



T
639.54
5VL

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias
probióticas asociadas al cultivo de
Penaeus vannamei”**

Requisito para optar al grado de

MAGISTER EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD ACUICULTURA MARINA

Mariel Gullian Klanian



2001

TESIS ELABORADA CON EL SUPORTE DE:



FUNDACION CENAIM-ESPOL



COOPERACION TECNICA BELGA



**UNIVERSIDAD DE GANTE
BELGICA**

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN**

**UNIVERSIDAD CATOLICA
DE LOBAINA – BELGICA**

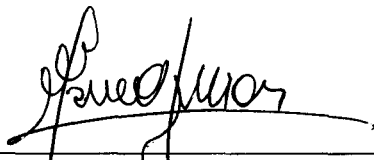
VITA

Mariel Gullian Klanian nació en el 5 de agosto de 1968 en Montevideo, Uruguay. Se graduó como Bachiller en Medicina en diciembre de 1987, Montevideo, Uruguay. Asistió a la Universidad de la República Oriental del Uruguay, Facultad de Veterinaria graduándose como Doctora en Medicina y Tecnología Veterinaria en diciembre, 1997. Obtuvo especialización en Acuicultura en el Instituto de Investigaciones Pesqueras “Prof. Dr. Victor **Bertullo**” perteneciente a la Universidad de la República Oriental del Uruguay en octubre, 1993. Luego de trabajar como investigador asistente en la cátedra de Patología de Organismos Acuáticos - Facultad de Veterinaria, 1997, Uruguay; intervino en un proyecto de investigación en el Laboratorio de camarones marinos de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil. En octubre de 1999 fue aceptada por la Escuela Superior Politécnica del Litoral y completó su maestría en Ciencias con especialidad en Acuicultura Marina en octubre del 2001.

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



Mariel Sullivan Klanian

TRIBUNAL DE TESIS



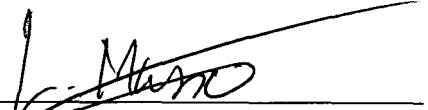
Ing. Eduardo Cervantes
Presidente del Tribunal



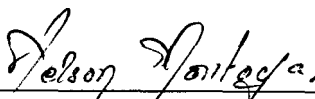
Jenny Rodríguez, Ph.D.
Director de Tesis



Jorge Calderón V., Ph.D.
Miembro del Tribunal



Laurence Massaut, Ph.D.
Miembro del Tribunal



Nelson Montoya, M.Sc.
Miembro del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a todas las personas que han colaborado de una u otra forma en la realización de ésta tesis.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su director Dr. Jorge Calderón, por haberme dado la oportunidad de culminar una etapa mas en mi vida profesional.

A la Administración General de Cooperación al Desarrollo – Bélgica quien brindó el financiamiento para que éste trabajo fuera posible.

A la Dra. Jenny Rodríguez, por demostrarme su confianza a cada instante.

A Ecuador, país que ha puesto a prueba mi fuerza espiritual.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	Iv
INDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VII
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	
1.1. LOS PROBIÓTICOS	3
1.1.1. Mecanismo de acción de los probióticos	3
1.1.2. Selección de las cepas candidatas a probióticos..	4
1.1.3. Concepto de colonización	5
1.1.4. Pruebas de antagonismo contra patógenos	6
1.2. LA RESPUESTA INMUNE EN CRUSTACEOS..	7
1.2.1. Métodos para el estudio de la respuesta inmune	7
1.2.1.1. Hemograma..	7
1.2.1.2. Cuantificación de radicales intermediarios de oxígeno (ROIs).....	8
1.2.1.3. Sistema fenoloxidasa (PO)	9
1.2.1.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana	9
1.2.1.5. Determinación de la concentración proteica del plasma	10
1.2.2. Estimulación de la respuesta inmune	11
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	12
2.2. METODOLOGIA	12
2.2.1. Técnicas microbiológicas	12
2.2.1.1. Aislamiento bacteriano	12
2.2.1.2. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	13
2.2.1.3. Identificación fenotípica bacteriana..	13
2.2.1.4. Conteo de las poblaciones bacterianas	14
2.2.2. Histopatología	15

2.2.3. Técnicas de biología molecular	15
2.2.3.1. Extracción y cuantificación del ADN bacteriano	15
2.2.3.2. Selección de los iniciadores y condiciones de amplificación..	16
2.2.4. Primer bioensayo: Evaluación de la capacidad colonizadora de bacterias probióticas	16
2.2.4.1. Preparación de los inóculos bacterianos	17
2.2.4.2. Diseño experimental	17
2.2.5. Segundo bioensayo: Estudio de interacción <i>in vivo</i> entre bacterias probióticas y <i>V. haweyi</i> (S2).	18
2.2.5.1. Diseño experimental	18
2.2.6. Tercer bioensayo: Evaluación de las bacterias como estimuladoras del sistema inmune	19
2.2.6.1. Diseño experimental	19
2.2.7. Técnicas inmunitarias	20
2.2.7.1. Hemograma.....	20
2.2.7.2. Producción de anión superóxido.....	20
2.2.7.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)	20
2.2.7.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (AA)	21
2.2.7.5. Concentración de proteínas plasmáticas (PP).....	21
2.2.7.6. Cálculo del índice inmunitario	21
2.2.8. Pruebas inmunitarias <i>in vitro</i> para la evaluación de la interacción probiótico plasma	22
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento bacteriano	23
3.2. Pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	23
3.3. Identificación fenotípica bacteriana.....	23
3.4. Cuantificación de poblaciones bacterianas	25
3.5. Identificación genotípica bacteriana	27
3.6. Evaluación de la capacidad colonizadora de las bacterias probióticas	28
3.7. Interacciones <i>in vivo</i> entre bacterias probióticas y S2	29

3.8. Evaluación de las bacterias como estimuladoras de la respuesta inmune	30
3.8.1. Hemograma	30
3.8.2. Producción de anión superóxido	31
3.8.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa	32
3.8.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma..	32
3.8.5. Concentración de proteínas plasmáticas	32
3.8.6. Índice inmunitario global	32
4. DISCUSIÓN	34
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES	46
7. REFERENCIAS	48
8. ANEXO	

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Halos de inhibición utilizando bacterias vivas (a) y bacterias muertas (b).	23
Fig. 2. Análisis de similitud de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 con los géneros <i>Aeromona</i> , <i>Pseudomona</i> y <i>Vibrio</i>	25
Fig. 3. Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> P62	25
Fig. 4. Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> P63	25
Fig. 5. Curva de crecimiento de <i>Bacillus</i> P64.....	26
Fig. 6. Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> P65	26
Fig. 7. Curva de crecimiento de <i>Vibrio</i> P66	26
Fig. 8. Curva de crecimiento de <i>Pseudomona</i> P67	26
Fig. 9. Curva de crecimiento de <i>V. alginolyticus</i> (Ili).....	26
Fig. 10. Perfiles. de RAPDs en geles de poliacrilamida utilizando los iniciadores, OPA9 y OPA10.....	27
Fig. 11. Porcentajes de colonización de bacterias P62, P63, P64, P65, P66, P67 e Ili ...	28
Fig. 12. Interacción de las bacterias P62, P63, P64 con <i>V. harveyi</i> (S2).	29
Fig. 13. Peso promedio alcanzado de los camarones luego de 20 días de ensayo..	30
Fig. 14. Cantidad de células plasmáticas en los tratamientos P62, P64, Ili y control	31
Fig. 15. Proporción hemocitaria en los tratamientos P62, P64, Ili y control.	31
Fig. 16. Comparación de los valores de densidad óptica para la cuantificación de la actividad fenoloxidasas de las bacterias Ili, P64, P62 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	32
Fig. 17. Índice Inmunitario global de los animales inoculados con las bacterias P62, P64, Ili.....	32

NDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diámetros de los halos</i> de inhibición	23
<i>Tabla 2. Identificación fenotípica de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 en base a criterios morfológicos y bioquímicos</i>	24
<i>Tabla 3. Valores inmunitarios de camarones estimulados con Ili, P64, P62 y control...</i>	3 1

ABREVIATURAS

AA	Actividad antibacteriana
AFLP	Polimorfismo de longitud en fragmentos amplificados
AP-PCR	Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente
BG	Betaglucanos
Cac	Acido cacodílico
dNTP _s	desoxinucleótido trifosfato
DHC	Conteo hemocitario diferencial
D.O.	Densidad óptica
DOPA	dihidroxifenilalanina
GR	Granulosos
HH	Hialinos
HP	Hepatopáncreas
Ili	Cepa probiótica de <i>Vibrio alginolyticus</i>
Lb agar	Agar Luria Bertani
Lb-broth	Caldo Luria Bertani
LPS	Lipopolisacáridos
NBT	Nitro blue tetrazolium
NHT	Número total de hemocitos
OPA	Código de oligonucleótidos sintéticos
PG	Peptidoglucanos
PO	Fenoloxidasa
PP	Proteínas plasmáticas
ProPO	Profenoloxidasa
RAPD	Patrones de polimorfismo aleatorio de ADN
ROIs	Radicales intermediarios de oxígeno
S11	Cepa de <i>Bacillus</i>
S2	Cepa patógena de <i>Vibrio harveyi</i>
SG	Semigranulosos
Taq	Enzima polimerasa de <i>Termus acuaticus</i>
THC	Conteo hemocitario total
UFC	Unidad formadora de colonias

RESUMEN

Aunque la utilización de productos químicos sea una práctica común para el control de patologías, la tendencia actual es restringir el uso de drogas evitando los efectos secundarios que ocasiona su uso indiscriminado. Considerando la experiencia **obtenida** en laboratorios de cultivo lar-vario en Ecuador, el uso de probióticos parece ser una alternativa potencial en la prevención de las enfermedades bacterianas que afectan a los peneidos.

El objetivo de este trabajo ha sido obtener cepas bacterianas probióticas con cualidades inmunoestimulantes. Ochenta cepas bacterianas fueron aisladas del hepatopáncreas de camarones silvestres sanos. Los camarones fueron capturados en San Pablo (Prov. Guayas, Ecuador) y tuvieron un peso de $30 \pm 3g$. Dos técnicas de inhibición *in vitro* contra *Vibrio harveyi* (cepa S2) fueron utilizadas para comprobar su efecto probiótico. Seis aislados bacterianos registrados como P62, P63, P64, P65, P66, P67 mostraron tener un efecto inhibidor sobre el patógeno. Los resultados de caracterización fenotípica clasificaron las cepas P62, P63, P65 y P66 como *Vibrio*, la cepa P64 como *Bacillus* y la cepa P67 como *Pseudomona*. Los porcentajes de colonización *in vivo* en animales de $1 \pm 0.2g$,fueron analizados utilizando perfiles de RAPDs con 3 iniciadores. Las cepas P62, P63 y P64 lograron porcentajes de colonización de 83, 61 y 58% respectivamente. La cepa *Vibrio* P65 fue descartada por causar danos histopatológicos. *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili) utilizado como probiótico control, logró un 22% de colonización. El porcentaje de competencia probiotico *versus* patógeno (S2) fue evaluado *in vivo* mediante RAPDs y anticuerpos monoclonales contra S2. Con la cepa *Vibrio* P62 se obtuvo un porcentaje de inhibición de entrada del patógeno del 54%. La histopatología realizada de rutina luego de los bioensayos de colonización y de interacción, ratificó la inocuidad de *Bacillus* P64 y *Vibrio* P62, P63, P66 y *Pseudomona* P67. El efecto inmunoestimulante *in vivo*, fue evaluado mediante varias pruebas inmunitarias en animales tratados con las bacterias probióticas seleccionadas. El índice inmunitario global fue mayor en los camarones inoculados con los aislados *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* con respecto al control. El peso promedio de los animales tratados con *Vibrio* P62, *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* fue significativamente mayor, con respecto al control no tratado.

productores de camarón, disponen de pocas estrategias efectivas para manejar los cultivos frente a las enfermedades.

Muchas investigaciones están siendo direccionadas en el desarrollo de técnicas preventivas que reduzcan la incidencia de patologías. 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.

Considerando la experiencia de cultivos de camarón en Indonesia, el uso de bacterias probióticas ha demostrado ser eficiente en la sustitución de especies bacterianas relacionadas a la vibriosis (Moriarty 1998). Por otro lado, la estimulación del sistema inmune utilizando moléculas microbianas, como lipopolisacáridos, peptidoglucanos y β -glucanos, es una estrategia para aumentar la resistencia a patógenos, en particular a los virus para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos.

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 encaminaría 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.

1. ANTECEDENTES

A lo largo de la historia la palabra probiótico ha adquirido una diversidad de usos. Su concepto nace a principios de siglo con los trabajos de Metchnikoff, quien sostenía que la ingestión de microorganismos benéficos, era un buen mecanismo de control contra el establecimiento de microorganismos patógenos (Gatesoupe 1999). Desde entonces, la utilización de bacterias benéficas como control biológico en la producción de animales terrestres, ha sido ampliamente estudiada, logrando igualar estrategias preventivas más modernas y constituyéndose en un método de uso rutinario.

