



UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS



Caracterización de Propiedades Probióticas de
Microorganismos del Tracto Digestivo de Salmónidos.

Tesis para optar al grado de Magíster en Nutrición y Alimentos, mención
Alimentos Saludables.

Claudia Patricia Henríquez Parada

Director de Tesis

Dr. Jaime Romero Ormazábal

Santiago de Chile

Diciembre 2013

Comisión de Tesis

Sr. Jaime Romero O. – Tutor, Profesor INTA, Universidad de Chile

Sr. Guillermo Figueroa G. – Profesor INTA, Universidad de Chile

Sr. Martín Gotteland – Profesor INTA, Universidad de Chile

Sr. Nelson Díaz – Profesor Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile

Fecha de Examen de Grado: 9 de Diciembre de 2013

Calificación Final: _____

Dedicatoria

A Fernandita, Javier, mis padres, Mario y mis hermanas, que con todo su amor y paciencia han contribuido a mi crecimiento...

Agradecimientos

A todos quienes han facilitado este proceso, en especial a mi profesor guía, Jaime Romero, quién me ha apoyado en todo momento, y es el responsable del financiamiento de este proyecto. Además a todos con quienes trabajé en el laboratorio de Biotecnología, ya que aportaron con su experiencia y amistad.

Financiamiento

Este proyecto fue financiado por el Proyecto Fondecyt 1110253 e INNOVA 11IDL2-10298. Su investigador responsable es el profesor Dr. Jaime Romero Ormazábal.

ÍNDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
METODOLOGÍA	20
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXOS	43

RESUMEN

En los últimos años Chile se convirtió en una de las potencias productoras de salmón en el mundo. Desafortunadamente, las deficiencias en los manejos sanitarios permitieron que el virus ISA se expandiera entre los centros de cultivos, causando grandes pérdidas en la producción. Esto sumado al encarecimiento de los insumos de los alimentos para salmónidos, ha dado pie para que la condición sanitaria y nutricional de los peces sea una preocupación permanente de la industria. Esta situación ha generado interés por realizar investigaciones con microorganismos probióticos que permitan otorgar beneficios como proteger al pez de ataques de patógenos y ayudar en la digestión de ingredientes vegetales incorporados en la dieta. Por esta razón, el objetivo de este trabajo, fue caracterizar y seleccionar microorganismos que pudiesen otorgar protección a los peces.

Con esta finalidad, se aislaron cepas microbianas desde el tracto intestinal de salmónidos. Estas fueron identificadas y seleccionadas, dando preferencia a grupos de bacterias ácido lácticas y levaduras. Estos aislados fueron evaluados en propiedades como: inocuidad, inhibición de patógenos y persistencia en tracto digestivo. En base a estos factores se escogieron los “mejores” candidatos a probióticos, los cuales fueron puestos a prueba en un ensayo de desafío “*in vivo*” para evaluar la protección que logran en salmones que enfrentados al patógeno *Flavobacterium psychrophilum*.

Los cuatro microorganismos seleccionados en este trabajo, mostraron resultados exitosos para protección ante una infección inducida y violenta de *Flavobacterium psychrophilum*, aumentando significativamente la sobrevivencia de los peces infectados.

SUMMARY

In recent years, Chile became one of the salmon producing leaders in the world. Unfortunately, poor sanitary handling allowed the ISA virus spread among aquacultures centers, causing huge production losses. This situation, together with the rise in costs of food supplies for salmonids, has converted fishes' health and nutritional status in an ongoing concern for the industry. This condition has generated interest in conducting research with probiotic microorganisms that confer protection against fish pathogen attacks and help in the digestion of plant ingredients used in their diet. Therefore, the aim of this work was to characterize and select microorganisms that may provide protection to the fish.

For this purpose, microbial strains were isolated from the intestinal tract of salmonids. These microorganisms were identified and selected, with preference given to groups of lactic acid bacteria and yeasts. These isolated strains were evaluated in properties as: safety, pathogen inhibition and persistence in the digestive tract. Based on these factors the "best" probiotic candidates were chosen and tested in a trial of defiance "*in vivo*" to assess the protection achieved in facing the salmon pathogen *Flavobacterium psychrophilum*.

The four selected microorganisms in this work showed successful results as protection against an infection induced by *Flavobacterium psychrophilum*, increasing significantly the survival of infected fishes.

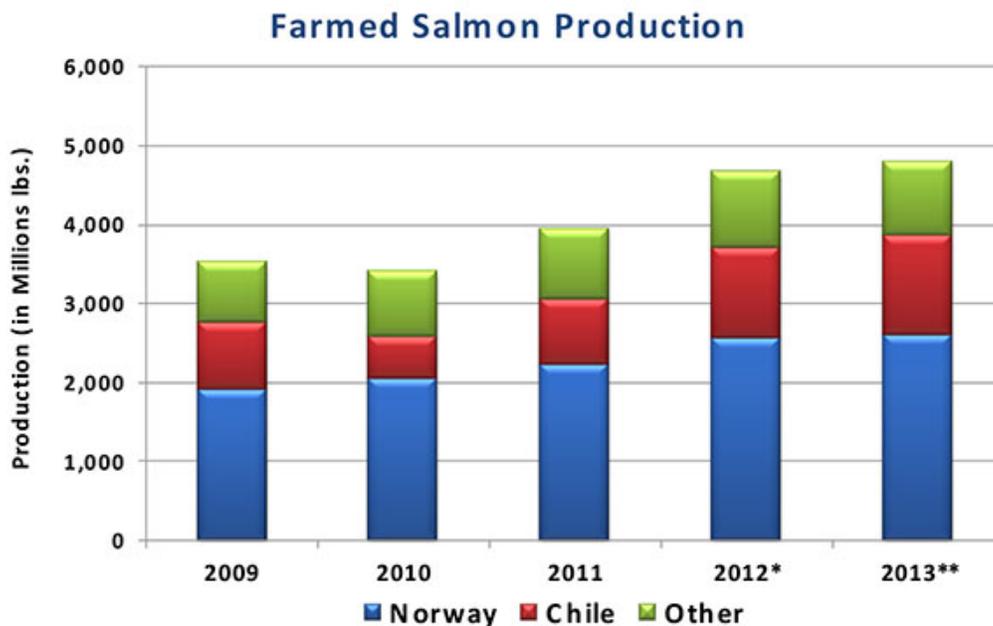
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Producción de salmónidos en Chile y el mundo

En los últimos años, Chile se convirtió en uno de los mayores productores de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) en el mundo (gráfico 1)[1, 2], sin embargo, la crisis que causó la introducción del virus ISA en los cultivos en el año 2007 [3], hizo que la producción de la industria salmonera cayera abruptamente durante los siguientes años.

Chile ha recuperado parte del terreno perdido tras la crisis sanitaria, en 2010 las exportaciones de Salmon atlántico alcanzaron un poco más de 100.000 ton, y ya en 2012, se logró llegar a 232.700 ton (gráfico 2). La perspectiva es que en el mediano plazo pueda sobreponerse a las consecuencias de ISAv y las crisis internacionales [1, 4].

Gráfico 1 – Producción mundial de salmón

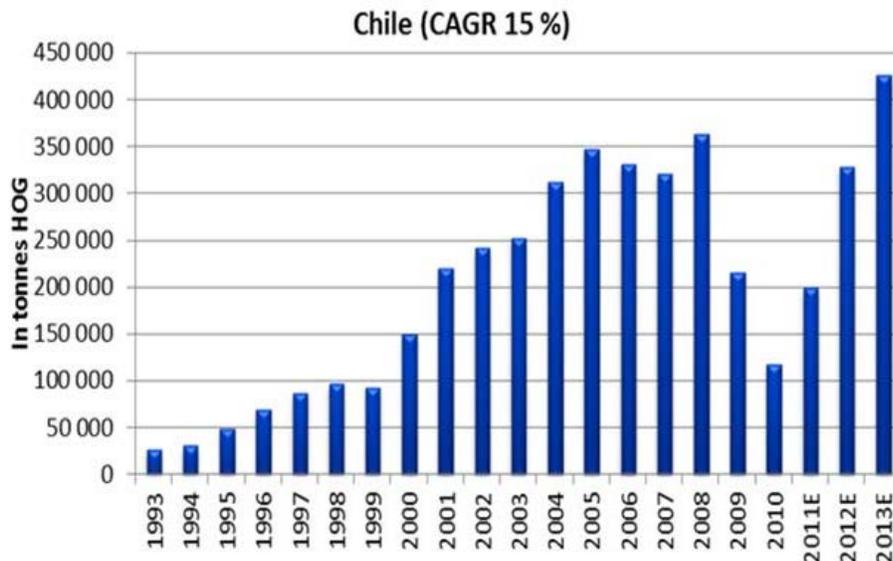


* Data for 2012 comes from preliminary sources.

** Data for 2013 represents forecasts.

Sources: FAO, Marine Harvest, and Groundfish Forum.

