; Balcazar *et al.* 2006; Ziaei-Nejad *et al.* 2006; Ravi *et al.* 2007; Sun *et al.*, 2010; Cha *et al.*, 2013; Selim *et al.*, 2015; Hauville *et al.*, 2016; Gupta *et al.* 2016; Liu *et al.*, 2017; Thy *et al.*, 2017; Abarike *et al.*, 2018; Adorian *et al.*, 2018; Gobi *et al.*, 2018; Meidong *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2018). Estas bacterias se encuentran conformando el microbioma del tracto gastrointestinal de animales, producen endosporas las cuales son resistentes a las condiciones ambientales y al almacenamiento (Mingmongkolchai y Panbangred, 2018); además, son conocidas por producir compuestos antimicrobianos incluyendo lipopeptidos, surfactinas, bacteriocinas y sustancias inhibitorias símiles a las bacteriocinas (Mingmongkolchai y Panbangred, 2018).

En trucha arco iris Newaj-Fyzul *et al.* (2007), Capkin y Altinok (2008), aislaron bacterias del género *Bacillus* contra patógenos de la especie, sin embargo, también se han utilizado cepas no nativas del género *Bacillus* con resultados prometedores (Raida *et al.*, 2003, Bagheri *et al.,* 2008; Merrifield *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2017). Desde el punto de vista del comercio, las bacterias esporo formadoras son convenientes porque son sencillas de transportar y pueden ser almacenadas indefinidamente, además, son sencillas de regresarlas al estado vegetativo una vez aplicados en los tanques de cultivo o proliferar en el tracto gastrointestinal (Hill *et al.*, 2009; Kuebutornye *et al.*, 2019).

Por otro lado, son escasos los trabajos en los que se han aislado o utilizado bacterias del género *Paenibacillus* como probióticos en organismos acuáticos, sin embargo, en aquellos, se resalta la mejora del crecimiento, resistencia a enfermedades, estimulación de los componentes del sistema inmunológico y mantenimiento de la calidad de agua en *Penaeus*

monodon, Oreochromis niloticus y *Cyprinus carpio* (Ravi *et al.*, 2007, Gupta *et al.*, 2014, Ina-Salwany *et al.*, 2015; Midhun *et al.*, 2017, Chen *et al.*, 2019). El presente trabajo representa el primer registro del potencial de bacterias del género *Paenibacillus* para ser aplicadas como probióticos en el cultivo de la trucha arco iris, ya que no se han encontrado trabajos realizados respecto al objeto de estudio, aun cuando en los análisis del microbioma del intestino de esta especie se han detectado bacterias de este género (Wong *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2019).

Existen escasos reportes donde bacterias del género *Bacillus* han causado alguna infección en trucha arco iris (Orozova *et al.*, 2017), por consiguiente, la evidencia de la inocuidad de las cepas aisladas del intestino de trucha es un requisito importante a la hora de seleccionar cepas potenciales probióticas (Verschuere *et al.*, 2000). En ese sentido, las infecciones experimentales realizadas utilizando el pellet como medio de transporte y las inyecciones vía intraperitoneal no resultaron en mortalidades ni alguna complicación asociada a algún problema infeccioso en los ejemplares evaluados, esto en concordancia con los reportes donde se han aislado bacterias del género *Bacillus* o *Paenibacillus* para utilizarlos como probióticos en las que no se han informado mortalidades asociadas a infecciones por las cepas evaluadas.

VI. CONCLUSIÓN

Se aislaron e identificaron del intestino de trucha arco iris 6 bacterias con capacidad antimicrobiana frente a cepas de *Yersinia ruckeri*, las cuales fueron identificadas como: *Bacillus amyloliquefasciens* 131, *Paenibacillus* sp. 134, *Paenibacillus* sp 1c, *Paenibacillus* sp 1d, *Paenibacillus* sp 1k, *Paenibacillus* sp 2cc.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con trucha arco iris utilizando diferentes concentraciones de las bacterias evaluadas y realizar retos frente a *Y. ruckeri* para evaluar la capacidad de resistencia que confieren las cepas probióticas frente a las infecciones con *Y. ruckeri,* para que se logre una mejor comprensión del modo de acción de estas bacterias para su posterior utilización como probióticos.
- Utilizar diversas herramientas moleculares y otras para lograr identificar las especies del género *Paenibacillus* con mayor precisión.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarike ED, Cai J, Lu Y, Yu H, Chen L, Jian J, Tang J, Jun L, Kuebutornye FKA. 2018. Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 82: 229–238.