En ambientes acuáticos, aún es muy poco lo que se conoce en materia de prevención. Actualmente, con el aumento de la resistencia a los antibióticos, algunos estudios se han realizado intentado modificar la flora bacteriana presente en sistemas de acuicultura, con el fin de prevenir enfermedades y aumentar la producción (Zherdmant et **al.** 1997; Moriarty 1998). Se han usado bacterias con potencial para mejorar la descomposición de materia orgánica, reducir las concentraciones de nitrógeno y fósforo, mejorar el crecimiento de las algas, controlar amonio y nitrito, disminuir la incidencia de enfermedades y aumentar la supervivencia (Boyd y Massaut 1999). Esta diversidad de usos ha creado confusión en la definición original y en el uso del término probiótico, utilizándose en varias ocasiones con referencia a bacterias o algas mejoradoras de la calidad de agua de cultivo, y dejando de lado el concepto inicial que engloba la colonización en el hospedero. De acuerdo con Karunasagar et **al.** (1999) el término más apropiado para estos casos sería el de “bioremediadores”, utilizándose la palabra “probiótico” para referirse exclusivamente a las células microbianas que permanecen vivas dentro del huésped (Fuller 1989; Gatesoupe 1999) y son capaces de mejorar su salud por recuperación del equilibrio interno microbiano (Gram et **al.** 1999).

1.1. LOS PROBIÓTICOS

1.1.1. Mecanismo de acción de los Probióticos

Han sido reportados varios mecanismos por los cuales las bacterias probióticas ejercen su acción, El mecanismo de exclusión competitiva, basado en la sustitución de

la población patógena por la población benéfica, ha sido considerado de gran importancia por varios autores (Fuller 1989; Wang *et al. fide*; Gatesoupe 1999). Ellos mencionan, que ésta sustitución se lograría por la producción de compuestos antibacteriales, competición por nutrientes o por sitios de adhesión. Mecanismos como estimulación de la inmunidad y producción de enzimas digestivas para la degradación de tendrían directa intervención del huésped nutrientes (Fuller 1989).

1.1.2. Selección de las cepas candidatas a Probióticos

Uno de los problemas primordiales en la obtención de bacterias probióticas es su forma de selección. De acuerdo con Gomez y Roque (1998), en muchas ocasiones el proceso de selección utilizado es de connotación empírica y con limitada evidencia científica, comprometiendo en gran parte los resultados. Es primordial que las bacterias candidatas cumplan ciertos requisitos. Aspectos como el potencial de colonización, habilidad de competencia con patógenos, capacidad de incrementar la resistencia a las enfermedades, son características sustanciales que deben ser consideradas en la selección (Gatesoupe 1999; Gomez *et al. 2000*).

Naturalmente, las cepas deben ser benéficas para el animal. Dentro del huésped, deben estar presentes en gran número como células viables y ser capaces de sobrevivir dentro del órgano colonizado, no afectando el crecimiento, ni induciendo resistencia a antibióticos que comprometan la terapia (Fuller 1989). Finalmente, deben ser estables en el almacenamiento y permitir su producción en grandes volúmenes. La experimentación a escala comercial es definitiva y no debemos conformarnos con mejorar supervivencia, sino que es importante que el crecimiento y la ganancia de peso no se vean afectados. Si la cepa es adecuada, el paso siguiente sería la evaluación económica del probiótico a escala comercial (Gomez y Roque 1998).

La flora autóctona es de manera innata, una defensa natural para el hospedero, sin embargo este concepto ha llevado a controversias en la selección de los géneros probióticos para el camarón, ya que entre ellos se encuentran especies patógenas potenciales (Lightner 1983; Monhey *et al. 1994*).

La mayoría de los intentos en aislar cepas probióticas han sido seleccionando bacterias del medio de cultivo de crustáceos (Nogami y Maeda 1992; Direkbusarakom

et al. 1997; Rengpipat et al. 1998; Tanasomwang et al. 1998). Otros investigadores en cambio, han aislado del intestino de diferentes especies de peneidos (Wang et al. *vide*; Rengpipat et al. 2000). Dentro de las bacterias aisladas, la mayoría corresponden al género *Vibrio*. Se ha reportado el uso de las siguientes especies: *Vibrio alginolyticus* (Garriques y Arévalo 1995; Griffith 1995), *Vibrio fluvialis* y *Vibrio campbellii* (Wang et al. *vide*). Sin embargo se han utilizado con éxito cepas de *Bacillus* spp. (Moriarty 1998; Rengpipat et al. 1998, Rengpipat et al. 2000) y *Thalassobacter utilis* (Maeda y Liao 1992). Sí bien Gomez et al. (1998) demostraron la existencia de una diversidad de especies de Vibrios en el hepatopáncreas de camarones sanos de la especie *Penaeus vannamei*, en la actualidad no hay reportes de haber utilizado ningún aislado del hepatopáncreas como probiótico.

1.1.3. Concepto de colonización

El concepto de colonización ha sido bien definido en la literatura, sin embargo poco se ha probado experimentalmente en camarones. Tal como lo define Fuller (1989), la colonización es el proceso por el cual los microorganismos ingresan en el huésped y se mantienen viables, siendo aquellos de rápido crecimiento los que presentan mayor habilidad de penetración. Este mismo autor menciona que la supervivencia del probiótico dentro del huésped, no solo depende de su viabilidad y adaptación a las condiciones del órgano colonizado, sino que en muchos casos, los microorganismos deben resistir los mecanismos antibacteriales, enzimáticos y mecánicos que dificultan la llegada al órgano blanco (1989).

Si bien lograr la colonización es el primer paso del proceso, existe otro desafío que las cepas probióticas deben enfrentar y del cual depende su permanencia. La capacidad de adherirse a las células colonizadas y multiplicarse es un aspecto importante a considerar (Gatesoupe 1999). De esta manera el probiótico logra el efecto antagónico, pudiendo permanecer dentro del huésped formando parte de su microflora. Conocer el tiempo de adherencia, es básico en el establecimiento de frecuencias de administración del inóculo bacteriano en los sistemas de cultivo. Así, aquellas bacterias que se adhieren a las células hospederas, pueden administrarse a intervalos más

prolongados que aquellas que no se adhieren, las cuales deben ser administradas de manera **continua**.

1.1.4. **Pruebas de antagonismo contra patógenos**

El antagonismo entre las bacterias marinas es un mecanismo común. Su acción antagónica no sólo depende de la producción de antibióticos, sino que también puede deberse a otros compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o péptidos (Fuller 1989; Gatesoupe 1999). La propiedad antagónica ha sido utilizada por varios investigadores en la confrontación patógeno – probiótico. De esta forma, se han realizado pruebas *in vitro* para la selección de cepas probióticas utilizando bacterias extraídas del medio acuático del intestino de camarón, y probando su efecto antagónico frente a patógenos de crustáceos (Rengpipat *et al.*, 1998; Tanasomwang *et al.*, 1998), e incluso de peces (Austin *et al.*, 1995).

En muchos casos, el mecanismo de selección de las bacterias benéficas, no está basado en pruebas de antagonismo *in vitro*. Varios autores, han utilizado los porcentajes de supervivencia logrados en el cultivo como parámetro de decisión, evaluando la relación patógenos - probióticos en el agua. Los primeros trabajos corresponden a Maeda y Liao (1992), quienes utilizaron una cepa de *Thalassobacter utilis* en larvicultura de *Penaeus monodon*, obteniendo aumento de la supervivencia y disminución en el número de colonias de *V. anguillarum* y *Haliphthoros* sp. en el agua. Iguales resultados en supervivencia fueron reportados con el probiótico *V. alginolyticus* para larvas de *P. vannamei* en laboratorios de producción de Ecuador considerando también el concepto de sustitución de especies bacterianas (Garriques y Arévalo 1995; Griffith 1995). Moriarty (1998) reporta mejoras en la supervivencia de *P. monodon* en granjas de Indonesia en las que se suministró la cepa de *Bacillus* S11 como probiótico durante 160 días de cultivo.

Los experimentos de desafío probiótico *versus* patógeno han dado buenos aportes en los estudios de interacción de poblaciones bacterianas en el intestino de los animales inoculados. Como método de identificación, se han utilizado pruebas bioquímicas (Rengpipat *et al.* 1998; Rengpipat *et al.* 2000) y técnicas de identificación antigénica determinando porcentajes de colonización (San Miguel 1996; Zherdmant

1996). La técnica AP-PCR fue utilizada con éxito en la realización de estudios epidemiológicos de vibriosis en larvicultura de *P. vannamei* en Ecuador (Siavichay 1997) pero nunca relacionada a estudios de colonización.

1.2. **LA RESPUESTA INMUNE EN CRUSTÁCEOS**

En los invertebrados la respuesta inmune se presenta en dos fases, una inmediata no inducible asociada a los efectores celulares y una fase inducida humoral caracterizada por la participación de las proteínas plasmáticas y factores microbicidas circulantes que mejoran la eficiencia de la respuesta inmune (Thörnqvist y Söderhäll, 1997).

1.2.1. **MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE**

Los estudios para evaluar los parámetros celulares y humorales como indicadores de la condición del camarón se llevan a cabo con la intención de desarrollar criterios para inspeccionar la sanidad y realizar programas de selección para camarones con alta resistencia a los patógenos. Varios procedimientos cuantitativos han sido adaptados para evaluar la expresión de la respuesta inmune de los peneidos.

Con respecto a los parámetros celulares, el hemograma, la generación de intermediarios de radicales de oxígeno (ROIs) y la actividad fenoloxidasa (PO) han sido considerados como marcadores de salud, ya que sus cambios son correlacionados con el grado de infección y las variaciones ambientales (Muñoz *et al.* 2000; Rodríguez y Le Moullac 2000). De igual forma se puede considerar los parámetros humorales como la actividad antibacteriana del plasma y la concentración de proteínas plasmáticas (Rodríguez y Le Moullac 2000).

1.2.1.1. **Hemograma**

En los crustáceos, los mecanismos celulares involucran directamente a los hemocitos. Existen tres tipos de hemocitos clasificados de acuerdo a su morfología: hialinos (HH) con rol en la coagulación y fagocitosis (Omori *et al.* 1989; Vargas-

Albores *et al.* 1998), semigranulosos (SG) vinculados a los procesos de fagocitosis, encapsulación y nodulación (Söderhäll y Cerenius 1992; Rodríguez *et al.* 1995), y granulosos (GR) que contienen enzimas que forman parte del sistema profenoloxidasa (proPO) (Smith y Söderhäll 1983; Hernández *et al.* 1996).

El hemograma consiste en el conteo hemocitario total (THC) y el conteo hemocitario diferencial (DHC), de acuerdo a los 3 tipos de hemocitos. El conteo hemocitario total tiene relación con la resistencia a patógenos (Rodríguez y Le Moullac 2000). Le Moullac *et al.* (1998) reportaron que camarones *Penaeus stylirostris* con un bajo THC sometido a una situación de hipoxia, eran más sensibles a la infección con *V. alginolyticus* virulento, encontrando el DHC alterado con una significativa disminución de hemocitos hialinos y semigranulosos.

La importancia fisiológica del número y la composición de los hemocitos, son también observadas con relación al ciclo de muda. Le Moullac *et al.* (1998) reportaron un THC más alto durante la postmuda y más bajo en intermuda. Los mismos autores mencionan que la alta concentración de hemocitos granulosos en la hemolinfa de *P. stylirostris* durante el periodo de intermuda, puede ser responsable de la alta actividad PO y resistencia a la vibriosis (2000).

1.2.1.2. Cuantificación de radicales intermediarios de oxígeno (ROIs)

La fagocitosis es la reacción más común de defensa celular. Durante ella, partículas o microorganismos son internalizados dentro de la célula formando una vacuola digestiva llamada fagosoma (Rodríguez y Le Moullac 2000). La eliminación de las partículas fagocitadas implica la intervención de enzimas degradativas dentro del fagosoma y la generación de ROIs (Bachère *et al.* 1995; Muñoz *et al.* 2000). Este proceso destructivo es conocido como choque respiratorio, y conduce a la activación de una enzima de membrana NAD(P)H oxidasa que cataliza la reducción parcial del oxígeno en anión superóxido (O_2^-). A partir de ahí, ocurren varias reacciones celulares que llevan a la producción de peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y “singlet” de oxígeno (Klein 1982; Babior 1988; Song y Hsieht 1994; Muñoz *et al.* 2000).

En *P. vannamei*, Muñoz *et al.* (2000) trabajaron en la simplificación de un procedimiento para medir el anión superóxido mediante la reducción de NBT. Mediante

esta prueba es posible evaluar varias actividades inmunológicas como reconocimiento, fagocitosis y citotoxicidad (Bachère *et al.* 1995). Dichas actividades pueden ser estimuladas por componentes solubles como acetato de myristate de phorbol, lipopolisacáridos o zymosan (paredes de levaduras) (Vargas-Albores *et al.* 1998). Según Muñoz *et al.* (2000) el ensayo de reducción de NBT es una herramienta interesante para los estudios de las interacciones patógenos - probióticos en el camarón. Su información proporciona un criterio de susceptibilidad en el nivel de resistencia de los animales y representa una alternativa para determinar el estado de salud del camarón en cultivo.

