ESTUDIO DE LAS CUALIDADES INMUNOESTIMULANTES DE NUEVAS BACTERIAS PROBIÓTICAS ASOCIADAS AL CULTIVO DE *LITOPENAEUS VANNAMEI*

Mariel Gullian[1], Jenny Rodríguez[2]
[1]Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar - ESPOL
[2]Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas - CENAIM

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria camaronera en la última década, ha estado caracterizado por el surgimiento de muchas restricciones en la producción, entre ellas la más importante es la ocurrencia de enfermedades infecciosas. Desde 1994 la producción mundial de camarón ha mantenido su mismo volumen, donde el aumento de producción en las zonas que se recuperan de las enfermedades, no es compensado por el descenso registrado en las zonas donde aún se están padeciendo. En Taiwan por ejemplo, la producción de camarón en el año 1987-88 decayó mas del 60% debido a una masiva mortalidad causada por agentes patógenos. Semejante situación se vive actualmente en Ecuador, enfrentando en el año 2000 la crisis de producción más aguda en su historia a consecuencia del virus de la mancha blanca (WSSV). Al igual que esta afección viral, agentes patógenos bacterianos han estado igualmente implicados. Algunas especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, han sido frecuentemente asociados a mortalidades, siendo responsables de grandes pérdidas económicas tanto en larvicultura como en engorde.

Ante la desesperación del sector productivo, muchas medidas se han tomado para mitigar las pérdidas económicas. El aumento de resistencia, y las condiciones patológicas en las cuales los antibióticos no responden, han llevado a experimentar con una amplia gama de alternativas terapéuticas, la mayoría con éxito relativo. La utilización de bacterias probióticas, basado en el principio de exclusión competitiva de patógenos, y la utilización de la inmunoestimulación como forma natural de defensa de los camarones, son dos de los métodos preventivos más prometedores y controversiales de los últimos tiempos. En este estudio se trabajó en la combinación de las dos estrategias, aislando cepas bacterianas con capacidad probiótica y estimuladora del sistema de defensa de los camarones. Su uso se encamina a etapas postlarvarias de cultivo con el objetivo de incrementar la supervivencia en los estanques de pre-cría, sembrando animales probióticamente protegidos e inmunitariamente estimulados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas bacterianas se aislaron de camarones silvestres adultos (30 ± 5 g) *L. vannamei* capturados de la zona de Manglaralto, Provincia del Guayas, Ecuador. Los camarones fueron seccionados sagitalmente, destinando la mitad de su cuerpo para análisis histológico. De la mitad restante, se extrajo el hepatopáncreas (HP), siendo el único órgano utilizado para el aislamiento bacteriano. Las colonias aisladas fueron seleccionadas en base a sus propiedades de inhibición *in vitro* contra *V. harveyi* (S2), utilizando la técnica descrita por Ruiz *et al.*, (1996). De las 80 aislados, 3 cumplieron con la exigencia de provenir de camarones histológicamente sanos, e inhibir el crecimiento de la cepa patógena S2, identificándose genotípicamente como *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64.

Para determinar la concentración de los inóculos bacterianos a utilizarse en los 3 experimentos, se realizaron las curvas bacterianas de los aislados seleccionadas y de *Vibrio alginolyticus* (Ili) utilizado como probiótico control en el 3er bioensayo. Las curvas permitieron relacionar unidades de densidad óptica (D.O.) y UFC/ml para 16 hrs de cultivo. Los datos fueron relacionados en un gráfico de líneas, obteniéndose la relación UFC *vs* tiempo y *vs* unidades de D.O. por cepa bacteriana.

Mediante la técnica AP-PCR se establecieron los perfiles de RAPDs de las 3 cepas bacterianas, utilizando 3 iniciadores decaméricos, OPA 8, OPA 9 y OPA 10 (Operon Technologies). Las muestras stock amplificadas, se utilizaron como controles positivos en la comparación de perfiles de las bacterias recuperadas del HP, posterior a los experimentos de colonización e interacción. Los productos de amplificación fueron separados utilizando agarosa al 2% y poliacrilamida al 8%.

EXPERIMENTOS

Los camarones de los 3 experimentos se aclimataron por 15 días, con recambio de agua continuo y aireación constante. El agua de mar fue filtrada a 0.5 mm y esterilizada con U.V. La temperatura fue constante 28°C. Se alimentó con balanceado comercial (50% proteína), el cual fue esterilizado diariamente. La inoculación de los acuarios se realizó en la fase de crecimiento exponencial de cada bacteria, en base a las curvas individuales de crecimiento. Se determinó la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando la dosis inoculante a una concentración final de 10^7 UFC/ml por acuario. El método de inóculo fue por inmersión.

