

Aislamiento de bacterias nativas de *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri*

Isolation of native *Oncorhynchus mykiss* bacteria with probiotic potential against *Yersinia ruckeri*

Wilson Quispe G.^{1,5}, Belisario Mantilla M.¹, Alberto Ccama S.²,
Yessica Ortega A.³, Nieves Sandoval C.⁴

RESUMEN

El objetivo del estudio fue identificar bacterias nativas aisladas del tracto intestinal de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con propiedades probióticas frente a *Yersinia ruckeri*. Se utilizaron 48 truchas sanas provenientes de la eclosería de la Universidad Nacional del Altiplano (Puno, Perú). El tracto intestinal de los alevines y juveniles fue extraído y se tomaron muestras de la mucosa intestinal. Las muestras fueron sembradas en agar MRS e incubadas a 30 °C por 24-48 h. Las colonias fueron identificadas por su morfología y se evaluó su efecto inhibitorio *in vitro* frente a una cepa de *Yersinia ruckeri*, aislada de un brote de alta mortalidad. Se identificaron tres aislados compatibles con el género *Lactobacillus* y un aislado compatible con el género *Bacillus*. Estos aislados mostraron halos de inhibición mayores a 9 mm de diámetro frente a *Y. ruckeri*.

Palabras clave: bacteria resistente, mortalidad, producción, sistema inmune, trucha

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

² Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

³ Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

⁴ Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁵ E-mail: w.reinaldo.qg@gmail.com

Este artículo es derivado de la tesis «Aislamiento de *Lactobacillus* sp de «trucha arco iris» *Oncorhynchus mykiss* con potencial probiótico frente a *Yersinia ruckeri* en Puno» del Bach. Wilson Reinaldo Quispe Gallegos para optar el título de Licenciado en Biología en la Universidad Nacional del Altiplano.

Recibido: 24 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 18 de septiembre de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to identify native bacteria isolated from the intestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with probiotic properties against *Yersinia ruckeri*. In the study, 48 healthy trout from the hatchery of the Universidad Nacional del Altiplano (Puno, Peru) were used. The intestinal tract of the fry and juveniles was removed, and samples were taken from the intestinal mucosa. The samples were cultured on MRS agar and incubated at 30 °C for 24-48 h. The colonies were identified by their morphology and their inhibitory effect was evaluated *in vitro* against a *Yersinia ruckeri* strain isolated from a high mortality outbreak. Three isolates compatible with the genus *Lactobacillus* and one isolate compatible with the genus *Bacillus* were identified. These isolates showed inhibition halos greater than 9 mm in diameter against *Y. ruckeri*.

Key words: resistant bacteria, mortality, production, immune system, trout

INTRODUCCIÓN

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la principal especie dulceacuícola cultivada en el Perú, especialmente en Puno, Huancavelica y Junín (PRODUCE, 2017). La trucha es más susceptible a presentar enfermedades y alta mortalidad en los primeros estadios; es decir, en la etapa de alevinaje. Entre los patógenos más comunes se encuentra la bacteria *Yersinia ruckeri* (Flores, 2013). Esta es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Afecta principalmente a salmónidos, siendo la especie más susceptible la trucha. Además, genera elevadas tasas de mortalidad, con más del 50% en muchos países, causando importantes pérdidas económicas en las granjas piscícolas (Flores, 2013).

Para el control de la yersiniosis se han usado diversos antibióticos, como oxitetraciclina, sulfadiazina en combinación con trimetropim, florfenicol, ácido oxolínico, flumequina y amoxicilina (Flores, 2013; Kumar *et al.*, 2015). Dado el limitado espectro de antibióticos aprobados para uso en acuicultura, estos han ido generando resistencia a estos fármacos (Pandiyan *et al.*,

2013). Por otro lado, en el Perú no existen vacunas comerciales disponibles, lo cual complica el control de este agente (Fernández, 2011; Bueno, 2012). Sin embargo, Cueva *et al.* (2016) desarrollaron en el país una vacuna experimental elaborada con aislados de *Y. ruckeri*, la cual ha tenido buenos resultados *in vitro*.