Gráfico 2 – Producción de Salmón Atlántico en Chile



Problemas o limitantes dentro de la acuicultura de salmónidos

Uno de los principales inconvenientes o problemas que presenta la acuicultura de salmónidos son las enfermedades infecto-contagiosas. En Chile, SERNAPESCA realiza un seguimiento a la prevalencia de enfermedades de alto riesgo en centros de cultivo, y se puede determinar que las enfermedades infecto-contagiosas con mayor número de diagnósticos reportados han sido, el Síndrome Rickettsial del Salmón (SRS), seguido de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) y Flavobacteriosis. Considerando los sitios de cultivo en centros de agua dulce (pisciculturas, ríos, lagos), se observa que durante el año 2012 el virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), destaca con un 33,9% de los diagnósticos, seguidos por *Flavobacterium psychrophilum* y *Flavobacterium sp*, causantes de la flavobacteriosis con un 19,9% y 17,1% de los diagnósticos, señalando que flavobacteriosis sería la enfermedad bacteriana más prevalente en cultivos de agua dulce (Tabla 1) [5].

Tabla 1 – Vigilancia pasiva de Enfermedades de Alto Riesgo (EAR) en centros de mar y agua dulce, 2012

AGENTE PATÓGENO	ESPECIES			
	S. DEL ATLÁNTICO	T. ARCOÍRIS	S. COHO	S. REY
MAR	Nº de DIAGNÓSTICOS			
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	621	269	145	3
IPNv	291	25	18	0
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	98	15	72	3
Otros	174	142	30	0
AGUA DULCE	Nº de DIAGNÓSTICOS			
IPNv	502	277	42	0
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	154	319	5	0
<i>Flavobacterium sp</i>	138	257	18	0
Otros	453	198	27	5

Flavobacterium

Flavobacterium psychrophilum es una bacteria gram negativa, psicrófila, causante enfermedades en peces a nivel mundial. Principalmente afecta a la mayoría de los salmónidos [6]. En Chile se ha observado desde 1993 que es capaz de infectar a los salmónidos de cultivo en agua dulce, ocasionando enfermedad ulcerativa: flavobacteriosis.

Hasta la fecha, *F. psychrophilum* es una de las infecciones bacterianas más amenazantes y que causan importantes pérdidas económicas a los productores de la acuicultura chilena de muchas especies de valor comercial (*Salmo salar*, *Oncorhynchus*

mykiss y *O. kisutch*) debido a la alta mortalidad de huevos, alevines, y/o reproductores [7]. En Chile, el tratamiento más utilizado para las úlceras externas es baño con oxitetraciclina. Para el tratamiento interno de la infección lo más efectivo es la utilización de florfenicol en forma oral[7]. Y últimamente, estos tratamientos están siendo desplazados por el uso de ácido oxolínico [8]

Uso de antibióticos en acuicultura

El explosivo aumento en la producción de salmónidos en Chile, sumado a las enfermedades recurrentes dentro de los centros de cultivo ha fomentado en la industria acuícola el uso incontrolado de antibióticos. Éstos se utilizarían principalmente para combatir las enfermedades bacterianas en peces [9]. Comparando el uso de antibióticos de los principales productores de salmón, durante los años 2007 y 2008, Chile habría utilizado 385,6 y 325,6 TM respectivamente, para producir alrededor de 400.000 TM de salmónidos, a diferencia de Noruega que en los mismos años utilizó menos de 1 TM para producir 820.000 TM de salmón [10, 11].

Tabla 2 – Cantidad de antimicrobianos (Ton), consumo (%) de antimicrobianos y biomasa promedio mensual (mil ton), durante período 2007 - 20012

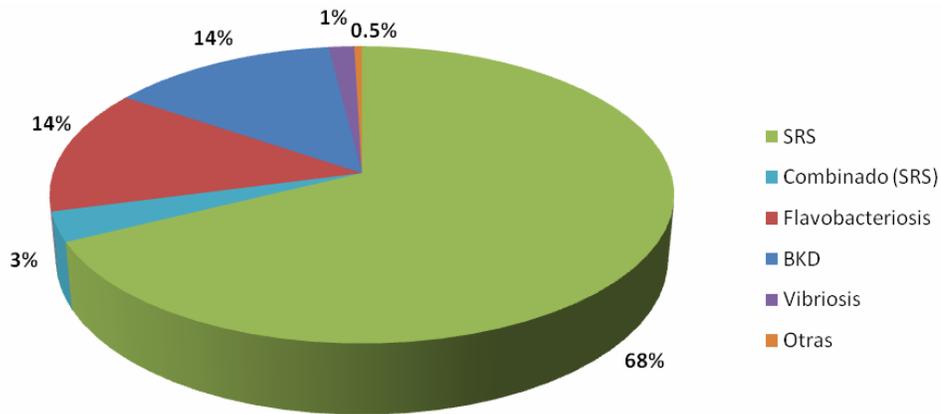
<i>Año</i>	<i>Cantidad (ton)</i>	<i>Biomasa promedio mensual (mil ton)</i>	<i>Consumo (%) *</i>
<i>2007</i>	<i>385,63</i>	<i>426</i>	<i>0,064</i>
<i>2008</i>	<i>325,62</i>	<i>468</i>	<i>0,051</i>
<i>2009</i>	<i>184,47</i>	<i>232</i>	<i>0,039</i>
<i>2010</i>	<i>143,17</i>	<i>256</i>	<i>0,031</i>
<i>2011</i>	<i>206,8</i>	<i>391</i>	<i>0,032</i>
<i>2012</i>	<i>337,99</i>	<i>515</i>	<i>0,041 **</i>

**Consumo calculado en relación a las toneladas cosechadas de especies salmónidas (Anuario estadístico de Pesca 2007-2011).*

***Calculado en base a datos preliminares de cosechas de especies salmónidas.*

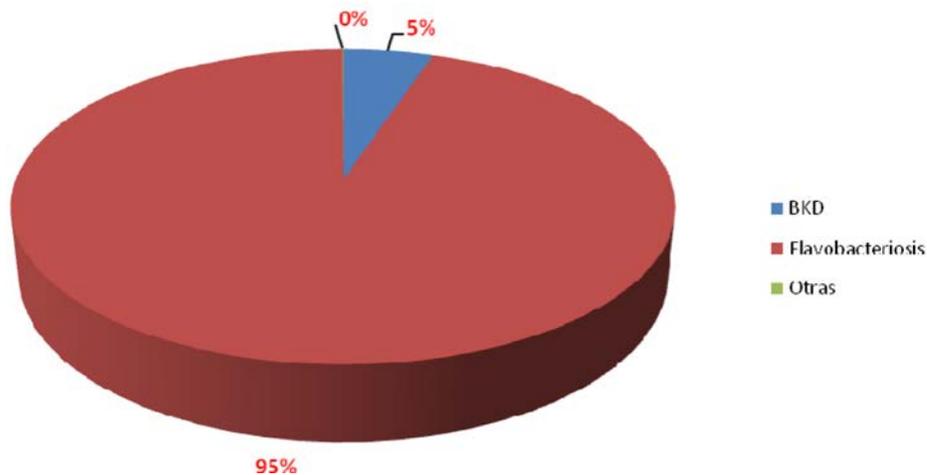
Para el caso de flavobacteriosis, en el año 2011, para tratar de controlarla, se habría utilizado el 14% del total de los antibióticos utilizados en salmonicultura en agua dulce y salada (gráfico 3) [12].

Gráfico 3 – Consumo de antimicrobianos según diagnóstico bacteriano (empírico) para todas las especies salmónidas cultivadas durante 2011



Y dentro de los tratamientos en agua dulce, Sernapesca informó que en el año 2011, el tratamiento de flavobacteriosis con antimicrobianos utilizó el 95% de los antibióticos destinados a tratamientos en agua dulce (gráfico 4) [13].

Gráfico 4 – Distribución de antimicrobianos utilizados en fase de agua dulce, según diagnóstico, período enero – septiembre 2011.



Sistema digestivo en peces

En peces, la anatomía digestiva se presenta muy heterogénea, ya que existen diferencias importantes entre ellos. Existen especies con y sin estómagos, mientras que otras, como los salmónidos, han desarrollado estructuras especiales, una especie de alargamiento del tracto gastrointestinal, llamados ciegos pilóricos, que amplía el área de absorción de nutrientes [14]. No obstante, el tubo digestivo posee una estructura de borde de cepillo sobre la superficie luminal del epitelio intestinal, similar a lo observado en humanos denominada también microvellosidad, constatándose además, las mismas estructuras histológicas, como las crestas y pliegues del epitelio de absorción [14]. En general, en peces se estudia la microbiota de todo el intestino. Algunos estudios, por ejemplo, han reportado que en las especies cultivadas de ayu, carpa, bagre, anguila japonesa y tilapia se encuentran del orden de 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colonias por gramo de contenido intestinal [15].

Hasta el momento se ha descrito que existen diferencias en el tamaño de las poblaciones en los distintos sitios anatómicos de peces. Así, por ejemplo, se ha estimado que los aerobios heterótrofos en el TGI de *Seriola* sp. (yellowtail) se encuentran del orden de 10^4 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de contenido en ciegos pilóricos, 10^5 (ufc/gr) en estómago, y entre 10^4 y 10^6 (ufc/g) en intestino [16]. En salmón (*Salmo salar*) se ha determinado que los recuentos de aerobios variarían también según el sitio dentro del tubo digestivo, encontrándose en esófago y estómago recuentos de 10^3 ufc/gr de contenido, 10^3 en ciegos pilóricos e intestino delgado, y 10^6 en intestino posterior [17].