Adorian TJ, Jamali H, Farsani HG, Darvishi P, Hasanpour S, Bagheri T, Roozbehfar R. 2018. Effects of Probiotic Bacteria *Bacillus* on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Hematological Parameters of Asian Sea Bass, *Lates calcarifer* (Bloch), Probiotics Antimicrob. Proteins. (2018).

Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. Fish Shellfish Immunol. 45(2):733-41.

Arregui L. 2013. El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid.

Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E. 2012. Culturable autochthonous bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. Aquaculture, 326–329, 1–8.

Austin B, Austin DA. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. 3th ed. Springer-Praxis, Godalming.

Austin DA, Robertson PA, Austin B. 2003. Recovery of a new biogroup of Yersinia ruckeri from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). Syst Appl Microbiol. 26(1):127-31.

AVMA. 2013. Guidelines for the Euthanasia of Animals.

Bagheri T, Hedayati S, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk. J. Fish. Aquat. Sci., 8: 43-48.

Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D y Muzquiz JL. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. J Aquacult. Trop 19: 239-242

Balcazar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz JL, Girones O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278, 188–191.

Balta F, Sandalli C, Kayis S, Ozgumus O. 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol 30(6):211

Brown R, Wiens GD, Salinas I, 2019. Analysis of the gut and gill microbiome of resistant and susceptible lines of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Shellfish Immunol.

86:497-506

Brunt J, Austin B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, ***Oncorhynchus mykiss*** (Walbaum). J. Fish Dis 28:12.

Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B.2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis 30:10.

Bunt CR, Jones DS, Tucker IG.1993. The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. International Journal of Pharmaceutics, 99(2–3), 93–98.

Burbank D, La Patra S, Fornshell L, Cain D. 2012. Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum.* J. Fish Dis. 35: 809–816

Cabello C, Henry P, Tomova GA, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann A H. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. Envir.Micro. 15: 1917–1942.

Capkin E, Altinok I. 2008. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. J Appl Microbiol. 106(4):1147-53.

Capkin E, Ozdemir S, Ozturk RC, Altinok I. 2017.Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. Aquac Res. 48(11):5561–5575

Cha JH, Rahimnejad S, Yang SY, Kim KW, Lee KJ. 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against Streptococcus iniae and as water additives. Aquaculture 402–403, 50– 57.

Chauhan A, Singh R. 2018. Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. Symbiosis. 77 99–113.

Chen CY, Nace GW, Irwin PL. 2003. A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of ***Campylobacter jejuni***, ***Listeria monocytogenes***, and ***Escherichia coli***. J Microbiol Methods, 55(2), 475–479.

Chen SW, Liu CH, Hu SY. 2019. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Shellfish Immunol, 84, 695–703.

Chettri JK, Deshmukh S, Holten-Andersen L, Jafaar RM, Dalsgaard I, Buchmann K. 2013. Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout

against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. Vet Immunol Immunopathol. 154(1-2):42-7.

Chettri JK, Skov J, Jaafar RM, Krossøy B, Kania PW, Dalsgaard I, Buchmann K. 2015. Comparative evaluation of infection methods and environmental factors on challenge success: *Aeromonas salmonicida* infection in vaccinated rainbow trout. Fish Shellfish Immunol. 44(2):485-95.

Coman M M, Verdenelli M C, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, Cresci. 2014. A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYNBIO® against pathogens. J Appl Microbiol. 117: 518-527.

Das P, Mandal S, Khan A, Manna AK, Ghoshi K. 2014. Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. Turk J Zool. 38: 79-88

Dawood, M. A. O., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M. A., & Zaineldin, A. I. 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream, Pagrus major growth, immune response and oxidative status. Fish Shellfish Immunol, 57: 170–178.

Deshmukh S., Raida M.K., Dalsgaard I., Chettri J.K., Kania P.W., Buchmann K. 2012. Comparative protection of two different commercial vaccines against ***Yersinia ruckeri*** serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (***Oncorhynchus mykiss***). Vet Immunol Immunopathol. 145(1-2):379-85

Didinen B, Onuk EE, Metin S, Cayli O. 2018. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. Aquac. Nutr 24(1): 400-407.