Dentro de este contexto, existen otras alternativas viables, tales como los probióticos; dado que el suministro de una dieta enriquecida con microorganismos probióticos proporciona una mejora del sistema inmune, asimilación de nutrientes y el desarrollo normal del pez, evitando infecciones bacterianas (Walter, 2012; Berdasco, 2016). Más aún, las bacterias benéficas extraídas del tracto digestivo de los peces tienen mayor facilidad de colonizar el tracto digestivo del hospedador (Henríquez, 2013; Muñoz, 2015).

Diversos estudios resaltan el uso de probióticos con un efecto antagónico frente a *Y. ruckeri* y otras bacterias que afectan el cultivo de trucha, tales como *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, y *Bacillus* spp (Balcázar *et al.*, 2009; Burbank *et al.*, 2012, Palíková *et al.*, 2015). En el Perú son escasos los estudios sobre la microflora bacteriana

de la trucha arcoíris o de aquellas con potencial benéfico frente a bacterias patógenas. Debido a esto, el objetivo de este estudio fue identificar bacterias nativas aisladas del tracto intestinal de trucha arcoíris con propiedades probióticas frente a *Yersinia ruckeri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Estudio

El estudio fue de tipo transversal. Los peces fueron donados por el Centro de Producción de Bienes y Servicios (CIPBS) de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA), ubicado en el distrito de Chucuito, Puno, Perú, a una altitud de 3931 msnm. El procesamiento y toma de muestras, el análisis bacteriológico, la preparación de diluciones y el desafío *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNA.

Peces

Se seleccionaron 48 truchas de estadios alevín y juvenil, aparentemente en buen estado de salud, con pesos promedio de 4 y 90 g y tallas promedio de 6 y 18.5 cm, respectivamente, provenientes del CIPBS. Los peces fueron trasladados al laboratorio, donde fueron anestesiados con eugenol (40-60 ppm) (Keeme *et al.*, 1998). La eutanasia se realizó mediante el corte medular con un bisturí, entre el cerebro y la médula espinal (Rosenthal, 2013). Se hizo la apertura por el lado izquierdo de los especímenes, a partir de la línea lateral y el poro anal; de acuerdo con lo descrito por Ferguson (2006).

Aislamiento e Identificación de Colonias

Se hizo un corte del intestino delgado, entre la porción media y la porción posterior, se hizo un raspado de la mucosa del intestino con un ansa estéril y se procedió al sembrado por agotamiento en placa Petri con agar

MRS (Man Rogosa Sharpe), e incubación a 28-30 °C durante 24-48 horas. Transcurrido el tiempo, se procedió a la observación macroscópica de las placas Petri y se seleccionaron las colonias con características de *Lactobacillus* (colonias pequeñas, blanquecinas cremosas) y *Bacillus* (colonias rizoides cremosas e irregulares).

Se hicieron tinciones Gram para determinar la morfología de las cepas con el apoyo de un microscopio de luz óptica (Leica ICC50 HD). Se seleccionaron las colonias Gram positivas de forma bacilar que eran compatibles con bacterias del género *Lactobacillus* y del género *Bacillus*. Estas cepas fueron sembradas e incubadas nuevamente a 28-30 °C durante 24-48 horas para purificar las colonias.

Efecto Inhibitorio frente a *Y. ruckeri*

La cepa patrón fue aislada de un brote de mortalidad en el Lago Titicaca, Perú, por el Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima y confirmada molecularmente por PCR. Para este estudio, la cepa fue reactivada y sembrada en agar tripticasa soya (TSA) y trasladada en menos de 24 h al laboratorio de la FMVZ-UNA.