Probióticos en acuicultura

El término probiótico en animales, se podría definir según Fuller como un suplemento alimentario microbiológico vivo con efectos beneficiosos para el hospedero animal [18]. Los mecanismos de acción de los probióticos incluyen, la producción de sustancias inhibitorias de los patógenos, exclusión competitiva de patógenos, competencia por sitios

de adhesión, fuente de algunos nutrientes y contribución enzimática a la digestión, y la modulación de respuestas del sistema inmune [19, 20]. Entre los microorganismos que han presentado propiedades probióticas en peces se encuentran los géneros: *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Aeromonas*, entre otras [21-24]. Algunos de los probióticos comercializados en el mercado para uso en acuicultura son: Mycolactor Dry Probiotic®, el cual corresponde a una mezcla de microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. brevis*); INVE Sanolife® MIC, que incluye una mezcla de cepas de *Bacillus*. Biogen®, mezcla *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*. BACTOCELL® (*Pediococcus acidilactici*), el primer probiótico aprobado por la Unión Europea para su uso en acuicultura, como aditivo en la alimentación de salmónidos y camarones [25-28].

Mecanismos de Acción de los probióticos

Dentro de los mecanismos de acción que se le han atribuido a las bacterias probióticas, está su acción inhibitoria frente a bacterias patógenas y la modulación del sistema inmune del hospedero, revisaremos estos aspectos en los siguientes párrafos.

Inhibición crecimiento de patógenos (in vitro) La colonización del tracto digestivo por parte de las bacterias ácido lácticas, podría inhibir la multiplicación de patógenos gracias a la producción de compuestos como ácidos orgánicos, bacteriocinas o H₂O₂ [29]. Para comprobar dicho efecto, Villamil llevó a cabo un ensayo in vitro con 6 diferentes bacterias lácticas, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* y *Pediococcus acidilactici*, de las cuales obtuvo el sobrenadante de cultivo neutralizado y los contrastó con ácido láctico. Observó que algunos éstos sobrenadantes inhibían el crecimiento del patógeno *Vibrio alginolyticus*, incluso más que el ácido láctico por sí solo, lo que sugeriría un efecto sinérgico de los productos extracelulares de las bacterias utilizadas [30].

En otro ejemplo de aplicación in vitro, Balcázar expuso a los patógenos *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum* y *Y. ruckeri* a sobrenadantes neutralizados de *L. lactis*, *L. plantarum* y *L. fermentum*. Sólo *L. lactis* presentó inhibición de la multiplicación de estas cepas patógenas, el cual no estaría relacionado con el pH del sobrenadante, sino con algún otro producto extracelular [31].

Competencia por sitios de adhesión

La adhesión de las cepas probióticas al mucus intestinal sería importante para asegurar la permanencia en el tracto intestinal del huésped [32]. Esta adhesión podría ser útil para entregar las sustancias antimicrobianas y también para competir con los demás microorganismos. Se han presentado variados ensayos que estudian la competencia existente entre probióticos y patógenos por la adhesión en el tracto gastrointestinal de los seres vivos; Vine aisló de pez payaso (*Amphiprion percula*) cinco candidatos a probióticos, en los cuales evaluó in vitro su capacidad para adherirse a mucus intestinal, junto a los patógenos *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio alginolyticus*. La adición de los probióticos después de los patógenos, redujo la adhesión de estos últimos, sugiriendo que el probiótico produciría un desplazamiento del patógeno [32]. Del mismo modo, Balcázar comprobó que al exponer mucus intestinal de truchas a bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactobacillus curvatus*), éstas inhibían la posterior adhesión de las bacterias patógenas *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Carnobacterium piscícola*, *Lactococcus garvieae*, *Vagococcus salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum* y *Renibacterium salmoninarum*. [22]

Modulación sistema inmune Existen algunos estudios que señalarían cierta modulación en el sistema inmune de los peces por parte de bacterias “probióticas”. Por ejemplo, en dietas suministradas a tilapia por 32 días, suplementadas con *Pediococcus acidilactici* (1×10^7 bac./g almt.), se pudo observar un incremento en los niveles de

leucocitos sanguíneos y en la actividad de la lisozima en el suero después de 14 días de dieta, además de una disminución en la mortalidad de los peces [24]. Kim y Austin (2006) determinaron un aumento en la respuesta inmune a nivel celular y humoral en trucha arcoíris al ser alimentados durante 3 semanas con *Carnobacterium maltaromaticum* y *Carnobacterium divergens*. *C. maltaromaticum* habría provocado un incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos del riñón cefálico, mientras que *C. divergens* provocó un incremento en el estallido respiratorio y la actividad de lisozima en el suero. Ambas cepas aumentaron la actividad de la lisozima en la mucosa intestinal [33]. Por su parte, Salinas et al., administraron cuatro diferentes dietas a dorada durante 3 semanas; dieta control (no suplementada), dieta suplementada con *Lactobacillus delbrueckii*, otra con *Bacillus subtilis* y otra con ambas bacterias. Se encontró que en riñón, la actividad fagocítica se incrementó luego de 2 semanas de alimentación con las bacterias administradas individualmente. Además se observó un aumento en la actividad citotóxica en riñón después de 3 semanas con la dieta suplementada con las dos bacterias [34]. En otro estudio, se observó el efecto de la ingesta de bacterias ácido lácticas (BAL) sobre la respuesta humoral de trucha café. Se administró dietas con tres diferentes bacterias durante 2 semanas (*L. lactis*, *L. sakei* y *L. mesenteroides*), y se observó un incremento significativo de la actividad alternativa del complemento al final de la segunda semana para los tres grupos suplementados. También hubo un aumento en la actividad de lisozima en el suero al final de la tercera semana en los grupos con *L. lactis* y *L. mesenteroides*. Además se observó un incremento en los niveles de inmunoglobulinas del plasma en los grupos suplementados con las BAL [35].

Protección frente a patógenos Otro de los beneficios que se le atribuyen a los probióticos es la protección que brindarían frente a patógenos. Esto se vería reflejado en el estudio de Capkin y Altinok (2009), en el cual suministraron dietas con dos cepas probióticas (*Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis*) a trucha arcoíris durante 60 días. Pudieron observar que la ingesta de bacterias probióticas se asociaba con la protección frente a una infección por el patógeno *Yersinia ruckeri*, adicionado en el agua el día 20 del ensayo. Se observó que los peces tratados con los probióticos mostraron mortalidades

menores al 1%, mientras en el grupo control la mortalidad alcanzó el 65% [36]. Vendrell (2008), trató a truchas arcoíris durante 1 mes con dietas suplementadas con bacterias probióticas. Utilizó dietas con *Leuconostoc mesenteroides* o *Lactobacillus plantarum* y comparó con una dieta sin bacterias. Luego del tratamiento, realizó un desafío infectando las truchas por cohabitación con el patógeno *Lactococcus garviae*. La mortalidad de los peces disminuyó desde 78% para el grupo control, a 54 % para el grupo tratado con *L. mesenteroides*, y 46% para el grupo tratado con *L. plantarum* [37].

Por otra parte, Brunt et al. (2007), suministraron a trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) una dieta suplementada con probióticos; *Aeromonas sobria* GC2 o *Bacillus sp.* JB-1, más una dieta control. Las dietas con probióticos causaron un efecto protector en el pez frente a la infección con los patógenos *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* y *Yersinia ruckeri*. Los patógenos provocaron una mortalidad de entre un 80 y 100% en los peces expuestos a la dieta control. La cepa JB-1 logró reducir la mortalidad a 0 y 13 %, y la cepa GC2 redujo la mortalidad a 0 y 6% [23].

HIPÓTESIS

En la microbiota del tracto digestivo de salmones existen microorganismos que presentan propiedades probióticas y que pueden utilizarse para mejorar la protección frente a la acción de patógenos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar propiedades probióticas en bacterias lácticas y levaduras aisladas de la microbiota del tracto digestivo de salmónidos.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar levaduras y bacterias lácticas presentes en tracto digestivo de salmónidos.
2. Caracterizar los microorganismos en base a diferentes propiedades que signifiquen beneficios para el hospedero en protección frente a la acción de patógenos.
3. Evaluar la protección inducida por microorganismos escogidos en un ensayo de desafío en salmones, frente al patógeno *Flavobacterium psychrophilum*.

METODOLOGÍA

1. Aislamiento e identificación de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos

Para aislar e identificar microorganismos que sean inocuos al ser administrados a salmónidos y capaces de causar efectos benéficos en el hospedero, se recolectaron muestras de heces de salmónidos aplicando un masaje “ventral”. Estas muestras fueron sometidas a cultivos en placas con medios TSB y MRS. Se seleccionaron distintas colonias que presentaron morfotipos similares a bacterias lácticas y levaduras, y se aislaron en placas. Los aislados fueron identificados a través de técnicas moleculares; se realizó extracción del ADN bacteriano, a través de lisis celular por temperatura (anexo 1), o en su defecto con kit de extracción WIZARD®. Posteriormente se realizó PCR del gen 16S para bacterias [38], y de la región 5.8S, ITS1 e ITS2 para levaduras según método propuesto por Esteve-Zarzoso [39], para luego realizar polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) con enzimas de restricción, AluI para bacterias, y HaeIII para levaduras. Finalmente los amplicados fueron enviados a MacroGenUSA, quienes realizaron la secuenciación de las muestras, y con ese resultado, se identificó la especie mediante herramientas informáticas en bases de datos existentes en la web (Ribosomal Data Project para bacterias, y BLAST para levaduras).