1.2.1.3. Sistema fenoloxidasa (PO)

La proPO es una proenzima que se encuentra el interior de los hemocitos granulares (Vargas-Albores *et al.* 1997). Por estimulación de componentes de las paredes celulares microbiales, la proPO es liberada y se activa en fenoloxidasa. Esta enzima es clave en la síntesis de melanina y está presente en los sitios de inflamación en los crustáceos (Johansson y Söderhäll 1989).

El PO promueve la hidroxilación de fenoles y la oxidación de o-fenoles a quinones, los cuales son responsables de destruir cualquier partícula extraña que trate de invadir el hemocele durante la curación de heridas (Söderhäll y Cerenius 1992; Söderhäll *et al.* 1994). Los quinones son subsecuentemente polimerizados en melanina por reacciones no enzimáticas (Vargas-Albores *et al.* 1998).

La activación de este sistema ha sido muy bien estudiado en varias especies de camarones (Hernández-Lopez *et al.* 1996; Perazzolo y Barraco, 1997; Vargas-Albores *et al.* 1997; Sung *et al.* 1998) y el procedimiento del ensayo ha sido simplificado por Hernández-Lopez *et al.* (1996).

1.2.1.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana

Estudios en crustáceos han mostrado la habilidad de la hemolinfa de inhibir el crecimiento bacteriano (Chisholm y Smith 1992; Noga *et al.* 1996). Sung *et al.* (1996) reportaron que células de *V. vulnificus* fueron eliminadas de la hemolinfa de *P.*

monodon 12 hrs después de su exposición, desapareciendo completamente a las 24 hrs. Adams (1991) reportó que más del 99% de bacterina de *V. alginolyticus* fue eliminada de la hemolinfa de *P. monodon*, después de 4 hrs de exposición.

Recientemente la caracterización de una nueva familia de péptidos antimicrobianos “peneidinas” aislados de la hemolinfa de *P. vannamei* (Destoumieux *et al.* 1997), ha aportado importantes avances en el conocimiento de la inmunidad innata (Bachère *et al.* 2000). Las peneidinas contribuirían en la eliminación de microorganismos durante el proceso de fagocitosis actuando como antibióticos endógenos (Destoumieux *et al.* 2000a). El incremento de su concentración en el plasma ocurre luego de una infección microbiana y decrece en los hemocitos GR circulantes en las primeras 3 hrs siguientes a la estimulación. Una vez liberados por los hemocitos, las peneidinas migran a la cutícula debido a su alta afinidad por la quitina (Destoumieux *et al.* 2000b), contribuyendo en los procesos de defensa de las zonas más expuestas.

Para la cuantificación de la actividad antibacterial de la hemolinfa de crustáceos, muchos investigadores han utilizado un ensayo cuantitativo basado en la inhibición del crecimiento bacteriana en placas de agar (Adams 1991; Sung *et al.* 1996; Rengpipat *et al.* 2000). Otros en cambio han empleado el método turbidométrico en medio líquido observando fuerte actividad antibacteriana de la hemolinfa de *P. vannamei* contra diferentes bacterias marinas (J. Rodríguez, CENAIM, comunicación personal).

1.2.1.5. Determinación de la concentración proteica del plasma

Existen pocos trabajos relacionados a la importancia fisiológica de la concentración de las proteínas del plasma en la hemolinfa de camarones peneidos. La hemocianina es una de las proteínas más abundantes de la hemolinfa (60% a 95% del total de proteínas) (Djangmah 1970), y su función está relacionada al transporte de oxígeno (Rodríguez y Le Moullac 2000). La medida de la concentración de proteínas en el plasma se basa en el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

1.2.2. ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La estimulación del sistema inmune por la utilización de cepas probióticas ha sido reportado por Famularo *et al.* (1997) y Gatesoupe (1999) como una característica a considerar en la selección de las bacterias. La inmunoestimulación es una alternativa para mantener el sistema de defensa activo, aumentando la resistencia a virus o controlando poblaciones bacterianas patógenas que puedan afectar la salud del hospedero.

En los camarones, varios compuestos microbiales se han presentado como principales estimulantes de las funciones celulares, entre ellos β -glucanos (BG), lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglucanos (PG). Estos compuestos pueden activar directamente funciones celulares, pero la participación de las proteínas del plasma mejoran la eficiencia de la respuesta inmune (Vargas-Albores *et al.* 1998). Los BG están presentes en la pared celular de levaduras y hongos, los LPS son los principales componentes de la pared celular de las bacterias Gram (-) siendo considerados por ciertos investigadores herramientas potenciales en la prevención de enfermedades (Newman 1996). Los PG proceden de la pared celular de bacterias Gram (+) y han sido objeto de investigaciones para evaluar la potencia de su administración, contra la vibriosis y contra el virus de la mancha blanca (Itami *et al.* 1998).

Es interesante resaltar, que la mayoría de los trabajos para probar el efecto inmunoestimulante se han realizado utilizando bacterina de Vibrios (Sung *et al.* 1996; Sung *et al.* 1998), o compuestos extraídos de la pared celular de bacterias y levaduras (Sung *et al.* 1994; Song y Hsieht 1994), pero son pocos los trabajos que han estudiado el efecto de administrar bacterias probióticas sobre la estimulación del sistema inmune del camarón.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la obtención de las cepas bacterianas se utilizaron 45 camarones silvestres adultos (30 ± 5 g) capturados de la zona de Manglaralto, Provincia del Guayas, Ecuador. En los 3 bioensayos experimentales se utilizaron pre-juveniles *P. vannamei* con un peso de 1 ± 0.2 g, provenientes del laboratorio Macrobio (Ayangue, Provincia del Guayas, Ecuador).

La bacteria *Vibrio harveyi* (S2) se utilizó como cepa patógena en las pruebas de desafío *in vitro e in vivo*. *Vibrio alginolyticus* (Ili) se utilizó como probiótico control en el estudio del efecto inmunoestimulante de las bacterias probióticas seleccionadas.

2.2. METODOLOGIA

2.2.1. TECNICAS MICROBIOLÓGICAS

2.2.1.1. Aislamiento bacteriano

Para el aislamiento bacteriano se utilizaron 45 camarones silvestres de la especie *P. vannamei*. Los camarones fueron seccionados sagitalmente, destinando la mitad de su cuerpo para análisis histológico. De la mitad restante, se extrajo solamente el HP, siendo éste, el único órgano utilizado para el aislamiento bacteriano.

Los HP se colocaron individualmente en solución salina al 2% dentro de tubos maceradores esterilizados. Luego de la maceración, se realizaron 4 diluciones seriadas de 1/10 en tubos de ensayo estériles. Las muestras provenientes de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , se sembraron en placas de petri conteniendo agar marino. La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de difusión en medio sólido, y se incubó a $27,6 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 hrs. Luego de la incubación, se procedió a la identificación morfológica de las colonias en base al manual de Norrell and Messley (1997). Posteriormente, se cuantificaron las colonias dentro de cada grupo, aislándose cepas bacterianas morfológicamente diferentes,

El aislamiento se realizó en placas de agar Lb 2% NaCl, utilizando la técnica de rayado. Se incubó a 27,6 °C por 24 horas, realizándose luego el Test de pureza para comprobar uniformidad morfológica. Las cepas puras fueron congeladas a - 80 °C en medio Lb-broth 2% NaCl, 15% de glicerol.

2.2.1.2. Pruebas de inhibición *in vitro*

Con el fin de determinar el efecto probiótico de las cepas aisladas, se emplearon dos técnicas *in vitro*, (a) Técnica de difusión con bacterias vivas descrita por Ruiz *et al.* (1996) y (b) Técnica con bacterias muertas descrita por Tanasomwang *et al.* (1998). En ambos casos se utilizó la cepa viva de *V. haweyi* (S2) como agente patógeno.

Para éstas pruebas, solo se utilizaron aquellas cepas aisladas de animales histológicamente sanos. La preparación consistió en sembrar las bacterias en agar Lb 2% NaCl, mediante la técnica de rayado, incubando por 8 hrs a 27,6 °C antes de iniciar las pruebas de inhibición. Las muestras se trabajaron por triplicado.

Para la preparación de *V. haweyi*, se partió de una siembra en agar Lb 2% NaCl incubada 8 hrs a 27,6 °C. Una colonia fue repicada en 5 mL de Lb-broth 2% NaCl, incubándose 12 hrs (over night) a 27,6 °C, en baño maría y agitación continua. Por la mañana se realizó un repique 1/100 en caldo Lb-broth 2% NaCl, en un volumen final de 5 mL. Se incubó 2 hrs a 27,6 °C en baño maría y agitación continua. La concentración de S2 utilizada fue de 20×10^6 bacterias / mL de agar en (a) y de 10^4 UFC / mL en (b).

2.2.1.3. Identificación fenotípica bacteriana

La morfología celular se determinó con la ayuda del microscopio de contraste de fases (40x). La morfología de colonia se observó con la ayuda de una lupa describiendo color, forma, elevación y márgenes, según el manual de Norrell and Messley (1997).

La motilidad se evaluó mediante la técnica de gota pendiente utilizando la lamina excavada de Koch, y se observó en microscopio óptico (100x).

Para la realización de las pruebas bioquímicas se utilizó la técnica miniaturizada propuesta por Solís (1996). Se partió de un cultivo en agar tripticasa de soya (TSA) de 12 hrs de crecimiento, realizándose la caracterización fenotípica, en base a 20 pruebas

bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey (1994). Las lecturas se realizaron cada 24 hrs por 3 días consecutivos. Las pruebas realizadas fueron: catalasa, oxidasa, crecimiento al 0%, 3% y 7% de NaCl, metabolismo oxidativo y fermentativo, producción de indol, Voges Proskauer, citrato de Simmons, omitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa y asimilación de carbohidratos.

2.2.1.4. Conteo de las poblaciones bacterianas.

Se utilizaron dos métodos para determinar el tamaño de la población bacteriana (a) método de conteo de células viables, y (b) método de conteo mediante microscopía óptica. Las cepas bacterianas utilizadas fueron aquellas que resultaron positivas a las pruebas de inhibición *in vitro*.

(a) Método de conteo de células viables.

Este método permitió realizar las curvas bacterianas de crecimiento, relacionando unidades de densidad óptica (D.O.) y unidades formadoras de colonias UFC/mL. Estos datos se obtuvieron con intervalos de 1 hora durante 16 hrs de cultivo.

Se realizaron los cultivos bacterianos en agar Lb 2% NaCl, utilizando el método de rayado. Luego de 12 hrs de incubación (T₂), se repicó una colonia en 10 mL de caldo de cultivo Lb-broth 2% NaCl, incubándose toda la noche a 27,6 °C, en baño maría y agitación continua. Se realizó un segundo repique (T₁) de 1/100 en 50 mL de caldo de cultivo Lb-broth 2% NaCl, incubándose bajo las mismas condiciones durante 4 hrs. Una vez concluido este tiempo se procedió a un tercer repique (Tu) de 1/10 en 450 mL, bajo las mismas condiciones. En cada tiempo se realizaron 13 diluciones seriadas 1/10; por cada cepa bacteriana. Las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻¹³ se sembraron en agar marino utilizando la técnica de difusión en medio sólido. Las placas permanecieron en incubación durante 8 hrs a 27,6 °C, antes de iniciar el conteo de colonias.

Los valores de D.O. se midieron empleado un espectrofotómetro JENWAY 6400[®] a una longitud de onda de 560 nm. La cantidad de UFC/mL se obtuvo multiplicando el número de colonias de cada placa por el factor de dilución. Ambos

datos fueron relacionados en un gráfico de líneas, obteniéndose la relación UFC vs tiempo y VS unidades de D.O. por cepa bacteriana.

(b) Método de conteo mediante microscopía.

Este método permitió obtener el número de bacterias/mL en relación a un solo dato de densidad de óptica. Se hicieron siembras en Lb-broth 2% NaCl durante 2 hrs a 26,7 °C. Posteriormente, se realizaron 6 diluciones seriadas 1/10 por cada cepa. Las muestras se fijaron con formol al 10% (v/v) hasta el momento de la lectura. Se contó en microscopio de contraste de fases con la ayuda de una cámara de Neubauer.

Para determinar el número total de células/mL se multiplicó el número de células por el factor de dilución. La D.O. se midió en un lector de microplacas (Multiskan Bichromatic®) a 560 nm.

2.2.2. HISTOPATOLOGÍA

La histología se realizó utilizando el método descrito por Bell and Lightner (1988). La evaluación del estado sanitario de los camarones fue definitiva en la selección inicial de cepas bacterianas. También se utilizó esta herramienta para observar la presencia o ausencia de signos patológicos ocasionados por la administración de las bacterias probióticas, en los camarones del 1^{er} y 2^{do} bioensayo.

2.2.3. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.2.3.1. Extracción y cuantificación del ADN bacteriano

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando la técnica (1) descrito por Murray and Thompson (1980) y una técnica simplificada (2) descrita por Motte et al. (fide) (Anexo). Los perfiles de RAPDs obtenidos por ambas técnicas fueron comparados, con el fin de estandarizar resultados y obtener alternativas de uso.

La concentración de ADN de las muestras bacterianas fue determinada por espectrofotometría (Gene Quant, PHARMACIA®), utilizando una dilución 1/20 para la lectura en el espectrofotómetro. La pureza de la muestra fue evaluada por el "ratio"

DO260/DO280, conservándose aquellas muestras menores al valor 2. Las muestras de ADN bacteriano extraídas con la técnica (1) se estandarizaron a una concentración de 10 ng/μl y se conservaron a -20 °C. Este ADN se utilizó como control en los estudios de amplificación, repetibilidad de los iniciadores y polimorfismo de bandas en los RAPDs.