Evaluación de la capacidad colonizadora de las bacterias.

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 4 tratamientos y 5 réplicas. La densidad fue de 20 camarones (1 ± 0.3g) cada 50 lts de agua de mar, distribuidos aleatoriamente. Las bacterias utilizadas fueron *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 más un control sin bacterias. Luego de la aclimatación se realizó una única inoculación bacteriana. El tiempo de exposición fue de 24 hrs sin recambio de agua.

Para los aislamientos de recuperación en hepatopáncreas, se utilizaron grupos de 10 HP por réplica, realizándose 5 diluciones seriadas de 1/10 y sembrándose por triplicado en agar Lb 2% NaCl mediante la técnica de difusión en medio sólido. Se incubó a 27.6°C durante 24 hrs. Los porcentajes de colonización se evaluaron contabilizando las UFC/g de HP en base a morfología de las colonias e identificando las bacterias por comparación con los perfiles de RAPDs con las cepas stock. El estado de salud de los camarones, se determinó por histología utilizando 10 animales por réplica.

Efecto de interacción competitiva contra *V. harveyi* (S2)

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 5 tratamientos y 5 réplicas. Las bacterias utilizadas fueron *Vibrio* P62, *Vibrio* P63, *Bacillus* P64 más un control negativo y un control patógeno. La densidad de siembra, el peso de los camarones y la dosis inoculante fue igual al 1er bioensayo. Las bacterias se inocularon durante 3 días consecutivos. Al 4° día del experimento se inoculó *V. harveyi* a una dosis infectante de 10^7 UFC/ml, realizándose un solo inóculo en 24 hrs. Los porcentajes de interacción se evaluaron contabilizando las UFC/g de HP en agar Lb 2% NaCl, en base a características morfológicas e identificándose por comparación con los perfiles de RAPDs de las cepas stock y mediante Dot blot con anticuerpos monoclonales anti S2.

Evaluación de las bacterias como estimuladoras del sistema inmune.

Se utilizaron los aislados *Vibrio* P62, *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* (Ili) como cepa control. El diseño experimental fue completamente aleatorio, con 5 réplicas por tratamiento. Los camarones (1.5 ± 0.2 g) se distribuyeron aleatoriamente en acuarios de 50 litros a razón de 10 animales por acuario. Fueron alimentados con pellet comercial, al 3% de la biomasa, repartido en 2 raciones diarias durante todo el ensayo experimental. La inoculación se realizó cada 2 días con recambio de agua del 50% luego de 20 hrs de exposición. Luego de 10 días de inoculación, se extrajo hemolinfa del *sinus* ventral de los camarones en intermuda. Las pruebas inmunitarias utilizadas para evaluar el efecto estimulante de los probióticos fueron: hemogramas, cuantificación de radicales tóxicos de oxígeno (ROIs), cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO), estimación de la actividad microbicida de la hemolinfa (AA) y cuantificación de proteínas plasmáticas (PP). Para el cálculo del índice inmunitario se consideraron los resultados obtenidos en las 5 pruebas inmunitarias descritas anteriormente. Los valores de cada prueba fueron transformados en base a la siguiente fórmula. Vt = (a-b) x 0.2/ k; siendo (a) el valor de cada prueba inmunológica; (b) valor mínimo de rango de cada prueba; (k) rango de cada prueba, (0.2) corresponde al 20%. El índice inmunitario es la suma de valores (Vt) de los 5 test inmunológicos usados.

Resultados

De las 80 cepas bacterianas aisladas del hepatopáncreas de camarones silvestres, dos (*Bacillus* P64, *Vibrio* P62) cumplieron con la exigencia de provenir de animales sanos, alcanzar altos porcentajes de colonización (> 50%) en camarones de 1g, e inhibir *in vivo* el crecimiento de *V. harveyi*, no provocando daños histológicos a una concentración de inóculo de 10^7 UFC/ml.

Los resultados del experimento de colonización demostraron la capacidad de las bacterias de reingresar al HP. Para las cepas *Vibrio* P62 y *Vibrio* P63 la cantidad total de UFC/g HP no fue significativamente diferente (p>0.05) con el control indicando su alta capacidad de inhibir bacterias autóctonas o bien ejercer un mecanismo de sustitución competitiva de especies. La concentración bacteriana alcanzada en estos tratamientos fue $4.2 \times 10^4 \pm 8.5 \times 10^3$ UFC/g HP. El porcentaje de colonización alcanzado por el *Vibrio* P62 fue 83% demostrando mayor efecto antibacteriano que *Vibrio* P63. En el caso de los camarones inoculados con la cepa *Bacillus* P64 el número total de bacterias fue significativamente mayor (p<0.05), incrementando 68.4% el número total de bacterias en relación al control. Si bien el porcentaje de colonización alcanzado por esta bacteria (58%) fue similar al alcanzado por *el Vibrio* P63 (60%), esta última fue más eficiente en ejercer un efecto de sustitución competitiva de la flora autóctona (Figura 1). No se registraron daños histológicos en los camarones inoculados luego de las 12 hrs de inoculación en ningún tratamiento.