Dopazo C, Lemos M, Lodeiros C, Bolinches J, Barja J, Toranzo A. 1998. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. J Appl Bacteriol 65 (2): 97-101.

Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Sahinturk P. 2017. Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. Dis Aquat Organ. 125(1):31-44.

Ewing EW, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. Int J Syst Bacteriol 28:37–44 7.

[FAO] Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Informe Técnico. Roma. 233p.

[FAO] Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación. 2019a. Acuicultura. [12 de julio 2019]. Disponible en *http://www.fao.org/aquaculture/es/ure/es/*

[FAO] Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación. 2019b. Cultured Aquatic Species Fact Sheet. Disponible en : http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_rainbowtrout.htm

[FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2014. Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. 1a ed. Lima: EINS Perú. 88 p.

Forestier C, De Champs C, Vatoux C y Joly B. 2001. Probiotic activities of Lactobacillus casei rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol 152(2): 167–173.

Founou LL, Founou RC, Essack SY. 2016. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. Front Microbiol. 7: 1881.

Fouz B, Zarza C, Amaro C. 2006. First description of non-motile Yersinia ruckeri serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J Fish Dis. 29(6): 339-346.

Gatesoupe FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180(1-2): 147–165.

Gibello A, Porrero MC, Blanco MM, Vela AI, Liébana P, Moreno MA, Fernández-Garayzábal JF, Domínguez L. 2004. Analysis of the gyrA gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. Appl. Environ. Microbiol 70: 599–602.

Gobi N, Vaseeharan B, Chen JC, Rekha R, Vijayakumar S, Anjugam M, Iswarya A. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*, Fish Shellfish Immunol. 74: 501–508.

Gupta A, Gupta P, Dhawan A. 2016. *Paenibacillus polymyxa* as a water additive improved immune response of *Cyprinus carpio* and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Reports, 4, 86–92.

Hauville MR, Zambonino-Infante JL, Gordon Bell J, Migaud H, Main KL. 2016. Effects of a mix of *Bacillus* sp. as a potential probiotic for Florida pompano, common snook and red drum larvae performances and digestive enzyme activities, Aquac. Nutr. 22:51–60.

Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. J Appl Microbiol. 119:917:935

Hill JE, Baiano JCF, Barnes AC. 2009. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from Penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. J. Fish Dis. 32, 1007–1016

Huang Y, Michael GB, Becker R, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, Runge M, Steinhagen

D. 2014. Pheno and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish.Vet Microbiol. 171(3-4):406-12.

[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2018. Anuario Científico Tecnológico IMARPE. 18: 145p.

Ina-Salwany MY, Hishammuddin H, Zulperi Z, Salema M, Karim M, Natrah FMI. 2015. Elucidating the probiotic potential of Malaysian *Paenibacillus pabuli* against *vibrio alginolyticus* in Artemia culture. Asian J Agric Res 9(5), 223–236.

Irianto A, Austin B.2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis 25:6.

Jaafar R M, Al-Jubury A, Dalsgaard I., Mohammad Karami A, Kania PW, Buchmann K. 2019. Effect of oral booster vaccination of rainbow trout against *Yersinia ruckeri* depends on type of primary immunization. Fish Shellfish Immunol.85:61-65.

Kummar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric red mouth disease in fish. Vet Res. 46(1): 103.

Kavitha M, Raja M, Perumal P. 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of freshwater fish Labeo calbasu (Hamilton, 1822). Aquaculture Reports, 11:59–69.

Kuebutornye FKA, Abarike ED, Lu Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish Shellfish Immunol, 87, 820–828.

Latorre JD, Hernandez-Velasco X, Wolfenden RE, Vicente JL, Wolfenden AD, Menconi A, Bielke LR, Hargis BM and Tellez G. 2016. Evaluation and Selection of *Bacillus* Species Based on Enzyme Production, Antimicrobial Activity, and Biofilm Synthesis as Direct-Fed Microbial Candidates for Poultry. Front. Vet. Sci. 3:95.

Lazado CC, Caipang CMA. 2014. Atlantic cod in the dynamic probiotics research 494 in aquaculture. Aquaculture 424:53-62.

Lazado CC, Caipang CMA y Kiron V. 2012. Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. Aquac. Nutr 18(4): 423–431

Liu H, Guo X, Gooneratne R, Lai R, Zeng C, Zhan F, Wang W, 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci. Report. 6.