2.2.3.2 Selección de los iniciadores y condiciones de amplificación

Utilizando la técnica AP-PCR, se establecieron los perfiles de RAPDs de las bacterias positivas a las pruebas de inhibición *in vitro*. Estos perfiles permitieron determinar bandas monomórficas que sirvieron de base en el diagnóstico de colonización bacteriana en el 1^{er} y 2^{do} bioensayo.

Se probaron 8 iniciadores decaméricos (Operon Technologies®) a una concentración de 0.4 μM. El criterio para la selección de los iniciadores se basó en 3 aspectos con el siguiente orden de importancia: amplificación, reproducibilidad y número de bandas. Los iniciadores que demostraron amplificación, fueron sometidos a la evaluación de reproducibilidad. Para esto, se realizaron 3 amplificaciones de cada cepa bacteriana mas un control negativo. Las condiciones para la amplificación se muestran en el Anexo.

Los productos de amplificación fueron separados utilizando agarosa al 2% y poliacrilamida al 8%. Se utilizó un marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder®, para la determinación de las tallas. Las bandas se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL).

2.2.4. 1^{ER} BIOENSAYO: EVALUACION DE LA CAPACIDAD COLONIZADORA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS.

El objetivo del bioensayo fue determinar la capacidad colonizadora de las cepas bacterianas en el HP de los animales inoculados, utilizando el método de inmersión. Las cepas seleccionadas, fueron aquellas que inhibieron el crecimiento de *V. harveyi* en las pruebas *in vitro*. El estado de salud de los camarones se determinó por histología luego de la colonización.

2.2.4.1. Preparación de los inóculos bacterianos

Se realizó un cultivo de 8-12 hrs en agar Lb 2% NaCl, utilizando el método de rayado. Se repicó una colonia en 10 mL de caldo de cultivo Lb-broth 2% NaCl, incubándose durante 8 hrs a 27,6 °C con agitación continua. Un segundo repique de 1/100 se realizó en 50 mL de caldo Lb-broth 2% NaCl, incubándose bajo condiciones arriba mencionadas. Luego se procedió a un tercer repique de 1/100 en 450 mL.

La inoculación de los acuarios se realizó en la fase de crecimiento exponencial de cada bacteria, en base a las curvas individuales de crecimiento (ítem 2.2.1.4.). Se determinó la concentración, basándose en el dato de espectrofotometría y ajustando la dosis inoculante a una concentración final de 10^7 bacterias/mL en cada acuario.

2.2.4.2. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 8 tratamientos y 5 réplicas por tratamiento. La densidad utilizada fue de 20 animales ($1 \pm 0.3g$) en 50 lts de agua de mar, que fueron aleatoriamente distribuidos dentro de los acuarios. Las bacterias utilizadas fueron P62, P63, P64, P65, P66, P67, Ili y un control sin bacterias.

Los camarones se aclimataron por 15 días con recambio de agua continuo y aireación constante. El agua de mar fue filtrada a $5\mu m$ y esterilizada con U.V. La temperatura fue constante 28°C. Las mangueras de aireación fueron taponadas con algodón para minimizar la contaminación. Se alimentó con balanceado comercial (50% proteína), el cual fue esterilizado diariamente. Luego de la aclimatación se realizó una única inoculación bacteriana. El volumen del inóculo varió de 60 y 100 mL ajustando la concentración a 10^7 bacterias/mL en cada acuario. El tiempo de exposición fue de 24 hrs durante el cuál se suspendió el recambio de agua.

Para realizar los aislamientos de recuperación, se siguió la metodología explicada en el ítem 2.2.1.1. utilizándose grupos de 8 HP por réplica y realizándose 5 diluciones seriadas de 1/10. Las muestras provenientes de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} de cada grupo, se sembraron en placas de petri conteniendo agar Lb 2% NaCl. La siembra se realizó por duplicado mediante la técnica de difusión en medio sólido y se incubó a 27,6°C durante 24 horas. Para evaluar los porcentajes de colonización, se

contabilizó las UFC/g de HP, en base a la morfología de las colonias, identificando las bacterias recuperadas mediante AP-PCR con 3 iniciadores. Un número de 8 animales por réplica fueron fijados con solución Davidson para histopatología.

2.2.5. 2^{do} BIOENSAYO: ESTUDIO DE INTERACCION *in vivo* ENTRE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y *V. harveyi* (S2)

El objetivo de este bioensayo fue determinar el grado de competencia entre las cepas probióticas y el agente patógeno. Las cepas bacterianas utilizadas fueron seleccionadas en base a los resultados de la colonización, utilizándose solo aquellas que colonizaron en un porcentaje mayor al 50%. La preparación del patógeno se realizó según metodología descrita por Sotomayor (2001).

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 5 tratamientos y 5 réplicas. Las bacterias utilizadas fueron P62, P63, P64, se utilizó un control negativo y un control patógeno. La densidad de siembra, condiciones de aclimatación y preparación de las bacterias fueron similares al 1^{er} bioensayo. La dosis infectante de *V. harveyi* fue 10⁷ bacterias/mL, realizándose una sola inoculación en 24 hrs.

Las bacterias se administraron durante 3 días seguidos, mediante el método de inmersión. Luego de 20 hrs de exposición se realizó un recambio de agua del 50%. Al cuarto día del experimento se inoculó el *Vibrio* patógeno. Después de 24 hrs se realizaron las extracciones de los HP. La metodología de microbiología fue similar a la del 1^{er} bioensayo.

Los porcentajes de interacción se evaluaron contabilizando las UFC/g de HP en agar Lb 2% NaCl, en base a características morfológicas. Las muestras recuperadas de cada réplica fueron identificadas mediante perfiles de RAPDs en agarosa, utilizando 3 iniciadores y Dot blot (Sambrook *et al.* 1989) con anticuerpos monoclonales anti S2. Los resultados de AP-PCR fueron confirmados en geles de poliacrilamida al 8%, utilizando los mismos iniciadores. De cada réplica se recuperaron 8 camarones para histología.

2.2.6. 3^{er} BIOENSAYO: EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS COMO ESTIMULADORAS DEL SISTEMA INMUNE

El objetivo del bioensayo fue probar el efecto inmunoestimulante de las bacterias P62, P64 y *V. alginolyticus*. Las bacterias seleccionadas fueron aquellas que dieron altos porcentajes de inhibición de S2 en el bioensayo de interacción *in vivo* (ítem 2.2.5.).

2.2.6.1. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio, con 5 réplicas por tratamiento. Se utilizaron camarones de 1.5 ± 0.2 g los cuales se distribuyeron aleatoriamente en acuarios de 50 litros a razón de 10 animales por acuario. La aclimatación se realizó durante 10 días a una temperatura de 25 °C y salinidad de 34 ups, con recambio de agua diario del 50%. El agua fue filtrada a $0.5\mu\text{m}$ y la aireación constante. Los camarones fueron alimentados con balanceado Molino 50[®], al 3% de la biomasa, repartido en 2 raciones diarias durante todo el ensayo experimental (20 días).

La preparación del probiótico se realizó según la metodología descrita en el ítem 2.2.4.1. La inoculación se realizó en la fase exponencial de cada bacteria utilizándose el método de inmersión. La concentración final alcanzada en los acuarios fue de 10^7 bacterias/mL. La inoculación se realizó cada 2 días durante un periodo de 10 días realizándose recambios de agua del 50% luego de 20 hrs de exposición. La alimentación no varió ni en dosis ni frecuencia durante el periodo de aplicación de las bacterias.

Luego de 10 días de inoculación se muestrearon los camarones en intermuda. Se extrajo hemolinfa del sinus ventral utilizando jeringuillas de 1 mL. (Insulin Syringe) cargadas con anticoagulante citrato de sodio al 10%. Las muestras fueron transferidas a microtubos estériles y mantenidas en hielo (4°C) para preservar las células. Se prepararon 20 mezclas de 10 muestras de hemolinfa cada una. Además se evaluó el peso individual de los camarones de cada tratamiento.

2.2.7. TECNICAS INMUNITARIAS

Las pruebas inmunitarias utilizadas para evaluar el efecto estimulante de los probióticos fueron: determinación de hemogramas, cuantificación de radicales tóxicos producidos durante la fagocitosis, cuantificación de la actividad PO, estimación de la actividad microbicida de la hemolinfa y **cuantificación** de proteínas plasmáticas.

2.2.7.1. Hemograma

Para el hemograma las muestras fueron preservadas en formol al 3%. Se determinó el número total y proporción de hemocitos presentes en el plasma por conteo con cámara de Neubauer, utilizando un microscopio de contraste de fases. El número de hemocitos fue expresado en millones de células por mL y la fórmula hemocitaria en porcentajes hemocitarios. Se consideraron valores entre 15 a 20 x 10⁶ hemocitos/mL como aceptables.

2.2.7.2. Producción de Anión Superóxido (O₂⁻)

El anión superóxido (O₂⁻) fue cuantificado por medio de la técnica de reducción del Nitro blue tetrazolium (NBT), según el protocolo cuantitativo optimizado por Muñoz et *al.* (2000). La actividad de los hemocitos fue determinada por la cantidad de formazán obtenido producto de la reducción del NBT por el O₂⁻ y estimado mediante lecturas en el espectrofotómetro a 620 nm.

La producción de O₂⁻ fue expresada en tasas, dividiendo el valor de la **absorbancia** de la muestra estimulada para la fagocitosis, contra el valor de la misma muestra sin estimulación. La interpretación de los resultados se basó en la siguiente escala; tasas menores a 1 falta de actividad, valores comprendidos entre 1 - 1.5 como baja actividad, y valores entre 1.5 - 2 como buena actividad.

2.2.7.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasas (PO)

Para la realización de esta prueba se empleó el protocolo simplificado por Hernández-López et *al.* (1996). Mediante espectrofotometría, se detectó la actividad

PO a través de la formación de un pigmento rojo DOPA cromo proveniente de la oxidación del substrato enzimático L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Los resultados se expresaron en unidades de D.O. medidos en lector de microplacas Multiskan Bichromatic® a 490 nm. La interpretación de los resultados se basó en la siguiente escala; menor a 0.2 D.O. bajo, entre 0.2 a 0.35 D.O. normal, y entre 0.35 a 0.5 D.O. alta actividad.

2.2.7.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (AA)

La prueba se basó en detectar y cuantificar por medio del método turbidométrico (INCO 2001) el crecimiento de suspensiones bacterianas en presencia o ausencia de plasma de camarón. Se utilizó un control plasma y un control negativo, que correspondió al 100% del crecimiento bacteriano. Los resultados fueron expresados en porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano, relacionando el valor de D.O. obtenido en presencia de plasma vs el control negativo constituido por bacterias cultivadas en solución salina. Un porcentaje de inhibición menor al 20% fue considerado bajo, porcentajes entre 20 al 40% regulares, y porcentajes mayores del 40% buenos.

2.2.7.5. Concentración de proteínas plasmáticas (PP)

Se cuantificó la concentración de proteínas plasmáticas totales por medio del **método de Lowry et al. (1951)**. La concentración de **proteínas** fue expresada en mg/mL. Se consideraron valores menores de 80 mg/mL como muy bajos, entre 80 a 100 mg/mL bajos, de 100 a 130 mg/mL normales y mayores a 130 mg/mL altos.

2.2.7.6. Cálculo del índice inmunitario

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, de manera que cada parámetro tiene igual fracción en el cálculo del **índice** global (0.2). Las transformaciones se basaron en la siguiente fórmula:

$$Vt. = (a - b) \times \frac{0.2}{k}$$

Vt=valor transformado.

a=valor obtenido por réplica en cada una de las pruebas inmunológicas.

b=valor mínimo del rango

k= rango de cada prueba

Valor 0.2:=corresponde al 20%

El índice inmunitario es la suma de los valores Vt de las 5 pruebas para cada réplica.

$$Indice = vt(THC) + vt(NBT) + vt(PO) + vt(AA) + vt(PP)$$

2.2.8. PRUEBAS INMUNITARIAS *in vitro* PARA LA EVALUACION DE LA INTERACCION PROBIOTICO-PLASMA

Mediante la cuantificación de la actividad fenoloxidasa *in vitro* se evaluó el efecto estimulante de las bacterias P62, P64 y *V. alginolyticus*. El protocolo empleador fue el descrito por Hernández-López *et al.* (1996) utilizando bacterina preparada de cada bacteria (Kessler, 1981), como sustancia estimuladora. Como control estimulante se utilizó laminarina (β -glucanos solubles). La bacterina fue centrifugada y resuspendida en una solución con Ca^{++} y tampón Cac. La concentración de células bacterianas utilizada fue de 40 bacterias por hemocito. Cada muestra se analizó por triplicado.

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos durante la realización de todos los bioensayos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%. El test de comparación de medias Duncan se utilizó en el estudio de diferencias significativas. Los datos se utilizaron bajo principios de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizó un análisis de similitud en el estudio de las asociaciones fenotípicas. El programa estadístico utilizado fue Statistica 4.3.

3. RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO BACTERIANO

Se aislaron 80 cepas bacterianas, de las cuales el 30% pertenecieron a camarones libres de patologías virales y bacterianas (histología). Las 24 cepas fueron enfrentadas contra *V. harveyi* (S2) en las pruebas de inhibición *in vitro*.

3.2. PRUEBAS DE INHIBICIÓN *in vitro*

Las bacterias codificadas como P62, P63, P64, P65, P66 y P67, inhibieron al patógeno (Fig. 1). La técnica descrita por Ruiz *et al.* (1996) permitió medir los diámetros de los halos de inhibición a las 12 hrs de crecimiento bacteriano (Tabla 1).



Figura 1. Halos de inhibición utilizando bacterias vivas (a) y bacterias muertas (b).

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición a las 12 hrs de crecimiento bacteriano.

Bacterias	Valores medios (mm)
P62	21.1
P63	16.2
P64	15.3
P65	16.1
P66	14.5
P67	18.2

3.3. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA BACTERIANA

La identificación bacteriana se realizó en base a características morfológicas y metabólicas alcanzando nivel taxonómico de género. La interpretación de las pruebas bioquímicas, se realizó de acuerdo al manual de Bergey (1994). Las bacterias P62, P63, P65 y P66 fueron clasificadas dentro del género *Vibrio*. La bacteria P64 dentro del género *Bacillus* y la bacteria P67 como *Pseudomona*. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Identificación fenotípica de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 en base a criterios morfológicos y bioquímicos.

CARACTERES	CEPAS BACTERIANAS					
	P62	P63	P64	P65	P66	P67
Características Morfológicas						
1 Gram			+			
2 Motilidad	+	+	+	+	+	+
3 Forma ¹	B	B	B	B	B	B
Características Bioquímicas						
4 Catalasa	+	+	+	+	+	+/-
5 Oxidasa	+	+		+	+	+
6 OF(oxidativo)	+	+		+	+	+
7 OF(fermentativo)	+	+		+	+	
8 Producción de Indol	+			+		
9 Voges Proskauer						
10 Citrato Simmons				+/-		+
11 Ornitina descarboxilasa	+	+/-	+/-	+/-	+	+
12 Argenina dihidrolasa	+	+/-	+/-	+	+	+
13 L. Arabinosa						
14 Celobiosa	+	+		+		+
15 D-manosa	+	+		+	+/-	
16 D-manitol	+	+		+	+	
17 Sucrosa	+	+		+	+/-	
18 D-gluconato				+/-		
19 D-gluconato						
20 D-galactosa	+	+		+		+
21 Crecimiento 0 % NaCl						+
22 Crecimiento 3 % NaCl	+	+	+	+	+	+
23 Crecimiento 5 % NaCl	+	+	+	+	+	+/-

¹ B = Bacillo

Con el fin de obtener una aproximación de especies para las bacterias clasificadas como *Vibrios*, se realizó un análisis de similitud comparando con datos fenotípicos de *Vibrio* spp. descritos por Solis (1996). Como podemos observar en la Figura 2, el *Vibrio* P66 tiene fuerte asociación fenotípica con *Vibrio damsela*. Los *Vibrios* P62, P63 y P65 se encuentran muy proximos entre sí, pero difíciles de relacionar con el resto de los *Vibrios*. El resultado de la prueba OF fermentativo ubicó la bacteria P67 dentro del género *Pseudomona* observándose asociación con este género en la prueba de similitud.

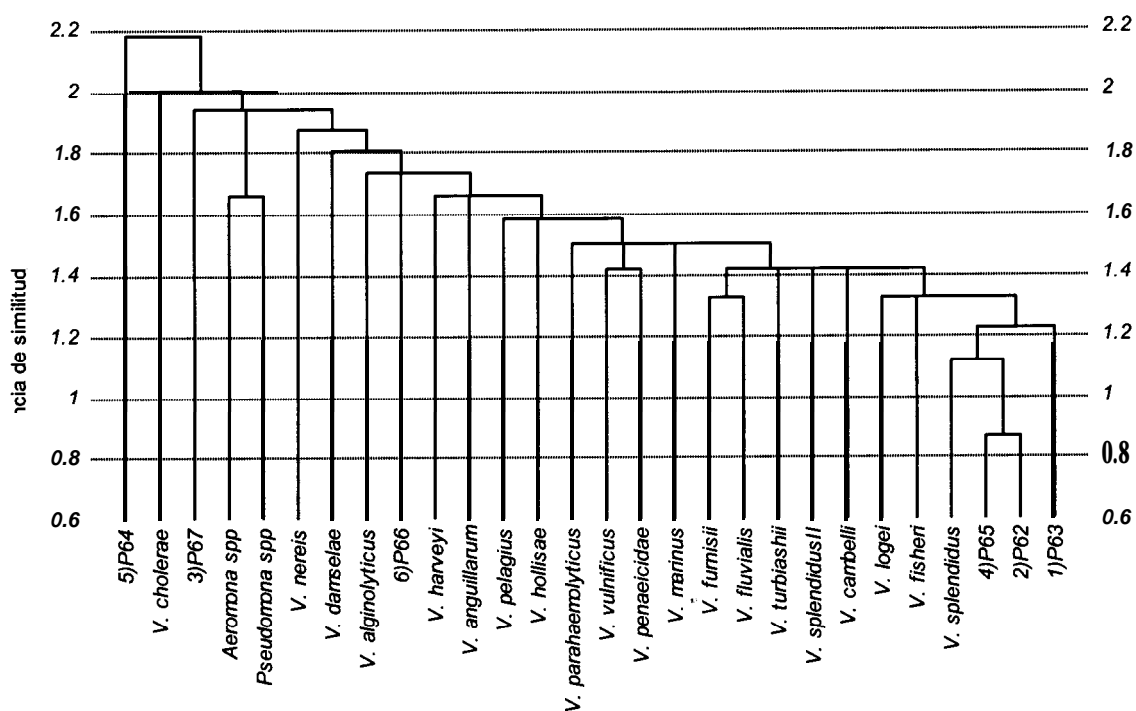


Figura 2. Análisis de similitud de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 con los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS

Para la determinación del tiempo exacto de inoculación en los 3 bioensayos, se obtuvo la relación D.O. y UFC/mL de las cepas bacterianas P62, P63, P64, P65, P66, P67 e Ili en función al tiempo de cultivo. El inóculo en los acuarios se realizó en la fase exponencial de cada bacteria.

Vibrio P62

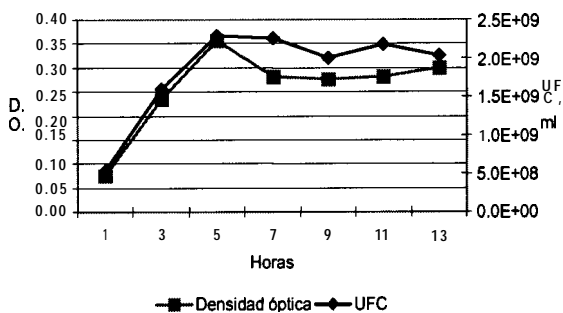


Fig. 3. Curva de crecimiento de *Vibrio* P62

Vibrio P63

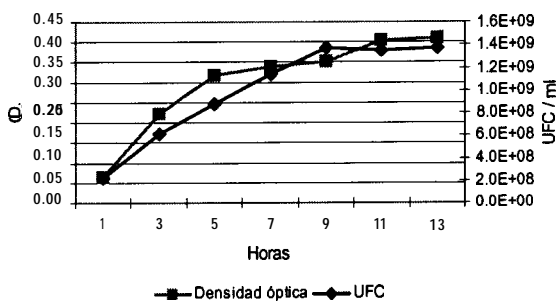


Fig. 4. Curva de crecimiento de *Vibrio* P63

Para el *Vibrio* P62 (Fig. 3) y *V. alginolyticus* (Ili) (Fig. 9), el tiempo apropiado para realizar el inóculo fue a las 3 hrs de crecimiento, luego del último repique. Para los *Vibrios* P63 (Fig. 4) y P65 (Fig. 6) a las 6 hrs. Para el *Bacillus* P64 (Fig. 5) a las 4 hrs; *Vibrio* P66 (Fig. 7) 8 hrs y finalmente para la *Pseudomona* P67 a las 2 hrs de cultivo (Fig. 8).

Bacillus P64

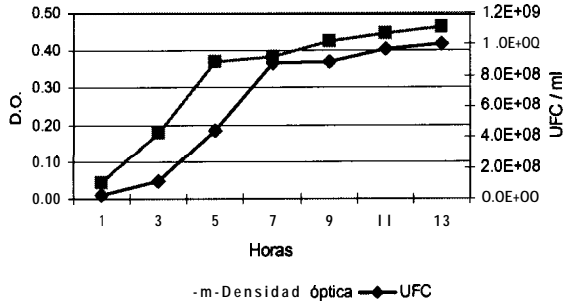


Fig. 5. Curva de crecimiento de *Bacillus* P64

Vibrio P65

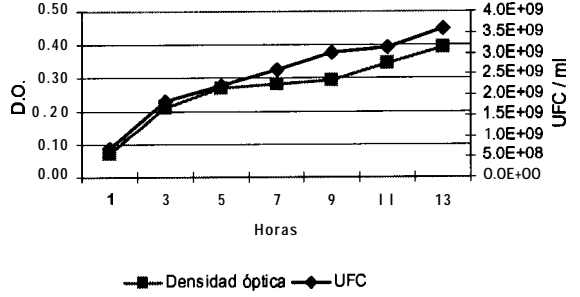


Fig. 6. Curva de crecimiento de *Vibrio* P65

Vibrio P66

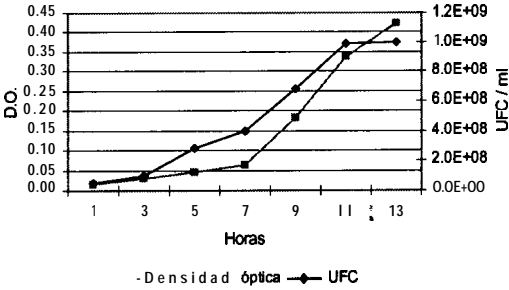


Fig 7. Curva de crecimiento de *Vibrio* P66

Pseudomona P67

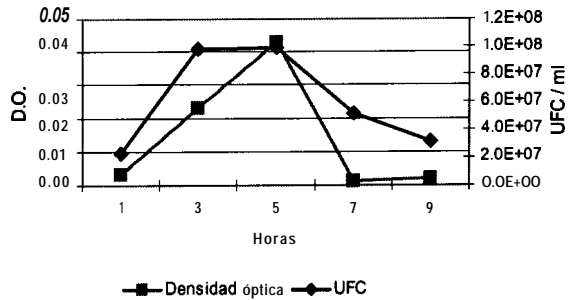


Fig 8. Curva de crecimiento de *Pseudomona* P67

***V. alginolyticus* (Ili)**

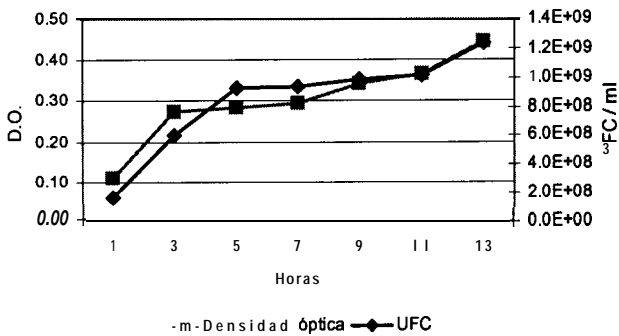


Figura 9. Curva de crecimiento de *V. alginolyticus* (Ili)

La *Pseudomona* P67 creció con dificultad en volúmenes de cultivo de 500 mL, y alcanzó concentraciones relativamente bajas en su fase exponencial. Sin embargo, se decidió probar su capacidad de colonización (1^{er} bioensayo), por los buenos resultados demostrados en la prueba de desafío *in vitro*.

3.5. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA BACTERIANA

Se probaron 8 iniciadores decaméricos, de los cuales OPA3, OPA7, OPA8, OPA9, OPA10 y OPA11 dieron productos de amplificación. En las pruebas de reproducibilidad, los iniciadores OPA 8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA 9 (5' GGGTAACGCC 3'), OPA 10 (5' GTGATCGCAG 3') mostraron resultados más confiables (Fig. 10). Con el iniciador OPA10, se obtuvieron perfiles con mayor número de bandas que con el resto de los iniciadores seleccionados. El uso de geles de poliacrilamida permitió obtener una mayor resolución de bandas posibilitando una mejor diferenciación genómica.