2. Caracterización de los microorganismos aislados en base a diferentes propiedades que signifiquen beneficios para el hospedero en protección frente a la acción de patógenos.

2.1 “Criterio GRAS”

Los aislados microbianos fueron evaluados en su inocuidad frente a salmónidos. Esto se llevó a cabo exponiendo a salmónidos en etapa de alevines con saco, a un medio con una concentración de 1×10^9 de los microorganismos

candidatos a probióticos durante 24 horas. Luego se realizó cambio del agua y se registró la mortalidad ocasionada diariamente durante 5 días.

Solo se seleccionaron para estudios aquellos que presentaron 0% de mortalidad.

Posibles aportes de los microorganismos en protección frente a patógenos

Con el fin de determinar el posible aporte de los microorganismos a la protección o defensa del hospedero, se comenzó por evaluar la capacidad de los microorganismos para inhibir el crecimiento de patógenos in vitro. Aquellos que presentaron inhibición significativa fueron evaluados en su capacidad para persistir en el tracto digestivo y asociarse al epitelio. Esto se realizó en base a pruebas in vitro (ver 2.2). Finalmente, se seleccionaron los microorganismos más notables en sus propiedades inhibitorias y de persistencia, para realizar un ensayo de desafío in vivo y determinar su capacidad de protección frente al patógeno *Flavobacterium psychrophilum*.

2.2 Inhibición de multiplicación de patógenos

Se realizó un ensayo para determinar la posible inhibición en la multiplicación de patógenos.

Las bacterias patógenas fueron sembradas en sus respectivos medios de cultivo, y expuestas al sobrenadante de los cultivos de los cultivos probióticos. Se evaluó la posible inhibición de su multiplicación.

Esto se realizó con el método de halos de inhibición, para lo cual todos los microorganismos a utilizar fueron tomados a partir de cultivos en caldo. El ensayo consistió en la realización de una siembra en tamiz de un inóculo 0,5 McFarland de

cada patógeno en placas de 25 ml de agar con el medio correspondiente para cada uno: LB 1% NaCl para *Vibrio parahemolítico (Vp)* y *Vibrio ordalli (Vo)*, TSA 1% NaCl para *Vibrio anguillarum (Va)*, TSA para *Lactococcus piscium (Lp)* y *Aeromona salmonicida (Ae)*, Agar nutritivo para *Yersinia ruckeri (Ye)* y medio FPS y TYES para *Flavobacterium psychrophilum (Fl)*. Se realizaron perforaciones de 6 mm en los medios con pipeta pasteur y se agregó en cada pocillo 80 µl de microorganismos candidatos a probióticos con su sobrenadante a una concentración de 1×10^8 ufc/ml. Estas placas se incubaron a 25°C, (a excepción de *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum* que fueron incubadas a 17°C) durante 24 a 48 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición producidos.

3. Persistencia del microorganismo en el tracto digestivo

Se evaluó la persistencia de los microorganismos seleccionados en el tracto digestivo de salmones, para esto, se administraron dietas suplementadas con los microorganismos elegidos y dieta control (sin microorganismos añadidos), por un período de 7 días. Luego fueron tomadas muestras de heces de los peces cada 3-4 días desde el día 0 hasta el día 28.

Este ensayo se realizó administrando tres diferentes dietas a salmones (salmo salar) de 25 gr. Se requirió de 150 peces los cuales fueron divididos en tres grupos de 50 peces cada uno.

- Al **grupo 1** se le administró alimento comercial adicionado con *Carnobacterium* cepa **2A-5** (1×10^9 bacterias/gr alimento) y *Lactococcus*, cepa **B0P1-8** (1×10^9 bacterias/gr alimento),
- Al **grupo 2** se le administró alimento comercial adicionado con *Pediococcus* **B012** (1×10^9 bacterias/gr alimento) y *Debaryomyces*, cepa **K2(-1)2** (1×10^9 levaduras/gr alimento).

- **Al grupo 3 Control** se le administró alimento comercial sin adición de microorganismos.

La cantidad de alimento a administrar diariamente correspondió al 2% del peso de los peces. El alimento suplementado se elaboró según como se indica el Anexo A.

Durante 10 días consecutivos se administró a los grupos 1, 2 y 3 las dietas señaladas anteriormente. Luego de este período todos se comenzaron a alimentar con la dieta normal (dieta comercial).

Se extrajeron muestras de heces los días 0, 4, 8, 11, 14, 17, 22 y 28 a 6 individuos por estanque.

Estas muestras fueron colectadas en forma estéril y se plaquearon en placas con medio TSA en diluciones (directo, -2 y -4) para posteriormente realizar recuento de colonias. Las heces extraídas de los peces con la dieta 2 fueron plaqueadas en placas de MRS (para favorecer el crecimiento de microbiota láctica) y placas con TSA con adición de antibióticos (para favorecer el desarrollo de levaduras).

Las heces además fueron sometidas extracción de DNA con kit MOBIO para luego realizar PCR del gen 16S para las bacterias, y 5,8S para el caso de la levadura. Luego se realizó RFLP para cada marcador, digiriendo las muestras con enzima AluI para bacterias, y HaeIII en el caso de levaduras.

4. Ensayo de desafío de las bacterias probióticas “*in vivo*”, frente a un patógeno (*Flavobacterium psychrophilum*)

Se evaluó la capacidad de los microorganismos candidatos a probióticos para proteger “*in vivo*” al salmón frente a una infección inducida de *Flavobacterium psychrophilum*.

El diseño fue el siguiente: se utilizaron 150 alevines de salmón (*Salmo salar*) de 25 gr. Estos peces fueron separados en 3 grupos de 50 individuos. Se suministró al grupo 1 una dieta suplementada con los probióticos, al grupo 2 una dieta con y al grupo 3 una

dieta sin bacterias agregadas (control) durante los 21 días que duró el ensayo. En el día 8, 15 peces de cada uno de los 3 grupos fueron infectados mediante inyección intraperitoneal con el patógeno *Flavobacterium psychrophilum* (1×10^8 bacterias por pez). Además como control negativo, a 15 peces de la dieta control se les inyectó sólo el medio de cultivo para *Flavobacterium*, todo esto según protocolo establecido previamente en el laboratorio [40]. Durante todo el ensayo se realizó un registro de la mortalidad diaria en los distintos grupos, para determinar el nivel de protección frente al patógeno.

Se confirmó la muerte de los peces debido a infección por *Flavobacterium* con un análisis visual de los individuos muertos.

Análisis Estadísticos

Con los datos de mortalidad y sobrevivencia se calcularon proporciones al día final del estudio. Las diferencias en los porcentajes de sobrevivencia, se analizaron utilizando el test de Chi cuadrado (χ^2) en tablas de contingencia de 2x2 comparando cada dieta con el grupo control.

Número de animales y repeticiones

Se requirieron 120 alevines de *Salmo salar* para el ensayo de inocuidad y 150 para el desafío con el patógeno. Los peces fueron donados por Australis, Peñaflores. Su condición sanitaria fue evaluada por un veterinario de la empresa. Los peces se mantuvieron en acondicionamiento 3 semanas antes de ser usados en las pruebas descritas.

Aprobación comité ética

Los protocolos a utilizar fueron visados por el comité de bioética para el manejo de peces, que corresponden a los empleados en Proyecto Fondecyt 1110253.

RESULTADOS

1. Aislamiento e identificación de microorganismos del tracto digestivo de salmónidos

Se obtuvo un total de 120 aislados microbianos entre bacterias y levaduras, todos ellos originalmente presentes en el contenido intestinal de salmónidos. Este aislamiento se realizó utilizando medios de cultivo tales como MRS y TSB. Se lograron purificar 94 microorganismos diferentes los cuales se identificaron en base a su secuencia de genes ribosomales en combinación con su perfil de RFLP de 16SrRNA o espaciador ribosomal.

Entre los aislados, se distinguieron en tres grupos: levaduras, bacterias gram negativas y bacterias lácticas. Un ejemplo de los géneros encontrados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Cepas asiladas e identificadas extraídas de heces de salmones

	Cepas identificadas		Gen utilizado	% identificación	
Levaduras	<i>Candida</i>	<i>Candida Zeylanoides</i>	26S	100	
	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>	26S	100	
	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	26S	100	
Bacterias	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	16S	100	
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium divergens</i>	16S	100	
	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	16S	100	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>		16S	97
		<i>Lactobacillus homohiochii</i>		16S	100
		<i>Lactobacillus buchneri</i>		16S	100
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromona veronii</i>		16S	100
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus circulans</i>		16S	100
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>		16S	100
<i>Staphylococcus caprae</i>			16S	100	
Enterobacter	Enterobacter sp.		16S	100	

2. Caracterizar los microorganismos en base a diferentes propiedades que signifiquen beneficios para el hospedero, tanto en nutrición como en protección frente a patógenos.

Para concentrar los esfuerzos en encontrar microorganismos con potencial probiótico se recurrió a ensayar solo aquellas bacterias que coinciden con el criterio GRAS, es decir, se descartaron los aislados pertenecientes a las Gram negativas. Se prosiguió los ensayos con bacterias lácticas y se exploraron algunas levaduras obtenidas. Como propiedades beneficiosas se consideró la inocuidad del microorganismos sobre el hospedero, también la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos comunes en la salmonicultura y finalmente, la persistencia en el tracto digestivo.