Liu H, Wang S, Cai Y, Guo X, Cao Z, Zhang Y, Liu S, Yuan W, Zhu W, Zheng Y, Xie Z, Guo W, Zhou Y. 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances

growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fish Shellfish Immunol. 60 (2017) 326–333.

Ma CW, Cho YS, Oh KH. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. Aquaculture 287(3-4): 266– 270.

Marana M, Sepúlveda D, Chen D, Al-Juburi A, Jaffar R, Kania PW, Henriksen NH, Krossøy B, Dalsgaard I, Lorenzen N, Buchmann K. 2019. A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. Fish Shellfish Inmunol. 88: 344-351.

Meidong R, Khotchanalekha K, Doolgindachbaporn S, Nagasawa T, Nakao M, Sakai K, Tongpim S. 2018. Evaluation of probiotic *Bacillus aerius* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Plamong *Pangasius bocourti*, Fish Shellfish Immunol. 73:1–10.

Méndez J, Guijarro JA.2013. In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression. Environ. Microbiol. Rep. 5, 179–185.

Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøgwald J, Castex M, Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture. 302: 1–18

Midhun SJ, Neethu S, Vysakh A, Arun D, Radhakrishnan EK, Jyothis M. 2017. Antibacterial activity and probiotic characterization of autochthonous Paenibacillus *polymyxa* isolated from *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). Microb Pathog 113: 403–411.

Mingmongkolchai S, Panbangred W. 2018. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. J App Microbiology 124(6), 1334–1346.

Mondal S, Roy T, Ray AK. 2010. Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata*. J. World Aquacult. Soc. 41: 369–376

Moriarty DJW. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151(1-4): 333-349.

Newaj-Fyzul A, Adesiyun AA, Mutani A, Ramsubhag A, Brunt J, Austin B. 2007. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Appl Microbiol. 103(5):1699-706.

Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G. Salminen S. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture 198: 229–236.

Ormsby MJ, Caws T, Burchmore R, Wallis T, Verner-Jeffreys DW, Davies RL. 2016. *Yersinia ruckeri* isolates recovered from diseased Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Scotland are more diverse than those from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and represent distinct subpopulations. Appl Environ Microbiol 82:5785–5794

Orozova P, Sirakov I, Austin DA, Austin B. 2018. Recovery of *Bacillus mycoides, B. pseudomycoides* and *Aeromonas hydrophila* from common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with gill disease. J. Fish Dis, 41(1), 125–129.

Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen S. 1999. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. Int. Dairy J. 9, 623–630.

Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyam K, Manikkam S, Sadayappan B. 2013. Probiotics in aquaculture. Drug Invent Today 5:55-59.

Pérez-Sánchez T, Mora-Sánchez B, Balcázar JL. 2018. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. Trends Microbiol 26(11):896–903.

Picchietti S, Fausto AM, Randelli E, Carnevali O, Taddei AR, Buonocore F, Scapigliati G, Abelli L. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbruekii* strain induces an increase in intestinal Tcells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). Fish Shellfish Immunol 26 (3): 368-376.

Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Megraud F y Urdaci MC. 2001. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 45(11): 3156–3161.

[PRODUCE] Ministerio de la Producción – Perú. 2017. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2017 – La actividad productiva del sector en números. Recuperado de http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf

[PRODUCE] Ministerio de la Producción – Perú. (10 de octubre del 2019). PRODUCE: Producción del sector acuícola crecerá 6,8% durante el 2019. [Nota de prensa]. Recuperado de https://www.gob.pe/institucion/produce/noticias/26022-produce-produccion-del-sector-acuicola-crecera-6-8-durante-el-2019

Raida M.K, Nylén J, Holten-Andersen L, Buchmann K. 2011. Association between Plasma Antibody Response and Protection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Immersion Vaccinated against *Yersinia ruckeri*. PLoS ONE 6(6): e18832.

Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K J. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). J Fish Dis. 26(8):495-8.

Ramos MA, Gonçalves JFM, Costas B, Batista S, Lochmann R, Pires MA, Rodrigo PR, Ozório OA. 2017. Commercial *Bacillus* probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. Aquacult. Res. 48:2538–2549

Ravi AV, Musthafa KS, Jegathammbal G, Kathiresan K, Pandian SK. 2007. Screening and

evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic Vibrios in marine aquaculture. Lett Appl Microbiol 45(2), 219–223.

Ray AK, Ghosh K, Ringø E. 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review, Aquac. Nutr. 18.