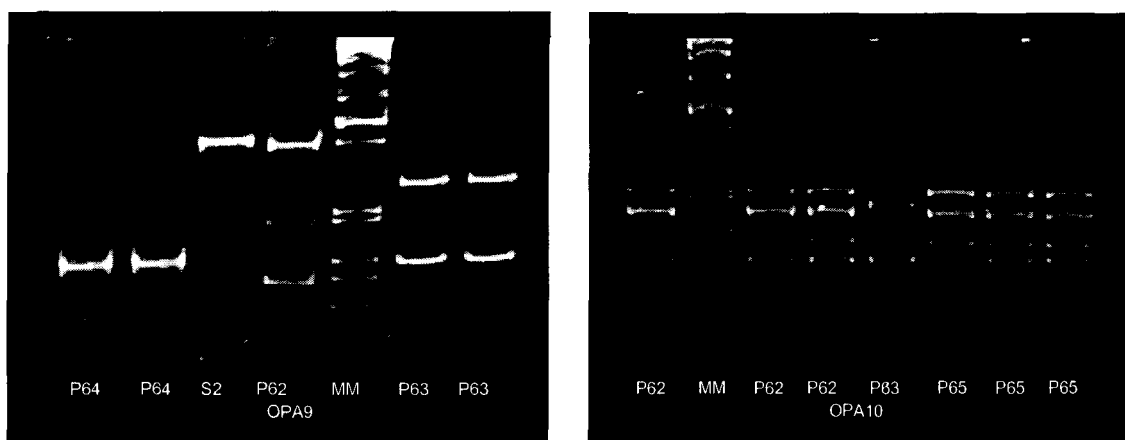


Figura 10. Perfiles de RAPDs en geles de poliacrilamida utilizando los iniciadores OPA9 y OPA10.

En el diagnóstico de colonización (1^{er} bioensayo) y de interacción (2^{do} bioensayo), se seleccionaron los 3 iniciadores OPA8, OPA9 y OPA10 para diferenciar ciertas bacterias que presentaron bandas de peso molecular similar para un mismo iniciador. El perfil de RAPD de la bacteria P65 se confundió con S2 utilizando el iniciador OPA9, y con el perfil de P62 utilizando OPA10. El iniciador OPA8 permitió diferenciar claramente estas bacterias.

3.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD COLONIZADORA DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS

Para la realización de este bioensayo además de las bacterias ya seleccionadas, se probó el efecto colonizador de *V. alginolyticus* (Ili). Se utilizó un control negativo sin probiótico. El número total de UFC/g de HP fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales inoculados con el *Bacillus* P64 y los *Vibrios* P65 y P66 con respecto al control y *Pseudomona* P67. Además los animales inoculados con *Vibrio* P65 tuvieron un número total de UFC/g de HP significativamente mayor ($p < 0.05$) que los inoculados con P62, P63 e Ili. Los porcentajes de colonización y los valores medios de concentración bacteriana alcanzados por cada cepa, están representados en la Figura II.

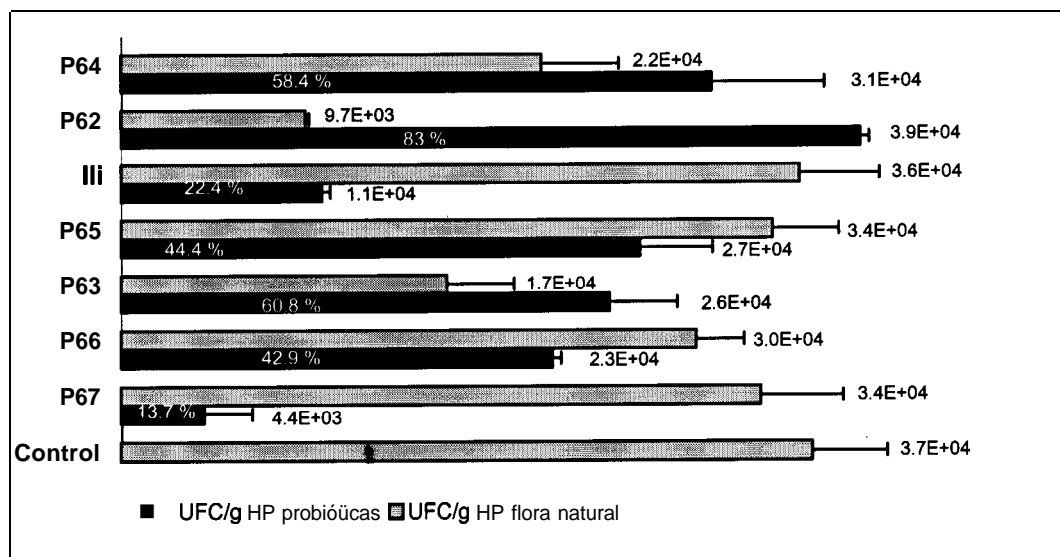


Figura II. Porcentajes de colonización de bacterias P62, P63, P64, P65, P66, P67 e Ili.

Las cepas bacterianas *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 obtuvieron porcentajes de colonización por encima del 50%. Por su mayor capacidad colonizadora éstas cepas fueron seleccionadas para enfrentarse al patógeno en el 2^{do} bioensayo. El *Vibrio* P66 si bien logró alto porcentaje de colonización, no fue seleccionado por no superar el 50% de colonización. En el caso de la *Pseudomona* P67 la colonización fue insignificante logrando un número total de UFC/g de HP sin diferencias significativas con el control.

El análisis histopatológico mostró necrosis intestinal en los animales inoculados con el *Vibrio* P65, motivo por lo cuál fue descartado para pruebas posteriores.

3.7. INTERACCIONES *in vivo* ENTRE BACTERIAS PROBIÓTICAS Y S2

En este bioensayo se probó la interacción competitiva entre las cepas *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 con *V. harveyi*. Se utilizó un control inoculado con S2 y un control sin bacterias. El diagnóstico de interacción entre probióticos/patógeno se realizó mediante RAPDs y anticuerpos contra S2. Los perfiles de RAPDs se analizaron en geles de agarosa y de poliacrilamida. Los porcentajes de interacción y los valores medios de concentración bacteriana están representados en la Figura 12.

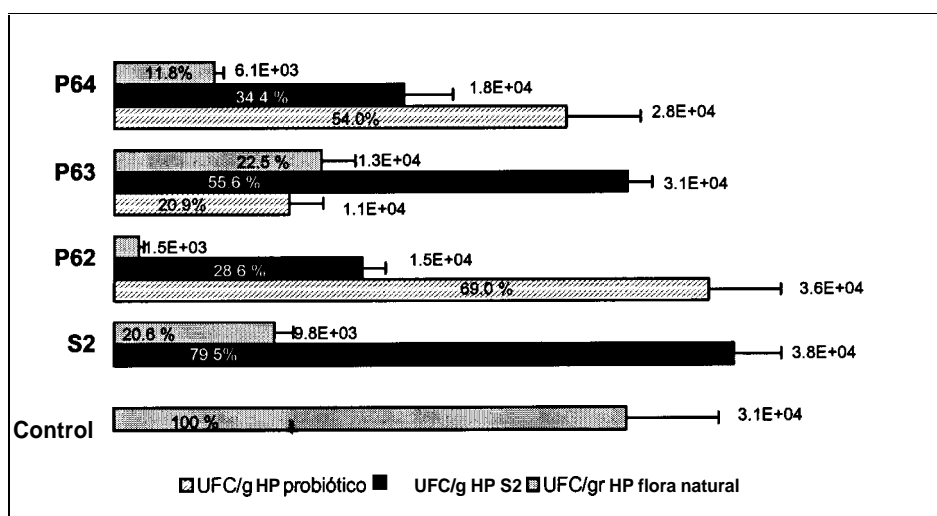


Figura 12. Interacción de las bacterias P62, P63, P64 con *V. harveyi* (S2)

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. No se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales tratados con el probiótico y el control S2 en el número total de UFC/g de HP.

El *Vibrio* P62 logró el mayor efecto inhibitorio sobre S2 y sobre la flora natural del HP. *Bacillus* P64 compitió con el patógeno y con la flora natural, pero su efecto inhibitorio sobre S2 fue menor que el *Vibrio* P62. El efecto inhibitorio de *Vibrio* P63

fue mayor sobre la flora natural que sobre patógeno S2, ante el cuál su efecto fue muy débil.

Aunque el análisis histológico se encontraron daños intestinales en los animales del control S2, la supervivencia fue 100% durante el periodo experimental en todos los tratamientos. El diagnóstico con anticuerpos anti S2 reveló un 70% de las cepas positivas en el control S2.

3.8. EVALUACION DE LAS BACTERIAS COMO ESTIMULADORAS DE LA RESPUESTA INMUNE

Las bacterias utilizadas en el 3^{er} bioensayo fueron *Bacillus* P64 y *Vibrio* P62. Se utilizó como control *V. alginolyticus* (Ili) y un control sin bacterias. Las bacterias P64 y P62 fueron seleccionadas por mostrar mayor efecto inhibitorio sobre la colonización de s2.

Durante el periodo experimental la supervivencia fue del 100% para todos los tratamientos. El peso promedio de los animales con probióticos fue significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al control no tratado (Figura 13).

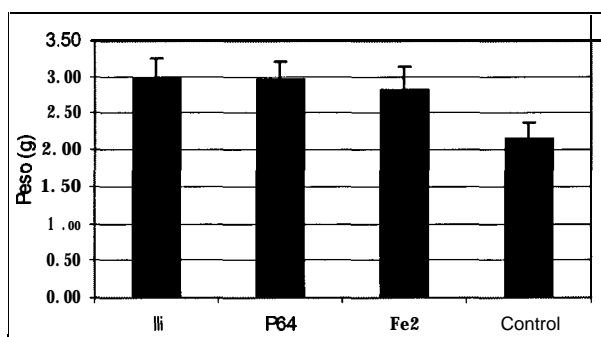


Figura 13. Peso promedio alcanzado de los camarones luego de 20 días de ensayo.

3.8.1. Hemograma

Los resultados de los hemogramas se muestran en la Figura 14. No se registraron diferencias significativas para el conteo total de hemocitos entre los tratamientos. El valor medio alcanzado fue $19.9 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^6$ hemocitos/mL. La cantidad de células

hialinas fue significativamente menor ($p < 0.05$) en los animales tratados con *Vibrio* P62 que con Ili y *Bacillus* P64.

Si bien no se registraron diferencias significativas en el número de células GR y SG en ningún tratamiento, los animales inoculados con *Bacillus* P64 poseen menor cantidad de SG con respecto al control, aumentado la población de GR. En los animales inoculados con *V. alginolyticus* (Ili) y *Bacillus* P64, se observa una distribución más equitativa entre las poblaciones hemocitarias con respecto al control, en el cual predominan las SG (Figura 15).

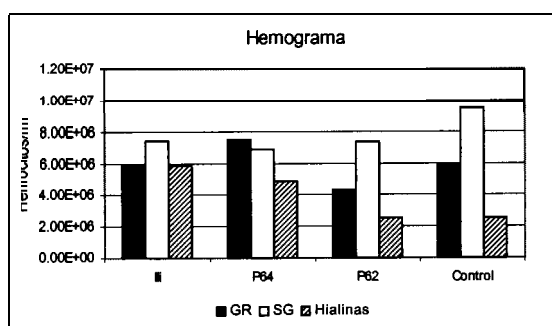


Figura 14. Cantidad de células plasmáticas en los tratamientos P62, P64, Ili y control.

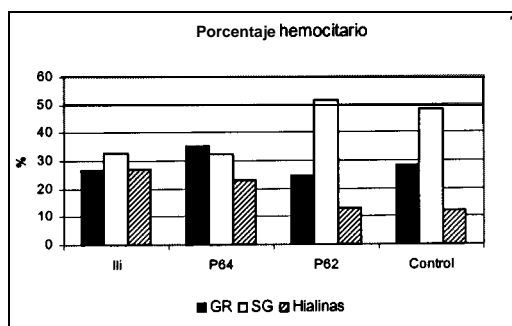


Figura 15. Proporción hemocitaria en los tratamientos P62, P64, Ili y control.

3.8.2. Producción de Anión Superóxido

Todos los tratamientos mostraron una tasa de estimulación baja, no registrándose diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al control (Tabla 3).

Tabla 3. Valores inmunitarios de camarones estimulados con Ili, P64, P62 y control.

	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
Proteínas 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

3.8.3. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa

En la prueba *in vivo* los valores de fenoloxidasa fueron significativamente mas altos ($p < 0.05$) en los animales estimulados con *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (Ili) que en el control. Los resultados de la prueba *in vitro*, mostraron igual tendencia en los valores de densidad óptica que para el experimento *in vivo* (Figura 16), a excepción de la estimulación con P62 que fue igual al control laminarina.

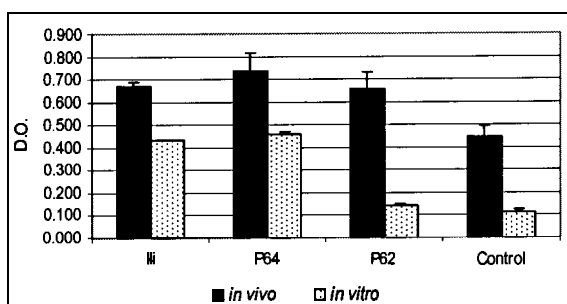


Figura 16. Comparación de los valores de densidad óptica para la cuantificación de la actividad fenoloxidasa de las bacterias Ili, P64, P62 *in vitro* e *in vivo*.

3.8.4. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma

No se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos. Los porcentajes de inhibición fueron bajos incluso en el control (Tabla 3).

3.8.5. Concentración de proteínas plasmáticas

La concentración de proteínas plasmáticas en los animales estimulados, se ubicó en el rango normal sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control (Tabla 3).