2.1 Inocuidad

La obtención y caracterización de microorganismos inocuos con características probióticas para antagonismo de patógenos, requiere de una evaluación de la inocuidad de tales microorganismos. Esto se realiza mediante la inmersión de 10 alevines (*Salmo salar*) en un estanque que contiene 10^9 células del microorganismo candidato por ml, por un período de 24 horas. Los peces fueron observados por 5 días evaluando mortalidad o morbilidad. Como control negativo se realizó una prueba de inocuidad en la cual se expuso alevines en agua sin bacterias donde se realizó un seguimiento por 5 días. La mortalidad alcanzó su máximo en 72h. Los resultados se resumen en la Tabla 4, de la cual se desprende que los microorganismos candidatos a probióticos son seguros para los peces. Se presentó una excepción con los aislados B09-L, B034 y B044 correspondiente al género *Lactobacillus* que se descartaron como candidatos. La levadura T32 correspondiente al género *Cryptococcus*, también indujo mortalidad.

Tabla 4 - Mortalidad acumulada de salmones inmersos en agua con alta concentración de microorganismos candidatos a probióticos

Cepa candidata	Seguimiento mortalidad (Días)					
	0	1	2	3	4	5
Control (sin microorganismos)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Candida B2</i>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Cryptococcus T32</i>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10
<i>Debaryomyces K2(-1)2</i>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Debaryomyces K1(-1)</i>	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10
<i>Pediococcus B012</i>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Carnobacterium 2A-5</i>	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10
<i>Lactococcus BOP1-8</i>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>Lactobacillus B09</i>	0/10	7/10	7/10	7/10	7/10	7/10
<i>Lactobacillus B034</i>	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	2/10
<i>Lactobacillus B044</i>	0/10	0/10	2/10	2/10	2/10	2/10

2.2 Inhibición del desarrollo de patógenos

Debido a la gran crisis sanitaria que afectó a la salmonicultura entre los años 2007-2009, y la restricción creciente al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas, se realizó una caracterización de los aislados en su capacidad para inhibir la multiplicación de patógenos comunes en salmónidos. Se incluyeron en esta prueba aislados bacterianos de los géneros *Carnobacterium*, *Lactococcus* y *Pediococcus*, además de un par de levaduras, dada sus características de inocuidad previamente ensayadas. Esta elección se basó también en que las bacterias mencionadas han sido observadas como poblaciones frecuentes dentro de la microbiota de salmónidos [41]. Gatesoupe, reporta que poblaciones de levaduras también podrían ser un aporte en el tracto digestivo de peces [42]. Los patógenos utilizados en este estudio fueron diversas cepas obtenidas desde colección o bien

aislados nacionales que causan enfermedades prevalentes como *Flavobacterium*. El detalle se encuentra en la siguiente lista:

- *Vibrio anguillarum* (Va aislado nacional)
- *Vibrio ordalii* (Vo Cepa de colección ATCC)
- *Lactococcus piscium* (Lp aislado nacional)
- *Aeromonas salmonicida* (Ae Cepa de colección CECT 4235)
- *Yersinia ruckeri* (Ye Cepa de colección CECT 4319)
- *Flavobacterium psychrophilum* (FL aislados nacionales T23, MH1)

Los resultados se resumen en la Tabla 5, que presenta los halos de inhibición de patógenos en cultivos in vitro. Cada celda indica los diámetros de halos en mm, se debe considerar que cada pocillo tiene diámetro 6 mm. Algunas cepas como por ejemplo, BOP1-8 del género *Lactococcus*, muestran antagonismo contra diferentes patógenos, presentando considerables halos de inhibición. Las cepas del género *Carnobacterium* (2A-7; 2A-5) presentaron antagonismo aunque con un espectro más reducido de acción. La cepa *Pediococcus* B012 fue la que presentó mayor espectro antagonista, inhibiendo en distinta medida a todas las cepas patógenas en su crecimiento. Las levaduras no presentaron ningún tipo de inhibición frente a los patógenos estudiados.

TABLA 5 - Ensayos de antagonismo contra patógenos. Sobre 6 mm existe inhibición del crecimiento bacteriano

		PATÓGENOS							
		<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio ordalii</i>	<i>Lactococcus piscium</i>	<i>Aeromona salmonicida</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>		
							FI-T23	FI-MH1	
CANDIDATOS PROBIÓTICOS	LEVADURAS								
	Debaryomyces	K1(-1)	6	6	6	6	6	6	6
		K1(-1)1	6	6	6	6	6	6	6
		K2(-1)2	6	6	6	6	6	6	6
	Candida	B2	6	6	6	6	6	6	6
	Cryptococcus	T32	6	6	6	6	6	6	6
	BACTERIAS								
	Lactococcus	BOP1-8	6	15	12	9	6	13	10
		BOP1-5	6	6	6	6	6	6	Nd
	Carnobacterium	2A-5	6	12	6	12	6	10	12
		2A-7	6	11	6	10	6	10	12
	Pediococcus	B012	10	15	14	13	8	15	20
	Lactobacillus	B09	6	12	8	6	6	Nd	Nd
		B034	Nd	12	6	6	6	Nd	Nd
		B044	Nd	11	6	11	6	Nd	Nd

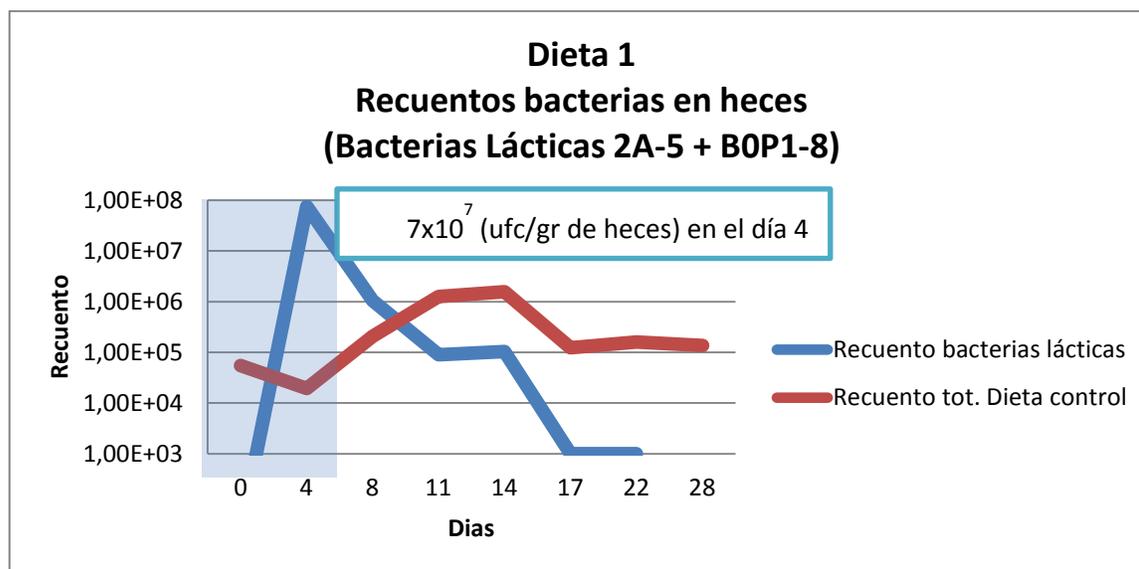
Patógenos: *Vibrio anguillarum* (Va), *Vibrio ordalii* (Vo), *Lactococcus piscium* (Lp), *Aeromona salmonicida* (Ae), *Yersinia ruckeri* (Ye), *Flavobacterium psychrophilum* (FI T23 y MH1)

2.3.2 Persistencia del microorganismo en el tracto digestivo

Es importante determinar si los candidatos a probióticos son capaces de permanecer un tiempo en el tracto digestivo. Esto porque una mayor interacción podría dar paso a una mayor modulación de genes en el hospedero. Se implementó un método sencillo para incorporar bacterias en el alimento en cantidades conocidas y de manera uniforme. Con

este método se introdujeron en el alimento 10^9 microorganismos/g usando cepas seleccionadas para evaluar su persistencia en salmones de 30g. Los resultados mostraron que la mezcla de *Lactococcus* y *Carnobacterium*, era detectable hasta 6 días después de suspender el pellet suplementado (Gráfico 5). Es interesante destacar que la inclusión de los candidatos a probióticos en alimento conduce a un aumento en las cargas bacterianas en el tracto digestivo. La carga total de bacterias lácticas luego de 4 días de tratamiento es cercana a 10^8 bacterias por gramo, lo que es casi 100 veces más de la carga normal que tienen los peces no tratados.