Cada colonia aislada fue incubada a 28-30 °C en tubos de ensayo conteniendo caldo MRS durante 24-48 horas y se procedió a realizar diluciones seriadas. Posteriormente, los ocho tubos de cada colonia fueron sembradas en placas Petri conteniendo Agar Plate Count e incubadas a 28-30 °C durante 24-48 horas, para luego realizar el conteo macroscópico de las colonias. Se seleccionaron las placas que contenían 25-50 colonias. Se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 1×10^7 UFC. En forma similar, la cepa de *Y. ruckeri* fue diluida para llegar a la misma concentración, tomando como referencia lo descrito por De Souza *et al.* (2010).

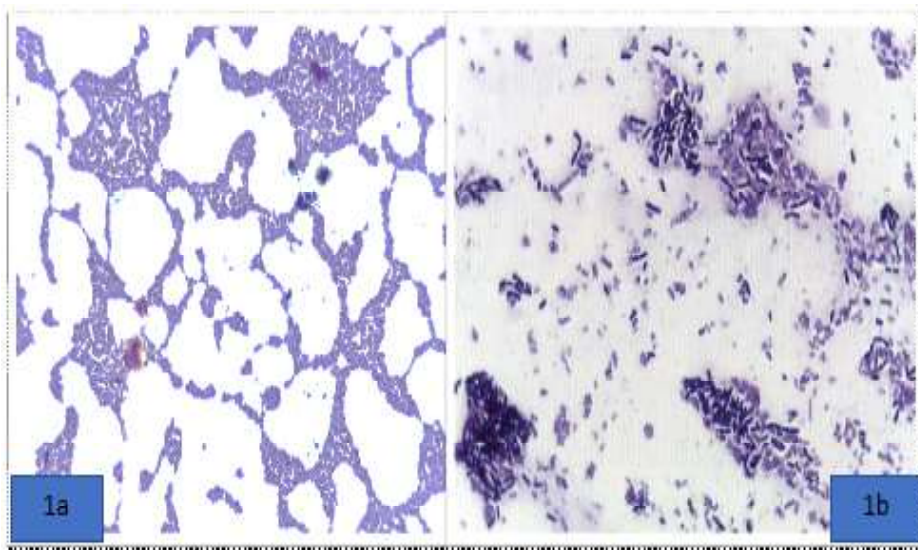


Figura 1. Colonias de bacterias aisladas del intestino delgado de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). 1a: *Lactobacillus* sp. 1b: *Bacillus* sp. Tinción Gram. 1000X

Los aislados identificados y caracterizados como *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp fueron sembrados en agar MRS e incubados a 28-30 °C durante 24-48 horas. Luego, utilizando un tubo de ensayo estéril se obtuvieron y retiraron discos de 9 mm de diámetro con agar MRS. Los discos fueron sobrepuestos en el medio de cultivo de agar McConkey sembrado con la cepa de *Y. ruckeri* (1×10^7 UFC) e incubados a 28-30 °C durante 24-48 horas, tomando como referencia a De Souza *et al.* (2010). Se realizaron tres repeticiones por cada bacteria aislada. Se consideraron como resultados inhibitorios aquellos discos que presentaron formaciones de halos mayores a 9 mm de diámetro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio, las muestras fueron tomadas de estanques en un centro de cultivo, cuya fuente de agua proviene de un manantial y los peces son alimentados con una dieta comercial. De los 48 peces se pudo ais-

lar cuatro bacterias ácido-lácticas (8.4%) de la porción del intestino medio posterior. De los aislados, tres fueron del género *Lactobacillus* y uno del género *Bacillus* (Figura 1)., Pond *et al.* (2006) describieron que la microbiota intestinal de la trucha arcoíris está compuesta principalmente por bacterias de los géneros *Clostridium* y *Aeromonas*. No obstante, es importante resaltar que, la composición microbiana del tracto intestinal de los peces depende principalmente de su ambiente y la composición bioquímica de su dieta (Wittwer, 2012).