3.8.6. Índice Inmunitario Global

El índice inmunitario global fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales estimulados con *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* con respecto al control. Para

los animales estimulados con *Vibrio* P62, el índice inmunitario global fue similar al control.

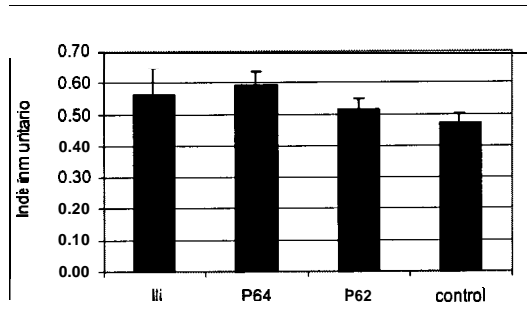


Figura 19. Índice inmunitario global de los camarones inoculados con las cepas bacterianas P62, P64 e Ili.

4. DISCUSIÓN

El uso de probióticos en vertebrados ha sido ampliamente demostrado (Gibson *et al.* 1997; Huber 1997). A lo largo de los años se han estudiado las relaciones simbióticas de mezclas bacterianas, su mejor forma y frecuencia de administración (Hungate 1975). En acuicultura, esta práctica es reciente, por lo que muchas preguntas permanecen aun sin contestación.

Como primer paso en la selección de cepas con capacidad probiótica, fue necesario aislar y caracterizar los microorganismos presentes en el HP, considerando que los mismos estarían adaptados a crecer y multiplicarse en éste órgano. Un total de 24 cepas bacterianas fueron seleccionadas para las pruebas de inhibición *in vitro* ya que cumplieron con la exigencia de provenir de animales sanos, libres de patología viral y bacteriana.

Existen controversias en cuanto a la presencia de bacterias en el HP. Según Alday-Saenz (1994), el molino gástrico junto con las enzimas digestivas, previenen el acceso y colonización de bacterias en el hepatopáncreas, en tanto que su presencia indicaría fallas en los mecanismos anatomo-fisiológicos. Sin embargo, Gomez *et al.* (1998) encontraron un amplio rango de especies de *Vibrios* en el hepatopáncreas de juveniles sanos de *P. vannamei*, siendo su número significativamente menor que en el intestino y en el estómago pero de diversidad fenotípica mayor. Los autores piensan que la alimentación con pelletizado comercial pudiera alterar paulatinamente la anatomía digestiva, lo que llevaría a un mejor acceso de bacterias en la colonización del órgano (Gomez *et al.* 1998). En nuestro estudio, el número de bacterias aisladas de animales sanos fue menor que en animales enfermos. De acuerdo con Gomez *et al.* (1998) podemos afirmar la existencia de bacterias en el hepatopáncreas de animales sanos, agregando que su origen silvestre los libera de la posible alteración anatómica causada por el alimento pelletizado. Desconocemos la ruta de ingreso de las bacterias a éste órgano, pero su presencia indica que han sido capaces de resistir los procesos fisiológicos y anatómicos del organismo, por lo cual una vez inoculadas conseguirán altos porcentajes de colonización en éste órgano.

En la segunda selección (inhibición *in vitro* contra **S2**), solo 6 aislados demostraron tener una buena respuesta. La técnica utilizando bacterias vivas, permitió

mejor definición en la determinación de los halos inhibitorios. La cepa P62 fue la que tuvo mayor actividad de inhibición contra S2. Los diámetros de inhibición (Tabla 1) no son comparables entre las diferentes cepas, ya que no se utilizaron discos bacterianos de sensibilidad para lograr uniformidad en la comparación.

Las cepas resultantes de la segunda selección fueron identificadas fenotípicamente (bioquímica) hasta taxonomía de género. Las características morfológicas, la habilidad de fermentar carbohidratos y la prueba de crecimiento en 0% NaCl, fueron decisivas para clasificar las bacterias P62, P63, P65, P66 dentro del género *Vibrio*, P67 dentro del género *Pseudomona*, y P64 Gram (+), dentro del género *Bacillus*.

Es importante considerar lo que representa la bioquímica como sistema de clasificación simplista y estático, frente a la extrema complejidad y variabilidad de los microorganismos en constante evolución genética y consecuentemente fenotípica. De esta forma, éstos resultados aparecen como una primera etapa en la clasificación, pero ciertamente no suficiente. Por tal motivo se realizó la caracterización genotípica mediante “fingerprinting” con AFLPs con ayuda del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent, los cuales confirmaron los resultados obtenidos.

De acuerdo con Moriarty (1990), *Vibrios* y *Pseudomonas* son los géneros más comunes presentes en los crustáceos. Algunas especies como *V. fluvialis* y *V. campbellii* fueron aisladas por Wang et al. (fide) del intestino de *Penaeus chinensis* y utilizadas como probióticos en larvicultura de camarón. Gomez et al. (1998) aislaron del HP de juveniles de *P. vannamei*, 7 especies de *Vibrio*; *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. mimicus*, *V. pelagius*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*, *V. vulnificus*; un *Photobacterium phosphoreum* y un *Vibrio* spp. Algunas de éstas especies han sido usadas como patógenos en pruebas de inhibición *in vitro*. Ruangpan et al. (1998) demostraron que la cepa NICA 103 1 de *V. alginolyticus* fue eficiente en inhibir *in vitro* el crecimiento de *V. harveyi*. Por otro lado Tanasomwang et al. (1998) reportaron 27 cepas de *Alteromonas* capaces de inhibir 50 cepas de *Vibrios*, entre ellos *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *Vibrio* spp.

El género *Bacillus* si bien no se encuentra dentro de los géneros comunes en ambientes marinos por tratarse de un microorganismo de origen telúrico, ha sido aislado del intestino de crustáceos (Rengpipat et al. 2000), peces marinos (Sugita et al. 1998), y

bivalvos (Sugita et al. 1981). Su efecto inhibitor *in vitro* fue estudiado por Rengpipat et al. (1998), reportando que la cepa de *Bacillus* S11 tuvo un buen efecto inhibitor contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Similares resultados han sido reportados por Sugita et al. (1998) para *BaciZZus* sp. utilizando el patógeno *V. vulnificus*.

Antes de iniciar los bioensayos de colonización e interacción, se determinó el perfil RAPDs de las cepas bacterianas con 3 iniciadores. Esta técnica fue una excelente herramienta, permitiéndonos obtener perfiles de RAPDs específicos de las cepas inoculadas en los dos bioensayos, sin necesidad de conocer la secuencia genética de cada bacteria. Además el uso de 3 iniciadores permitió aclarar confusiones ocasionadas por similitud de bandas utilizando uno u otro iniciador.

Las pruebas de colonización, permitieron determinar la capacidad de las bacterias de reingresar al HP. Para las cepas *Vibrio* P62 y *Vibrio* P63, no se registraron diferencias significativas en la cantidad total de UFC/g HP con el control, pero el porcentaje de colonización alcanzado por el *Vibrio* P62 fue el más alto registrado, indicando su capacidad de inhibir bacterias autóctonas, o bien ejercer un mecanismo de sustitución competitiva. En el caso del *Vibrio* P63, la concentración bacteriana que ingresó fue menor, aunque igualmente supero el 50%. Estas bacterias demostraron ocupar el mismo nicho biológico que las bacterias autóctonas, demostrando que la incorporación de altas concentraciones bacterianas, es eficiente en la sustitución y modificación de la flora natural dentro del organismo.

La cantidad total de UFC/g de HP fue mayor en animales inoculados con el *Bacillus* P64 y los *Vibrios* P65 y P66 que en el control. De acuerdo con Gatesoupe (1999) es poco probable que cepas de *BaciZZus* spp. puedan colonizar y multiplicarse en el tracto digestivo. Posiblemente permanezcan activas durante el tránsito, ejerciendo de ésta forma la exclusión competitiva sobre la flora residente. En éste estudio la cepa *BaciZZus* P64 tuvo un 58.4% de colonización, pero desconocemos cuanto tiempo logrará permanecer en el HP, lo mismo para las otras bacterias inoculadas. Esta bacteria junto con P62 y P63 colonizaron por encima del 50%, motivo por el cual se decidió enfrentarlas a S2 en la prueba de interacción *in vivo*.

Los animales inoculados con la cepa P65 sufrieron un aumento del 40% en la población microbiana total del HP (6.1×10^4 UFC/g), presentando además necrosis a nivel intestinal. Es posible que la excesiva carga de bacterias en el organismo tuviese

relación con los daños intestinales. Gomez *et al.* (1998) encontraron que la concentración de bacterias en el HP de animales sanos, llegó a 4.3×10^4 UFC/g y en el intestino a 2×10^6 UFC/g, encontrando diferencias significativas en el número total de bacterias entre éstos dos órganos. Esto sugiere que los animales inoculados con la cepa P65 tendrían alta carga bacteriana a nivel intestinal. Sin embargo, es discutible que la concentración bacteriana sea la causa de patogenicidad, probablemente la especie también esté involucrada. Sung *et al.* (1999) encontraron una concentración de 2×10^4 UFC/g de HP asociada a enfermedades siendo las especies dominantes *V. harveyi* y *V. carchariae*. Similares resultados obtuvieron Sung *et al.* (2001) reportando una concentración de 2.6×10^4 UFC/g de HP asociada a enfermedad en juveniles de *P. monodon*, siendo la especie predominante en este caso *V. parahemolyticus*. Según estos autores, para que la vibriosis ocurra es necesario que incremente el número de Vibrios patogénicos, sin embargo esto no implica que aumente el número total de Vibrios de la población. Debemos realizar más ensayos para determinar si el *Vibrio* P65 demuestra su patogenicidad a diferentes concentraciones; además por concepto de bioseguridad, sería importante realizar su caracterización genotípica a nivel taxonómico de especie. Las cepas P66, P67 e Ili mostraron porcentajes de colonización menores al 50% por lo cual fueron descartadas para la prueba de interacción con S2.

De acuerdo con Skjermo y Vadstein (1999), la colonización de los animales por bacterias, es un mecanismo complejo ya que la estabilización depende de varios factores como propiedades de adhesión de las bacterias, especificidad de las bacterias por el lugar, factores de estrés, dieta y factores ambientales. Es necesario realizar estudios de colonización bajo diferentes condiciones experimentales para establecer los factores limitantes y óptimos para la colonización y adhesión de cada bacteria.

El tiempo de exposición al patógeno del 2° bioensayo se basó en la investigación realizada por Sung y Song (1996) donde observaron la distribución del antígeno de *V. vulnificus*, en los tejidos de *P. monodon* mediante la técnica de inmunofluorescencia. La bacteria fue encontrada en el HP a las 6 hrs posteriores a la inmersión, registrándose la máxima **fluorecencia** en este órgano a las 12 hrs y manteniéndose relativamente presente incluso luego de 3 días post-inmersión (Sung y Song 1996).

El ingreso de las cepas P62, P63 y P64 fue demostrado por el número total de UFC/g de HP con respecto al control. La concentración total de bacterias aumentó en un

64% con la inoculación de S2, y hasta en un 80% al incluir los probióticos. 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 %. Sin embargo la cepa *Vibrio* P63, tuvo un efecto débil frente al patógeno, logrando solo un 19% inhibición.

Cabe mencionar que los resultados obtenidos por la cepa *Vibrio* P62 en el bioensayo de interacción, fueron concordantes con los obtenidos en la prueba de antagonismo *in vitro*. En ambas pruebas logró superar los resultados obtenidos por la otras cepas utilizadas demostrando ser un buen inhibidor de *V. harveyi*.

Varios factores pudieron influir en la producción del antagonismo bacteriano. La presencia de agentes antimicrobianos **tales** como antibióticos o péptidos sintetizados por las bacterias pueden ser ejemplos. Existe la controversia de que los agentes antimicrobianos producidos por las bacterias marinas, guarden similitud con los antibióticos actualmente usados en acuicultura, ocasionando resistencia bacteriana que comprometa la terapia. La **mayoría** de los antibióticos descubiertos, han sido aislados de hongos o bacterias de origen terrestre y solamente poco organismos marinos han sido reportados como productores de antibióticos; entre ellos la mayoría del género *Alteromona* (Dopazo *et al.* 1988; Tanasomwang *et al.* 1998). Los *Bacillus* sin embargo, han sido vinculados a la producción de polimixina, bacitracina, tiricodin y gramicidin (AquaFarm News 1996), aunque su acción también ha sido vinculada a otros mecanismos. Sugita *et al.* (1998) reportó que la actividad antibacterial de *Bacillus* sp. aislado del intestino de *Callionymus* sp. se debe a la presencia de una sustancia “siderophore” termo lábil, con amplio espectro antibacterial. Moriarty (1998) mencionó que los *Bacillus* compiten por nutrientes y de ésta forma inhiben otras bacterias de rápido crecimiento.