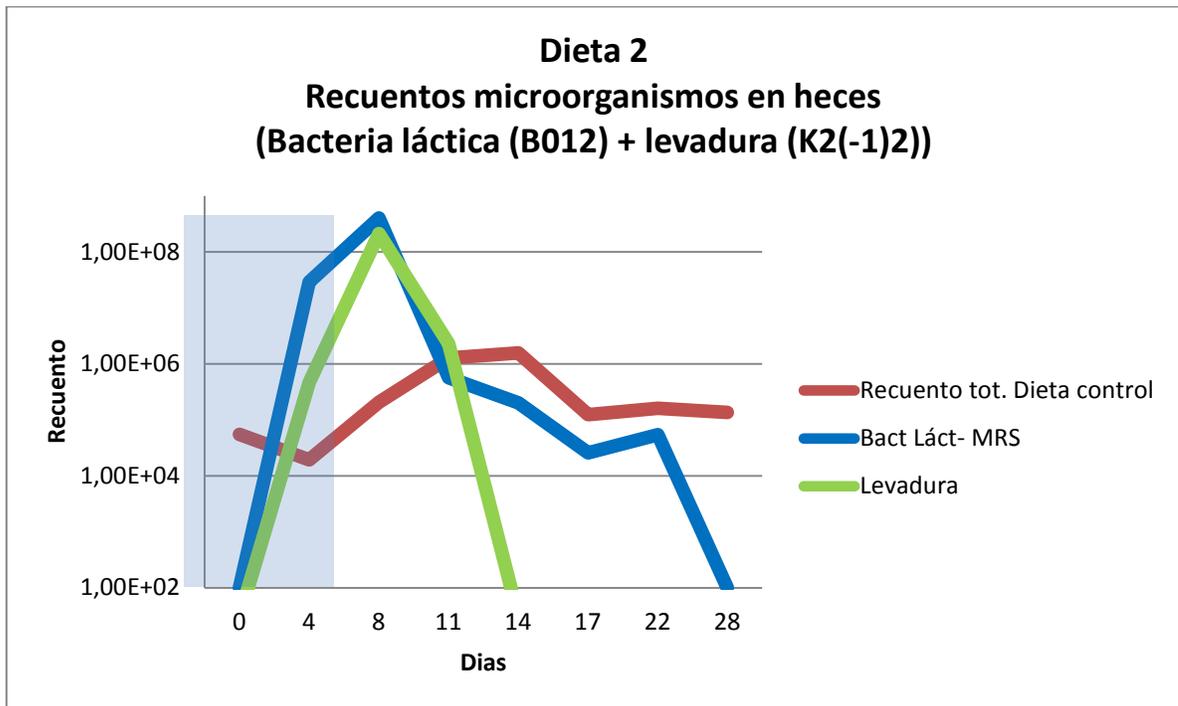
Gráfico 5 - Persistencia de las bacterias de la Dieta 1 (*Lactococcus* BOP1-8 + *Carnobacterium* 2A-5) en el tracto digestivo de salmón (*Salmo salar*)



En la dieta 2, mezcla de *Pediococcus* y *Debaryomyces*, se observó que la levadura persistió en el tracto intestinal hasta 3 días después de suspender el pellet suplementado, no así el *Pediococcus* que fue detectado hasta 14 días después de suspender la alimentación suplementada. Se observó la aparición de los microorganismos en las heces durante el período de alimentación de hasta 2×10^8 (ufc/gr de heces) en el día 8 para K2(-1)2 y de 4×10^8 (ufc/gr de heces) en el día 8 para B012, período en el cual se suministró la dieta, luego de esto la levadura se logró aislar hasta el día 11, y el *Pediococcus* hasta el día

22. En ambos casos la mayor carga microbiana 10^8 (ufc/gr de heces) está muy por encima de los niveles normales de carga bacteriana en el tracto digestivo de los peces (gráfico 6).

Gráfico 6 - Persistencia de los microorganismos de la Dieta 2 (B012 y K2(-1)2) en el tracto digestivo de salmón (*Salmo salar*)



3. Ensayo de desafío de las bacterias probióticas frente a patógeno *Flavobacterium psychrophilum*

La fase más crítica en el uso de bacterias probióticas es determinar una acción cuantificable de su efecto sobre el hospedero. Para revelar el efecto de protección que podrían tener los candidatos seleccionados, se recurrió a un ensayo de desafío donde peces alimentados con probióticos y sin probióticos, son sometidos a una infección bacteriana (Flavobacteriosis).

Luego de administrar a los salmones dietas suplementadas con los candidatos por un periodo de ocho días, se les administró una dosis de *Flavobacterium psychrophilum*.

Para evaluar el efecto protector se observó la sobrevivencia del grupo tratado con probióticos versus un grupo control (no tratado). Se pudo observar que los peces alimentados con Dietas 1 y 2, tuvieron un notable incremento en la sobrevivencia (87 y 73%) en comparación con los peces control (33%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas $p=0,00287$ y $p=0,02811$, respectivamente (Gráfico 7 y Tabla 6).

Gráfico 7 – Porcentaje de sobrevivencia de los peces que las dietas conteniendo los candidato probióticos pueden lograr frente al desafío con el patógeno *Flavobacterium psychrophilum*.

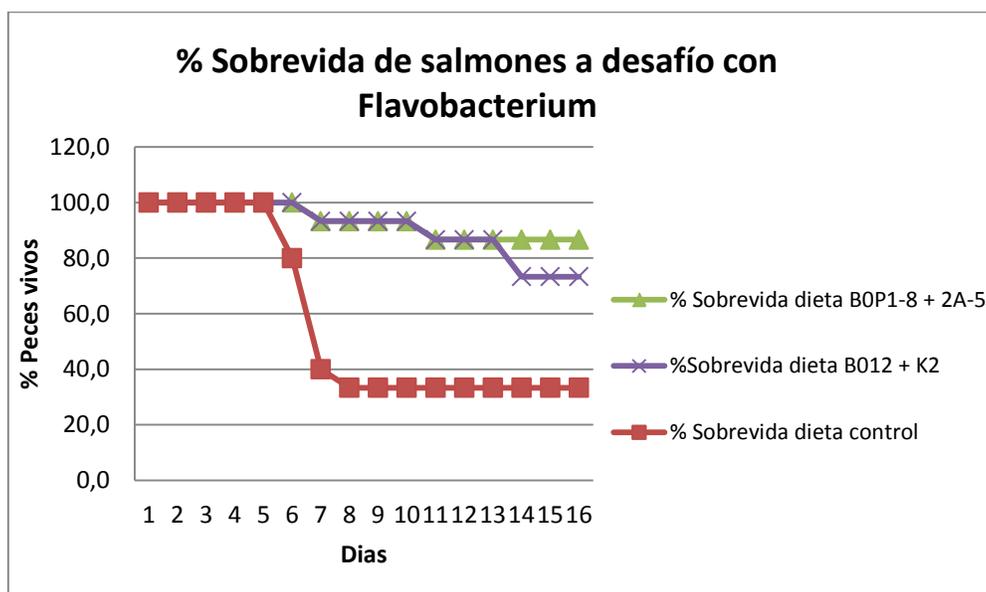


Tabla 6 – Porcentaje sobrevivencia peces tratados con diferentes dietas, frente a infección con *Flavobacterium psychrophilum*

Dieta	Sobrevivencia (%)
1 (BOP1-8 + 2A-5)	86.7 %
2 (B012 + K2(-1)2)	73.3 %
3 (Control)	33.3 %

DISCUSIÓN

En este momento, la situación de la salmonicultura en Chile sigue siendo delicada, luego de la crisis sanitaria que afectó la producción y exportación de salmones, se está viviendo una lenta recuperación. La Industria busca mayor consolidación del sector y, los productores tratan de adaptarse a las nuevas normativas, la lucha contra los crecientes costos y la continua amenaza de enfermedades infecciosas. El alto uso de antibióticos en la salmonicultura, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas herramientas que permitan combatir las enfermedades y no provocar daños al ambiente ni a la población consumidora de pescado.

Se ha demostrado que la aplicación de microorganismos probióticos es muy favorable en la salud humana, es por esto que se han llevado a cabo diversas iniciativas para utilizar estos microorganismos en otro tipo de seres vivos. Sin embargo, en el caso de los peces, en particular, los salmónidos, la microbiota asociada al tracto digestivo tiene una composición y carga diferente a la de mamíferos. Una influencia ambiental especialmente importante, es la temperatura, pues los salmónidos son poiquilotermos y viven a temperaturas de 8 - 14 °C, muy inferiores a la de los mamíferos homeotermos.

El hecho de extraer microorganismos autóctonos de los peces, favorece su utilización como probióticos. La idea de utilizar estos microorganismos es que éstos sean capaces de sobrevivir al tracto digestivo, y tengan las condiciones de desarrollarse y manifestar su actividad probiótica en el pez. Existe un consenso general de que probióticos autóctonos pueden tener mayor probabilidad de colonizar el tracto digestivo y conferir beneficios al huésped. Los probióticos más comunes que han sido utilizados en acuicultura son bacterias ácido lácticas y levaduras. Se incluyen especies como: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Saccharomyces* [43]. En base a estos antecedentes, en este trabajo se escogieron algunas bacterias ácido lácticas y levaduras, obtenidas desde salmónidos, para llevar a cabo este estudio.