En el experimento de interacción competitiva contra S2 el número total de UFC/g de HP fue significativamente mayor (p<0.05) en los animales inoculados con P62, P63, P64, y S2 (control) con respecto al control sin bacterias. La cepa S2 demostró gran poder de penetración en el HP a pesar de su menor tiempo de exposición. La concentración

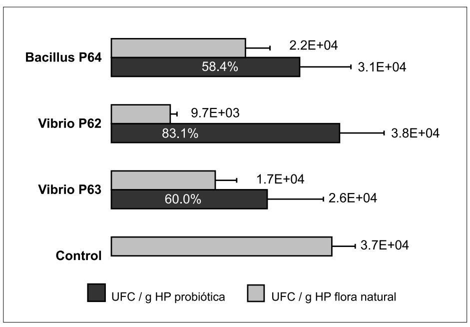

Figura 1. Porcentajes de colonización en el hepatopáncreas, de las bacterias probióticas *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64

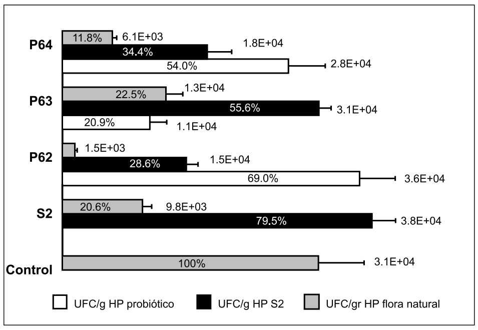

Figura 2. Interacción de las bacterias *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 con *V. harveyi* (S2)

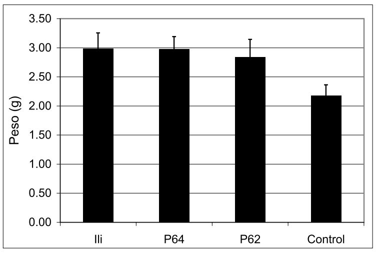

Figura 3. Peso promedio alcanzado por los camarones inoculados con las bacterias *V. alginolyticus* (Ili), *Bacillus* P64 y *Vibrio* P62 luego de 25 días de ensayo.

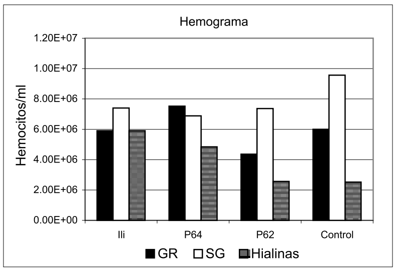

Figura 4. Conteo hemocitario diferencial de la hemolinfa de los camarones estimulados con las bacterias *V. alginolyticus, Bacillus* P64 y *Vibrio* P62.
GR: hemocitos granulosos / SG: hemocitos semigranulosos

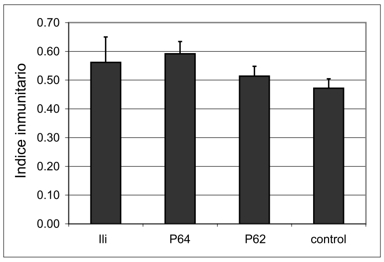

Figura 5. Indice inmunitario global de los camarones estimulados con las bacterias *Vibrio* P62, *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* (Ili)

media alcanzada para los tratamientos con bacterias fue de 5.2 x 10^4 ± 8.2 x 10^3 UFC/g HP. Para el tratamiento control la media alcanzada fue 3.1 x 10^4 ± 5.6 x 10^3 UFC/g HP. La cepa *Vibrio* P62 mostró su efecto antagonista *in vivo* reduciendo la entrada de S2 en un 60%, desplazando además la microflora autóctona. En el caso de *Bacillus* P64 su efecto fue menor, reduciendo la entrada de S2 en un 34 %. La cepa *Vibrio* P63, tuvo un efecto débil frente al patógeno, logrando solo un 19% inhibición (Figura 2).