Los resultados obtenidos son congruentes con el trabajo de Muthukumar y Kandeepan (2015), quienes encontraron dos aislados de *Bacillus* spp, dos de *Lactobacillus* spp y uno de *Macrocooccus* spp en peces de agua dulce, con alto potencial para adherirse a la mucosa intestinal y de inhibir el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*. Asimismo, Balcázar *et al.* (2007) y Wittwer (2012) aislaron principalmente bacterias ácido-lácticas (*Lactobacillus*) del tracto

Cuadro 1. Halos de inhibición de *Bacillus* sp y *Lactobacillus* spp (tres repeticiones) frente a *Yersinia ruckeri*

Aislados	Halos de inhibición (mm)			Prom.
	1	2	3	
<i>Lactobacillus</i> sp	19	20	20	19.7
	17	19	18	18.0
	18	17	19	18.0
<i>Bacillus</i> sp	15	13	17	15.0

gastrointestinal de salmónidos, mientras que Henríquez (2013) logró aislar *Lactobacillus* spp y *Bacillus* spp en heces de salmón.

En el Cuadro 1 se observan los resultados de los halos de inhibición frente a *Y. ruckeri*, donde se considera que halos mayores a 9 mm de diámetro indican que existe inhibición del patógeno. Las cepas del género *Lactobacillus* son las que presentaron los mayores halos de inhibición, probablemente debido a que las bacterias ácido-lácticas (BAL) tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), H₂O₂ y, en algunos casos, bacteriocinas (Maji *et al.*, 2016).

Por otro lado, las bacterias *Bacillus* poseen capacidades de adhesión e inmunestimulación, y son capaces de producir péptidos antibióticos, aminoácidos, vitaminas K y B₁₂ y enzimas (Bagheri *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2014). En este sentido, Bagheri *et al.* (2008) y Adineh *et al.* (2013) reportaron que la suplementación con un probiótico comercial a base de *Bacillus* es beneficioso sobre el crecimiento y sobrevivencia en alevines de trucha, pues estimula la maduración del sistema digestivo.

Diversos estudios han señalado los efectos benéficos de administrar probióticos, como las bacterias aisladas en este estudio, para cultivo de peces (Jöborn *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2000; Vásquez *et al.*, 2005). Así mismo, Abbass (2010), Henríquez (2013) y Maji *et al.* (2016) señalaron que existe un consenso general sobre el beneficio de utilizar probióticos nativos extraídos de peces, dado que estos microorganismos se adhieren fácilmente a la pared intestinal y compiten con los microorganismos patógenos.

CONCLUSIONES

- Se aislaron bacterias nativas de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus* del tracto intestinal de alevines y juveniles de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*.
- Los aislados de *Lactobacillus* sp y *Bacillus* sp mostraron inhibición *in vitro* frente a *Yersinia ruckeri*.

LITERATURA CITADA

1. **Abbass A, Sharifuzzaman SM, Austin B. 2010.** Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 33: 31-37. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01086.x
2. **Adineh H, Jafaryan H, Sahandi J, Alizadeh M. 2013.** Effect of *Bacillus* spp probiotic on growth and feeding performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Bulg J Vet Med 16: 29-36.
3. **Bagheri T, Hedayati S, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A. 2008.** Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. Turk J Fish Aquat Sci 8: 43-48.