El primer obstáculo que debieron pasar estos microorganismos, fue demostrar de eran inocuos frente a los peces. Dentro de los microorganismos testeados, hubo tres cepas que no cumplieron esta condición, que en este caso eran *Lactobacillus*, por lo que fueron descartadas del estudio. Luego, los microorganismos seleccionados, se evaluaron en su capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos más comunes en salmonicultura. Se observó que las cepas de *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Lactococcus*, tenían mayor capacidad de inhibir a estos patógenos, esta inhibición podría ser explicada, debido a que las bacterias lácticas tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos, H₂O₂ o en algunos casos bacteriocinas, los cuales pueden inhibir el crecimiento de microorganismos. En este sentido, Vásquez en 2004, evaluó la respuesta de cuatro patógenos más comunes de Turbot (Vibrios), con nueve potenciales probióticos, y demostró que los ácidos láctico y acético, y no las bacteriocinas, fueron capaces de inhibir a patógenos [44]. Robertson, aisló desde salmón atlántico, una cepa de *Carnobacterium*, la cual fue capaz in vitro, de inhibir la multiplicación de patógenos *Aeromona hydrophyla*, *A. salmonicida*, *Fl. psychrophilum*, *P. damsela*, *S. milleri*, *V. anguillarum* y *V. ordalii*, lo cual concuerda con resultados que obtuvo Jôrborn en 1997, en donde una cepa de *Carnobacterium*, fue capaz de inhibir a *A. salmonicida* y *V. anguillarum* [21, 45].

Para la elección de los candidatos a probióticos a utilizar, se escogieron las tres bacterias que presentaron mayor espectro de inhibición de patógenos: *Lactococcus BOP1-8*, *Carnobacterium 2A-5* y *Pediococcus B012*. Además fue escogida una levadura, *Debaryomyces*, ya que se ha demostrado que al ser ingerida por el pez Dorada, tiene la capacidad de estimular parámetros del sistema inmune innato en peces [46].

Una de las principales características que debe tener un microorganismo utilizado como probiótico, es tener la capacidad de colonizar y persistir en el huésped. En el presente estudio, luego de administrar las dietas probióticas, logramos detectar estos microorganismos vivos en las heces, *Pediococcus* (B012) se logró detectar hasta 20 días después de interrumpir la suplementación, *Lactococcus* (BOP1-8) y *Carnobacterium* (2A-5), fueron detectados hasta 14 días después y *Debaryomyces* (K2(-1)2), fue detectada sólo

hasta 3 días después de detener la suplementación con probióticos en la dieta, demostrando que algunos microorganismos, tienen mayor capacidad de adhesión y sobrevivencia en el mucus intestinal de los peces. En este sentido, Ferguson y cols., luego de suministrar dieta con *Pediococcus* (10^7) a Tilapia, determinó que la cepa logró sobrevivir en tracto intestinal durante 17 días después de terminar la suplementación con la bacteria, tiempo similar a la sobrevivencia de nuestro *Pediococcus* B012 en el tracto intestinal. También pudo observar que mientras se administró la dieta, la microbiota del pez fue cambiando con respecto a la inicial y al control, reduciendo la diversidad y abundancia de especies [24]. Merrifield, ha detectado con microscopía electrónica, cómo *Pediococcus acidilactici* es capaz de colonizar el segmento posterior del intestino, luego de suministrar durante 10 semanas dieta con el microorganismo [47]. También Jöborn, ha demostrado que *Carnobacterium* puede sobrevivir y desarrollarse en el tracto digestivo de trucha arcoíris, observando recuentos de esta bacteria luego de 4 días de suspender la dieta suplementada. Así mismo, Robertson, luego de alimentar a trucha arcoíris durante 28 días con *Carnobacterium*, logró detectarla hasta 10 días después determinada la dieta suplementada. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo a la literatura y algunos de los microorganismos seleccionados pudieron permanecer un tiempo importante en el tracto digestivo [21, 45].

La flavobacteriosis está entre las enfermedades de más alta prevalencia en Chile en salmónidos de agua dulce. Es la segunda enfermedad más pesquisada, luego del virus IPN. Decidimos comprobar si nuestros candidatos a probióticos tenían algún efecto para proteger a los peces de una infección inducida por esta bacteria (*Flavobacterium phycophilum*). Pudimos determinar, que después de administrar las dietas por 1 semana, y luego inducir una infección, se logra aumentar significativamente la sobrevivencia de los peces tratados con las dietas probióticas 86,7% en el caso de la Dieta 1 y 73,3 % en el caso de la Dieta 2, versus 33,3% de la Dieta Control. Esto indica que la administración de estas dietas, pueden proteger a los peces de esta enfermedad. Korkea-aho realizó una experiencia similar, administrando una dieta con probiótico (*Pseudomonas* M174) durante 14 días, para luego inducir una infección de *F. phycophilum* vía intraperitoneal. Pudo

observar que los peces suplementados (10^5 y 10^9 bacterias por g de alimento), disminuyeron su mortalidad de 45 a 23% y de 57 a 41% respectivamente [48]. También Burbank, administró dietas con bacterias autóctonas de trucha arcoíris (*Enterobacter*), pudo observar que su administración a los peces en el alimento logró reducir significativamente la mortalidad provocada por infección inducida de *Flavobacterium psychrophilum* [49].

En este estudio se observó que las cepas escogidas brindan una protección a los peces contra la infección de *Flavobacterium psychrophilum*, lo cual podría ser debido a que estos aislados son capaces de estimular el sistema inmune. Probablemente porque interaccionan con el pez y provocan la señalización relacionada con protección. En este sentido, estudios recientes, han demostrado que *Pediococcus acidilactici* adicionado en las dietas de Tilapias y truchas, es capaz de estimular el sistema inmune, incrementando el número de leucocitos, así como también la actividad lisosomal [24, 47]. También Reyes logró observar que al agregar la levadura *Debariomyces hansenii* al alimento de pez Dorada, se lograba estimular algunos parámetros del sistema inmune innato del pez, especialmente a nivel celular [46]. Otro de los microorganismos testeado como probióticos en Tilapia es *Weisella*, la cual ha demostrado reducir los niveles intestinales de *Vibrio* y elevar los niveles de IgM en peces surubíes (*Pseudoplatystoma*) [50]. Además, cepas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* luego de suministrarlos en dietas (10^6), han producido estimulación al sistema inmune tanto en trucha arcoíris como en *Salmo trutta*, se ha observado, aumento significativo en la actividad lisosomal, producción de SOD y actividad fagocítica [35, 51].

Pérez-Sánchez, utilizó como probióticos tres bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Determinó que sólo *L. plantarum* logró proteger al pez, disminuyendo la mortalidad, de una infección inducida por *Lactococcus garviae*. También observó que la suplementación de la dieta con este

probiótico logró estimular la expresión de genes del sistema inmune de la trucha arcoíris [52].

Las bacterias lácticas utilizadas en este estudio también han demostrado que pueden aumentar la expresión de genes relacionados con protección en pez cebra (mieloperoxidasa, lisozima, hepcidina) (estudios realizados en el Laboratorio de Biotecnología del INTA). En resumen, la manipulación de la microbiota intestinal, a través de la administración de probióticos, puede constituir un mecanismo para incrementar la sobrevivencia de los peces, cuando son expuestos a un patógeno bacteriano.

CONCLUSIONES

- Desde el tracto digestivo de salmón, se logró aislar microorganismos candidatos a probióticos; ellos pertenecen a géneros presentes habitualmente en la microbiota de estos peces: bacterias lácticas y levaduras.
- Los aislados presentaron las propiedades buscadas: como inocuidad, persistencia en el tracto digestivo e inhibición de patógenos in vitro, entre ellos *Flavobacterium*, la enfermedad más frecuente en agua dulce. Estas características permitieron seleccionar 4 microorganismos potencialmente beneficiosos para el salmón.
- Los cuatro microorganismos seleccionados en este trabajo, mostraron resultados exitosos para protección ante una infección inducida y violenta de *Flavobacterium psychrophilum*, aumentando significativamente la sobrevivencia de los peces infectados.
- Se proyecta que la utilización de estos probióticos podrán mejorar la condición sanitaria de los peces y constituirse como una alternativa al uso de los antibióticos en la acuicultura chilena, mejorando la inocuidad del producto final.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marine Harvest, 2013. *Salmon Farming Industry Handbook [En línea]*. <<http://marineharvest.com/PageFiles/1296/2013%20Salmon%20Handbook%2027-04-13.pdf>> [consulta : julio 2013]
2. Alaska Seafood 2013. *World Salmon Supply [en línea]*. Seafood Market Bulletin, Abril 2013. http://www.alaskaseafood.org/industry/market/seafoodweb_apr13/april13/salmonsupply.html [consulta: julio 2013]
3. Godoy, M., A. Aedo, M. Kibenge, D. Groman, C. Yason, H. Grothusen, e *et al.*, *First detection, isolation and molecular characterization of infectious salmon anaemia virus associated with clinical disease in farmed Atlantic salmon (Salmo salar) in Chile*. BMC Veterinary Research, 2008. **4**(1):28.
4. FAO Globefish. *Market Report [en línea], Salmon bulletin Junio 2013*. <<http://www.globefish.org/salmon-june-2013.html>>, [consulta: julio 2013]
5. SERNAPESCA, 2013, *Informe Actividades de Fiscalización 2012*. p. 32. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/presentaciones/Informe_Final_Rendicion_de_Cuentas_2012_Art_4_B_LGPA_SERNAPESCA.pdf>, [consulta: julio 2013]
6. Nematollahi, A., A. Decostere, F. Pasmans y F. Haesebrouck., *Flavobacterium psychrophilum infections in salmonid fish*. Journal of Fish Diseases, 2003. **26**(10):563-574.
7. Ruben Avendaño-Herrera, P.I., Jorge Fernández, *Significance of Flavobacterium diseases on salmonid farming in Chile*, in *Conference Flavobacterium 2009*. Paris, France<<https://colloque2.inra.fr/flavobacterium/content/.../1/.../22Avendano.pdf>>, [consulta: julio 2013].
8. Henríquez-Núñez, H., O. Evrard, G. Kronvall y R. Avendaño-Herrera., *Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of Flavobacterium psychrophilum strains isolated in Chile*. Aquaculture, 2012. **354–355**(0):38-44.
9. Cárdenas, F.C. *ANTIBIOTICOS Y ACUICULTURA UN ANALISIS DE SUS POTENCIALES IMPACTOS PARA EL MEDIO AMBIENTE, LA SALUD HUMANA Y ANIMAL EN CHILE*. Análisis de Política Públicas, 2003. **17**.
10. Burrige, L., J. Weis, F. Cabello, J. Pizarro y K. Bostick, *Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects*. Aquaculture, 2010. **306**(1-4): 7-23.
11. SERNAPESCA, 2013. *Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional 2012*. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=6889>, [consulta: julio 2013].
12. SERNAPESCA, 2012, *Informe sobre uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2011*. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=6156>, [consulta: julio 2013].