En el bioensayo de inmunoestimulación, se registró el peso de los camarones al inicio y final del periodo experimental observándose incremento significativo en el peso promedio de los camarones con las cepas *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (Ili) respecto al control (Figura 3). El número total de hemocitos y la concentración total de proteínas plasmáticas en los 3 tratamientos, se mantuvo dentro de los valores normales, indicando que la administración de las cepas bacterianas no deterioró la salud de los camarones (Figura 4). La hemolinfa de los animales inoculados, no mostró modificaciones en actividad antibacteriana, pero la activación del sistema PO, y los cambios en la fórmula hemocitaria, fueron indicativos de alerta inmunitaria (Tabla 1). Los camarones estimulados con las bacterias *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* (Ili), no mostraron cambios significativos del NBT, sin embargo la cantidad de células hialinas fue significativamente menor ($p<0.05$) en los animales tratados con *Vibrio* P62 (2.56 x 10^6 ± 1.15 x 10^6 cel/ml) que con Ili (5.9 x 10^6 ± 2.4 x 10^6 cel/ml) y *Bacillus* P64 (4.84 x 10^6 ± 1.68 x 10^6 cel/ml). El número de hemocitos GR no fue significativamente diferente ($p>0.05$) entre los tratamientos y el control, sin embargo en porcentaje, su concentración fue mayor en los camarones estimulados con *Bacillus* P64. Los valores de fenoloxidasa fueron significativamente mas altos ($p<0.05$) en los animales estimulados con *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (Ili) indicando que si bien la población de GR se mantuvo constante, estas células fueron fuertemente estimuladas elevando la concentración de PO. La generación de compuestos intermediarios de oxígeno (ROIs), no se incrementó significativamente ($p>0.05$) en los animales tratados con respecto al control. Es probable que éste mecanismo celular, posea un pico de activación horas después del ingreso de alta carga antigénica, pero los productos intermediarios generados disminuyan paulatinamente en relación al agotamiento enzimático.

El índice inmunitario global fue significativamente mayor ($p<0.05$) en los animales estimulados con *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* con respecto al control (Figura 5). Para los animales estimulados con *Vibrio* P62, el índice inmunitario global fue similar al control, siendo probable que su alto poder de colonización esté vinculado a la evasión de las barreras celulares y humorales de defensa.

Tabla 1. Resultados de las pruebas inmunitarias en los tratamientos con las bacterias *V. alginolyticus* (Ili),*Vibrio* P62 y *Bacillus* P64

	Ili	P64	P62	Control
Tasa NBT	1.18±0.08	1.20±0.09	1.15±0.11	1.11±0.05
Inhibición bacteriana (%)	8.5±5.6	20.6±8.7	25.4±13.7	30.0±9.0
Proteinas plasmáticas (mg/ml)	112.1±8.1	102.6±3.9	97.7±6.0	104.3±8.6
Fenoloxidasa (D.O.)	670±0.02[a]	738±0.08[a]	661±0.07[a]	449±0.05[b]

CONCLUSIONES

En este estudio demostramos como las bacterias benéficas aisladas de la microflora autóctona del HP, son competidoras potenciales de bacterias patógenas. Los resultados de interacción con *V. harveyi* (S2) indicaron que es posible disminuir la instalación de esta cepa en el HP, por lo que podemos afirmar que la naturaleza probiótica de las cepas inoculadas, se basa en la disminución del establecimiento del patógeno dentro del hospedero disminuyendo de esa forma el riesgo de enfermedad.

La inoculación de las cepas *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64 durante 10 días, mejoró la salud general de los camarones, los cuales aumentaron significativamente de peso con respecto al control. La cantidad total de hemocitos y la cantidad total de proteínas plasmáticas de la hemolinfa no se vieron afectados. La cepa *Bacillus* P64 demostró estimular el sistema inmune de los camarones, logrando diferencias significativas en el índice inmunitario general con respecto al control, igual comportamiento tuvo el *V. alginolyticus* (Ili). Sin embargo el *Vibrio* P62 no puede ser descartado como probiótico estimulante, ya que su valor de PO indica que el sistema inmune de los camarones no es totalmente indiferente al ingreso de ésta cepa.

Debemos tener claro que éste estudio es una primera etapa que abre camino hacia un mejor conocimiento de las bacterias benéficas asociadas a los camarones y sus relaciones de interacción. Los resultados obtenidos con *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64, demuestran que estas cepas bacterianas son prometedoras para establecerse en un futuro como probióticos en la prevención de enfermedades del camarón, siendo el objetivo principal explotar sus beneficios limitando la aparición de bacterias patógenas en los cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

Ruiz, C.M., Roman, G. y Sánchez, J.L. 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. Aquaculture International 4: 289-291.