Ray AK, Roy T, Mondal S, Ringø E. 2010. Identification of gut-associated amylase, cellulase, and protease-producing bacteria in three species of Indian major carps. Aquacult. Res. 41, 1462–1469.

Ringø, E, Birkbeck, TH. 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquacult. Res. 30:73-93.

Ringø, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160: 177–203

Rodgers CJ.2001. Resistance of ***Yersinia ruckeri*** to antimicrobial agents in vitro. Aquaculture. 196:325–345.

Romalde JL, Toranzo AE.1993. Pathological activities of ***Yersinia ruckeri***, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett 112:291–300

Rühs PA, Böcker L, Inglis RF, Fischer P. 2014. Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid-liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. Colloids Surf B: Biointerfaces, 117, 174–184.

Ryckaert J, Bossier P, D'herde K, Diez-Fraile A, Sorgeloos P, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010. Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. Fish Shellfish Immunol 29: 648-655.

Saini G, Nasholm N, Wood BD. 2011. Implications of growth and starvation conditions in bacterial adhesion and transport. J Adhes Sci Technol 25(17): 2281–2297

Salah MA, Aqel A. 2014. Antimicrobials Use in Aquaculture and their Public Health. Impact J Aquac Res Development 5:4

Selim KM, Reda RM. 2015. Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*, Fish Shellfish Immunol. 44:496–503.

Servin AL, Coconnier MH. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract Res Clin Gastroenterol 17(5): 741–754

Sierra G.1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek 23(1): 15-22.

Sun YZ, Yang HL, Ma RL, Lin WY. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*, Fish Shellfish Immunol. 29:803–809.

Suzer C, Coban D, Kamaci HO, Saka S, Firat K, Otgucuoglu O, Kucuksari H. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata,* L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture 280, 140–145.

Thy HTT, Tri NN, Quy OM, Fotedar R, Kannika K, Unajak S, Areechon N.2017. Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), Fish Shellfish Immunol. 60(1): 391–399.

Tinsley J, Lyndon A, Austin B. 2011. Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J App Microbiology 111: 8-16.

Tkachenko H, Grudniewska J, Pêkala A, PaŸdzior E. 2016. Effects of vaccination against *Yersinia ruckeri* on oxidative stress biomarkers and liver and heart biochemistry in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Arch. Pol. Fish. 24: 33-46

Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K.2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis 30:257–268

Tobback E, Decostere A, Hermans K, Ryckaert J, Duchateau L, Haesebrouck F, Chiers K.2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss.* Dis Aquat Org 84:219–228.

Tobback E, Hermans K, Decostere A, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010. Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout ***Oncorhynchus mykiss***. Dis Aquat Organ, 90, 175-9.

Van Doan H, Hoseinifar SH, Khanongnuch C, Kanpiengjai A, Unban K, Van Kim V, Srichaiyo S. 2018. Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture.491:94–100

Van Doan H, Hoseinifar SH, Ringø E, Ángeles Esteban M, Dadar M, Dawood MAO, Faggio C. 2019. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 1–27.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev 64: 655–671.

Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 30, 404-427.

Vine NG, Leutes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J y Hecht T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal

mucus. J Fish Dis 27(6): 319-326.

Wong S, Waldrop T, Summerfelt S, Davidson J, Barrows F, Kenney PB, Welch T, Wiens Gregory D, Snekvik K, Rawls JF, Good C. 2013. Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. USDA-ARS / UNL Faculty. Paper 1229. Disponible en: http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/1229

Yi Y, Zhang Z, Zhao F, Liu H, Yu L, Zha J, Wang G. 2018. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*, Fish Shellfish Immunol. 78: 322–330.

Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR, Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, 252(2-4): 516-524.

Zhou, M Y, Chen X L, Zhao H L, Dang H Y, Luan X W, Zhang X Y, He H L, Zhou BC, Zhang Y Z. 2009. Diversity of Both the Cultivable Protease-Producing Bacteria and Their Extracellular Proteases in the Sediments of the South China Sea. Microbial Ecology, 58(3), 582–590.

Zhou X, Wang Y, Gu Q y Li W. 2010. Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. Poult Sci 89(3):588–593.

Zidour M, Chevalier M, Belguesmia Y, Cudennec B, Grard T, Drider D, Souissi S, Flahaut C. 2017. Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and Other Pathogenic Strains. Front. Microbiol. 8:1919.