4. **Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Gironés O, Múzquiz L. 2007.** Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp Immunol Microb* 30: 111-118. doi: 10.1016/j.cimid.2006.12.001
5. **Berdasco HM. 2016.** Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas productoras de bacteriocinas de origen marino para su uso en acuicultura. Tesis de Biólogo. Asturias, España: Univ. de Oviedo. 40 p.
6. **Bueno, HC. 2012.** Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss*, del centro piscícola «El Ingenio» – Huancayo. Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos, 86 p.
7. **Burbank DR, LaPatra SE, Fornshell G, Cain KD. 2012.** Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 35: 809-816. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01432.x
8. **Cueva V, Vargas M, Mesías F, Junis J, Manchego A, Sandoval N. 2016.** Role of melano-macrophages in experimental vaccine-induced immunity against *Yersinia ruckeri* in *Oncorhynchus mykiss*. En: World Aquaculture Meeting. Lima.
9. **De Souza RM, Moruño JL, Vieira F, Buglione CC, Andreatta ER, Seiffert WC, Cerqueira VR. 2010.** Selection of potential probiotic bacteria to use in fat snook (*Centropomus parallelus* poey, 1860) culture. *Bol Inst Pesca, Sao Paulo* 36(1): 17-24.
10. **Ferguson H. 2006.** Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. 2nd ed. Scotian Press. 367 p.
11. **Fernández C. 2011.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y sus características lesionales anatomo-histopatológicas en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss* en etapa precomercial en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 69 p.
12. **Flores K. 2013.** Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 66 p.
13. **Gisbert E, Castillo M, Skalli A, Andree KB, Badiola I. 2014.** *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *J Anim Sci* 91: 2766-2774. doi: 10.2527/jas.2012-5414
14. **Henríquez CP. 2013.** Caracterización de propiedades probióticas de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos. Tesis de Magíster. Santiago de Chile: Univ. de Chile. 43 p.
15. **Jöborn A, Olsson JC, Westerdahl A, Conway LP, Kjelleberg S. 1997.** Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp strain K1. *J Fish Dis* 20: 383-392. doi: 10.1046/j.1365-2761.-1997.00316.x
16. **Keeme JL, Noakes D L, Moccia RD, Soto CG. 1998.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 29: 89-101. doi: 10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x
17. **Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet Res* 46: 103. doi: 10.1186/s13567-015-0238-4

18. **Maji U, Mohanty S, Mahapatra A, Maiti N. 2016.** Diversity and probiotic potentials of putative lactic acid bacteria for application in freshwater aquaculture. *Turk J Fish Aquat Sci* 16: 805-818. doi: 10.4194/1303-2712-v16_4_07
19. **Muñoz E. 2015.** Caracterización y evaluación in vitro e in vivo de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L). Tesis Doctoral. Madrid: Univ. Complutense de Madrid. 355 p.
20. **Muthukumar P, Kandeepan C. 2015.** Isolation, identification and characterization of probiotic organisms from intestine of fresh water fishes. *Inter J Cur Microbiol App Sci* 4: 607-616.
21. **Palikova M, Navratil S, Navratil L, Mareš J. 2015.** Preventive and prophylactic measures in intensive salmonid fish breeding – a review. *Acta Univ Agric Fac Agron* 63: 1409-1416. doi: 10.11118/actaun201563041409
22. **Pandiyan P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyan K, Manikkam S, Sadayappan B 2013.** Probiotics in aquaculture (review). *Drug Invent Today* 5: 55-59.
23. **Pond MJ, Stone DM, Alderman DJ. 2006.** Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261: 194-203. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.037
24. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2018.** Anuario estadístico pesquero y acuícola. Lima, Perú: PRODUCE. 200 p.
25. **Robertson PA, Dowd CO, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000.** Use of *Carnobacterium* sp as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00349-X
26. **Rosenthal S, Sandoval N, Gavidia C, Tabacchi L. 2013.** Frecuencia de lipidosis hepática en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 24: 118-124. doi: 10.15381/rivep.v24i1.1675
27. **Vásquez JA, González MP, Murado MA. 2005.** Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245: 149-161. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.12.008
28. **Walter C. 2012.** Molecular studies on the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Tesis PhD Thesis. Scotland: Heriot Watt University. 209 p.
29. **Wittwer G. 2012.** Caracterización bacteriana de intestino de salmón del atlántico adulto. Tesis de Licenciado en Bioquímica. Valdivia: Univ. Austral de Chile. 94 p.