13. SERNAPESCA, 2011, *Informe sanitario de la acuicultura 2011*. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=5594>, [consulta: julio 2013].
14. Rust, M.B., E.H. John, and W.H. Ronald, *Nutritional Physiology*, in *Fish Nutrition (Third Edition)*. 2003, Academic Press: San Diego. p. 367-452.
15. Sugita, H., J. Kawasaki, and Y. Deguchi, *Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish*. Letters in Applied Microbiology, 1997. **24**(2): 105-108.
16. Austin, B., *The Bacterial Microflora of Fish*. TheScientificWorldJOURNAL, 2002. **2**: 558-572.
17. Hovda, M.B., B. Lunestad, B. Tore, R. Fontanillas y J. T. Rosnes, *Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Aquaculture, 2007. **272**(1-4): 581-588.
18. R. Fuller, A., *Probiotics in man and animals*. Journal of Applied Microbiology, 1989. **66**(5): 365-378.
19. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W.Verstraete , *Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): 655-71.
20. Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, J. L. Muzquiz, *The role of probiotics in aquaculture*. Vet Microbiol, 2006. **114**(3-4): 173-86.
21. A Jöborn, J. C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway y S. Kjelleberg, *Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1*. The Journal of Fish Diseases, 1997. **20**(5): 383-392.
22. Balcazar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Girones y J. L. Muzquiz, *In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens*. Vet Microbiol, 2007. **122**(3-4): 373-80.
23. Brunt, J., A. Newaj-Fyzul, and B. Austin, *The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*. J Fish Dis, 2007. **30**(10): 573-9.
24. Ferguson, R.M.W., D. Merrifield, L. Harper, G. M. Rawling, M.D. Mustafa, S. Picchietti, et al., *The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (Oreochromis niloticus)*. Journal of Applied Microbiology, 2010. **109**(3): 851-862.
25. Lallemand. *BACTOCELL®: el Primer Probiótico Autorizado para su uso en Acuicultura en la Unión Europea*. 2009 Tuesday, Septiembre 1st, 2009 [cited 2010 Thursday, December 16 th, 2010]; Available from: <<http://www.lallemandanimalnutrition.com/market-outlook-product-development/probiotics/bactocell-the-first-probiotic-authorized-for-use-in-aquaculture-in-the-european-unionbactocell%C2%AE-le-premier-probiotique-autorise-en-europe-pour-l%E2%80%99aquaculture>>.
26. Sealey, W.M., F. Barrows, C. Smith, K. Overturf y S. LaPatra, *Soybean meal level and probiotics in first feeding fry diets alter the ability of rainbow trout Oncorhynchus mykiss to utilize high levels of soybean meal during grow-out*. Aquaculture, 2009. **293**(3-4): 195-203.

27. Decamp, O., D.J.W. Moriarty, and P. Lavens, *Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America*. Aquaculture Research, 2008. **39**(4): 334-338.
28. El-Haroun, E.R., A.M.A.S. Goda, and M.A. Kabir Chowdhury, *Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.)*. Aquaculture Research, 2006. **37**(14): 1473-1480.
29. Ringø, E. and F.-J. Gatesoupe, *Lactic acid bacteria in fish: a review*. Aquaculture, 1998. **160**(3-4): 177-203.
30. Villamil, L., A. Figueras, M. Planas y B. Novoa, *Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics*. Aquaculture, 2003. **219**(1-4): 43-56.
31. Balcázar, J.L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J.L. Muzquiz y O. Girones, *Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish*. Aquaculture, 2008. **278**(1-4): 188-191.
32. Vine, N.G., W. D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter y T. Hecht, *Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus*. J Fish Dis, 2004. **27**(6): 319-26.
33. Kim, D.H. and B. Austin, *Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics*. Fish Shellfish Immunol, 2006. **21**(5): 513-24.
34. Salinas, I., A. Cuesta, M.A. Esteban y J. Meseguer, *Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses*. Fish Shellfish Immunol, 2005. **19**(1): 67-77.
35. Balcazar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, C.A. Calvo, I. Marquez, et al., *Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*)*. Br J Nutr, 2007. **97**(3): 522-7.
36. E. Capkin, I.A., *Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **106**(4): 1147-1153.
37. Vendrell, D., J.L. Balcazar, I.de Blas, I.Ruiz-Zarzuela, O. Girones, J.Luis Muzquiz, *Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2008. **31**(4): 337-45.
38. Moreno, C., J. Romero, and R.T. Espejo, *Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio**. Microbiology, 2002. **148**(4): 1233-1239.
39. Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu y A. Querol, , *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. Int J Syst Bacteriol, 1999. **49**(1): 329-337.
40. Castillo, D., G. Higuera, M. Villa, and R. Espejo, *"Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids"*. Journal of fish diseases, 2011.
41. Navarrete, P., R.T. Espejo, and J. Romero, *Molecular Analysis of Microbiota Along the Digestive Tract of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)*. Microb Ecol, 2009. **57**(3): 550-61.
42. Gatesoupe, F.J., *Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development*. Aquaculture, 2007. **267**(1-4): 20-30.

43. Nayak, S.K., *Probiotics and immunity: A fish perspective*. Fish & Shellfish Immunology, 2010. **In Press, Corrected Proof**.
44. Vázquez, J.A., M.P. González, and M.A. Murado, *Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish*. Aquaculture, 2005. **245**(1-4): 149-161.
45. Robertson, P.A.W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams and B. Austin, *Use of Carnobacterium sp. as a probiotic for Atlantic salmon (Salmo salar L.) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum)*. Aquaculture, 2000. **185**(3-4): 235-243.
46. Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. M. Eseguer, D. Tovar-Ramirez, F. Ascencio-Valle y M. Á. Esteban, *Oral delivery of live yeast Debaryomyces hansenii modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (Sparus aurata L.)*. Fish & Shellfish Immunology, 2008. **25**(6): 731-739.
47. Merrifield, D.L., G. Bradley, G. M. Harper, R. T. M. Baker, C. B. Munn and S. J. Davies, *Assessment of the effects of vegetative and lyophilized Pediococcus acidilactici on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum)*. Aquaculture Nutrition, 2011. **17**(1): 73-79.
48. Korkea-aho, T.L., J. Heikkinen, K. D. Thompson, A. von Wright and B. Austin, *Pseudomonas sp. M174 inhibits the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Applied Microbiology, 2011. **111**(2): 266-277.
49. Burbank, D.R., D. H. Shah, S.E. LaPatra, G. Fornshell and K. Cain, *Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquaculture, 2011. **321**(3-4): 185-190.
50. Mouriño, J.L.P., F. Do Nascimento Vieira, A. B. Jatobá, B. C. Da Silva, G. F. A. Jesus, Q. Seiffert and M. L. Martins, *Effect of dietary supplementation of inulin and W. cibaria on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (Pseudoplatystoma sp.)*. Aquaculture Nutrition, 2012. **18**(1): 73-80.
51. Balcázar, J.L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés y J. L. Muzquiz, *Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2007. **51**(1): 185-193.
52. Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, D. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas and I. Ruiz-Zarzuela, *Expression of immune-related genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) induced by probiotic bacteria during Lactococcus garvieae infection*. Fish & Shellfish Immunology, 2011. **31**(2): 196-201.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación alimento adicionado con microorganismos

- Se escoge el grupo de peces a ser tratados con la dieta.
- Se estima la cantidad de peces y el peso de éstos.
- Se realiza cálculo de la cantidad de alimento a suministrar diariamente a los peces, que puede ser entre 1 y 6% de su peso diario (en éste caso en particular fue del 2% de su peso).
- Se calcula la cantidad de bacterias a agregar a la dieta, según el peso estimado de alimento diario a suministrar y la cantidad de días que se realizará el ensayo (en este caso fue de 1×10^9 m.o./gr. almto).
- Se ajusta la cantidad de microorganismos a utilizar y se suspenden en PBS (la cantidad de PBS a utilizar sería de 1% del peso total de alimento)
- El alimento es dispersado sobre un plástico y rociado con la suspensión de microorganismos, teniendo la precaución de ir moviendo constantemente el alimento para que se absorba de forma homogénea.
- Para finalizar se rocía aceite sobre el alimento (2% peso alimento), moviendo constantemente para homogeneizar todo.
- Se almacena en bolsa tipo “Ziploc” a temperatura ambiente.