El uso de especies de *Vibrios* como probióticos es un tema controversial, ya que dentro de éste género se encuentran especies que han sido asociadas a patologías del camarón. Vandenberghe *et al.* (1999) identificaron genotípicamente los *Vibrios* asociados al cultivo de *P. vannamei* en Ecuador y en México encontrando la especie *V. alginolyticus* asociada a cultivos de camarones sanos y enfermos, tanto en juveniles como en larvas. Sin embargo el comportamiento de la cepa Ili de *V. alginolyticus* ha sido estudiado en cultivos k-varios en el CENAIM, estableciéndose como una

herramienta efectiva en la prevención de enfermedades relacionadas con *V. harveyi* en larvas (Zherdmant et al. 1997). Los peligros de usar la cepa patógena de *V. alginolyticus* como probiótico son reales, por éste motivo y de acuerdo con Vandenberghe et al. (1999) la identificación genotípica de todas las cepas a ser utilizadas como probióticos es un punto indispensable como norma de seguridad, además de reforzar los controles en relación a la transferencia genética de factores de patogenicidad entre especies de Vibrios, en uso masivo de probióticos en camaronerías.

Al contrario de los Vibrios, el género *Bacillus* no ha sido asociado a patologías de organismos acuáticos, razón por la cuál se ha promovido su uso. Según Jory (1998), en la actualidad hay aproximadamente 15 especies de *BaciZZus* que son los principales componentes de probióticos comerciales. Sus beneficios han sido observados por Moriarty (1998) en estanques de engorde de camarón en Indonesia, demostrando que la incorporación de *BaciZZus* spp. en el agua cambió la composición de especies bacterianas, decreciendo la proporción de *Vibrio* sp. luminiscente y mejorando la producción.

Resultados de pruebas de desafío contra *V. haweyi* fueron reportados por Rengpipat et al. (1998), utilizando la cepa *BaciZZus* S11 en *P. monodon*, observando 100% de supervivencia en los tanques con probiótico y 26 % en el control, luego de 10 días de exposición. En tanques con probióticos, las colonias de *BaciZZus* S11 fueron la principal bacteria (10^7 y 10^8 UFC/ml) con bajas concentraciones de *Vibrio* spp. en el agua 10^5 UFC/ml y en el intestino 10^2 CFU/ml (Rengpipat et al. 1998). Los autores mencionan que la cepa *BaciZZus* S11 produciría sustancias microbicidas que afectan el crecimiento de *V. harveyi* (1998).

Si bien sigue siendo difícil saber por cuanto tiempo la cepa *BaciZZus* P64 permanecerá activa o crecerá en el HP, sus características de interacción, junto a los resultados obtenidos en colonización, la hacen ser una cepa prometedora en trabajos de investigación y producción.

Es importante mencionar, que a pesar de la alta concentración bacteriana del control S2 y la necrosis intestinal, no se observaron daños externos ni mortalidad, posiblemente a causa del corto tiempo de exposición al patógeno, la edad de los animales, o la ausencia de los factores interactuantes. Li et al. (1996) demostraron que las mortalidades por Vibrios son dependientes de la dosis, periodo de exposición, y edad

del camarón. Las bacterias del género *Vibrio* son patógenos oportunistas (Lightner *et al.* 1992; Sung *et al.* 1994; Hammed 1996; Liu *et al.* 1996) causando enfermedad cuando el camarón está bajo estrés o débil. En la mayoría de los casos, las infecciones letales aparecen asociadas a condiciones primarias como infecciones virales o carencias nutricionales (Alday y Flegel 1999).

En el ensayo de evaluación de las cepas probióticas como inmunoestimulantes, 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* (cepa Ili) respecto al control. Rengpipat *et al.* (1998) reportaron resultados similares en Pl 30 de *P. monodon* con la utilización de *Bacillus* S11 como probiótico en el alimento no encontrando diferencias significativas en crecimiento ($p > 0.05$) entre los tratamientos probióticos, pero sí entre probióticos y el control ($p < 0.05$). después de alimentar durante 100 días con células frescas, células en solución salina normal y liofilizadas. Rengpipat *et al.* (2000) luego de alimentar 90 días con *Bacillus* S11 tanques de *P. monodon*, encontraron que los camarones tratados con probiótico tuvieron mayor supervivencia que los no tratados, sin embargo no hubieron diferencias significativas en el crecimiento atribuyéndolos éstos resultados a diferentes condiciones de cultivo que en el año 1998. Garriques y Arévalo (1995) utilizando una cepa de *V. alginolyticus* en larvicultura comercial de *P. vannamei* en Ecuador, reportaron menor peso promedio en el grupo control (7.1mg) que en el tratado con probiótico (7.8 mg), aunque sin datos estadísticos.

Dentro de las ventajas en el uso de probióticos, se considera su influencia en la actividad digestiva mediante síntesis de vitaminas o cofactores; mejora en la actividad enzimática (Fuller 1989; Gatesoupe 1999), predigestión de proteínas (Ziemer y Gibson 1998), producción de exoenzimas eficientes en romper polímeros de celulosa y almidón (Jory 1999). Sin duda, éstas propiedades **podrían** ser la causa del incremento en el peso, influyendo en una mejora sustancial de la digestión o absorción de nutrientes. Sin embargo el efecto de estimular el crecimiento por si mismo es discutible por tener resultados variables. En animales terrestres, son pocos los reportes publicados en el campo experimental con buenos controles que permitan mantener éste concepto a gran escala. De acuerdo con Fuller (1989), la dieta es uno de los varios factores que puede influenciar en los resultados obtenidos con los probióticos, en primer lugar porque

desconocemos el mecanismo exacto por el cual operan, desconocemos que nutriente, o en su defecto cuales enzimas influyen para mejorar la digestión. Puede suceder que el fenómeno opere solamente porque la sustitución de una microflora depresiva elimine agentes microbianos limitantes del crecimiento. En particular, cualquier promotor de crecimiento está condicionado a los factores que operan junto con él, razón por la cual sus resultados están sujetos a un alto grado de variabilidad. Así la consecuencia práctica de trabajar con probióticos como estimuladores de crecimiento puede no ser la misma bajo diferentes condiciones.

En base a esto, no se debe considerar a las cepas P62, P64 e Ili exclusivamente como promotores del crecimiento y sí asociadas a mejorar la salud general de los camarones. Al respecto, 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 deteriora la salud de los camarones. Sin embargo, las cepas bacterianas *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* (Ili) han sido más efectivas que *Vibrio* P62 en estimular la respuesta inmunitaria en los camarones.

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. Los camarones estimulados con las bacterias *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* (Ili) no mostraron cambios significativos del NHT, pero sí un aumento significativo en la población de células hialinas con disminución de la población de SG. No sabemos si hubo modificaciones en la producción de hemocitos, o si las células SG estarían siendo utilizadas por los animales estimulados infiltrando los tejidos como tejido conectivo del estómago y branquias, como ocurre en el caso de infecciones bacterianas.

El número de hemocitos GR no fue significativamente diferente entre los tratamientos y el control, sin embargo en porcentaje, su concentración fue mayor en los camarones estimulados con *Bacillus* P64. De acuerdo con Vargas-Albores *et al.* (1997) los gránulos presentes en éstos hemocitos, contienen enzimas del sistema proPO. Los valores de PO presentes en la hemolinfa para todos los tratamientos, fueron significativamente altos, 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 en los animales tratados con respecto al control. Estudios de inestímulo *in vivo* utilizando bacterina de *V. vulnificus*, fueron realizados por Sung *et al.* (1996) evaluaron los parámetros inmunes a las 3, 6, 12 y 24 hrs en camarones *P. monodon* después de 3hrs de contacto por inmersión con el antígeno. La estimulación del sistema PO se presentó antes que la producción de ROIs y la actividad antibacteriana, en cambio la generación de radicales de oxígeno fue aumentando hasta alcanzar niveles significativos a las 6 hrs y disminuyendo hasta valores menores que el control hacia las 12 hrs (Sung *et al.* 1996). Frente a la inoculación de bacterias vivas, esperaríamos que éste mecanismo celular se mantuviera activado, sin embargo, la tasa de estimulación no difirió significativamente del control 12 hrs después del último inóculo. 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.

La evaluación del índice inmunitario global, demostró que las cepas bacterianas *Bacillus* P64 y *V. alginolyticus* mantienen el sistema inmunitario de los camarones más activo que con *Vibrio* P62. Los resultados obtenidos para la cepa *Bacillus* P64 concuerdan con los obtenidos por Rengpipat *et al.* (2000) con la cepa *Bacillus* S II en *P. monodon*. Si bien los valores inmunitarios no pueden ser comparados debido a que las técnicas utilizadas para la determinación del índice fagocitario, actividad fenoloxidasa y actividad antibacteriana son diferentes a las utilizadas en este trabajo, estos autores reportaron que el *Bacillus* S11 provee una protección contra las enfermedades activando los sistemas de defensa inmunitarios e interviniendo además, en el mecanismo de exclusión competitiva en el intestino de los camarones.

En el caso del *Vibrio* P62, desconocemos la vía de entrada de esta bacteria en los camarones, pero quizás su alto poder de colonización pueda estar vinculado a la evasión de las barreras celulares y humorales de defensa. Tizard (1988) mencionó que la aparición de cápsulas antifagocitarias y el parasitismo intracelular facultativo, junto con la secreción de factores depresores de la fagocitosis, son mecanismos que utilizan las bacterias para eludir la respuesta inmune en vertebrados. Hasta el momento se

desconocen la presencia de estos mecanismos para bacterias marinas, aunque no podemos descartar su existencia.

Los resultados demuestran que las cepas bacterianas *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64 son prometedoras para establecerse en un futuro no lejano como probióticos en la prevención de enfermedades del camarón *P. vannamei*. Debemos tener claro que se trata solamente de una primera etapa que abre camino hacia un mejor conocimiento de las bacterias benéficas asociadas a los camarones y sus relaciones de interacción con la microflora, siendo el objetivo principal explotar sus beneficios limitando la aparición de bacterias patógenas en los cultivos por exclusión competitiva o por estimulación de las reacciones de defensa del hospedero.

5. CONCLUSIONES

1. En este estudio demostramos como las bacterias benéficas aisladas de la microflora autóctona del HP son competidoras potenciales de bacterias patógenas.
2. De las 80 cepas bacterianas aisladas del HP de camarones silvestres, 2 cumplieron con la exigencia de provenir de animales sanos, alcanzar altos porcentajes de colonización (> 50%) en camarones de Ig e inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* el crecimiento de *V. harveyi*, no provocando danos histológicos a una concentración de inóculo de 10^7 UFC/ml.
3. Las mismas han sido identificadas a nivel taxonómico de género como *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64, mediante caracterización fenotípica (bioquímica) y genotípica (AFLPs).
4. La utilización de la técnica AP-PCR mostró ser eficaz en el diagnóstico de la colonización y estudio de las interacciones entre las cepas probióticas, flora autóctona y el patógeno, evitando el largo procedimiento de identificación bioquímica.
5. El empleo de los iniciadores OPA8, OPA9 y OPA10 y la utilización de poliacrilamida al 8% para la separación de los productos de amplificación, brindaron alto grado de confiabilidad al diagnóstico, siendo los controles positivos perfectamente reproducibles y comparables con las bacterias recuperadas del HP post-colonización.
6. 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.

7. 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.

8. 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.

6. RECOMENDACIONES

Las cepas de *Vibrios* podrían ser nocivas o dañinas a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Serán necesarias otras experimentaciones con diferentes parámetros y dosis extremas de **inóculo** para determinar de forma más concluyente la inocuidad de estas cepas. Tales experimentaciones deberán ser realizadas paralelamente con diferentes concentraciones de bacterias patógenas a fin de determinar los niveles de infección soportados por los camarones frente a la administración de probióticos.

Se deberán emprender estudios de interacción en tanques de precría bajo el mismo esquema de diagnóstico. En sistemas de precría hay más bacterias en el agua y en el suelo que en sistemas experimentales, por lo que la población colonizadora será más diversa y abundante. Se deberá investigar si ambas bacterias probióticas son capaces de mantener su efecto de exclusión competitiva en éstas circunstancias.

La producción de un probiótico que colonice y solamente necesite de una administración sería ideal, pero muy difícil de lograr en la práctica. Es posible que los efectos antagónicos producidos después de la interrupción del tratamiento cesen. Experimentaciones con soporte inmunohistológico y microscopia electrónica deberán ser desarrolladas para analizar el efecto citopático y la capacidad de adhesión de las bacterias a las células, estableciendo de ésta forma el tiempo de permanencia en el órgano colonizado.

Sería importante establecer la frecuencia de administración no solo con relación al efecto de exclusión competitiva, sino también al carácter inmunoestimulante. Es primordial conocer la periodicidad de administración de la cepa *Bacillus* P64 para mantener el sistema inmunológico activado sobre todo en situaciones de riesgo epidemiológico.

Los efectos asociativos de las mezclas probióticas a veces son difíciles de evaluar. Se debe conocer primero si existe un efecto inhibitorio entre ellas, antes de testar contra el patógeno. La realización de cultivos mixtos entre cepas bacterianas probióticas, autóctonas y patógenas, o los análisis de toxicidad de sobrenadantes de cultivos ayudaría a estudiar este tipo de interacción.

Siendo el sistema de defensa de los camarones no específico, sería interesante probar sus cualidades inmunoestimulantes contra infecciones virales como el WSSV.

Investigar si éstas bacterias probióticas presentan plásmidos relacionados con la producción de **bactericinas** o incluso sustancias inmunomodulativas capaces de prevenir infecciones virales, **daría** un buen aporte en lo que se refiere a la manipulación genética de cepas probióticas.

Completar la caracterización genotípica de las cepas *Vibrio* P62 y *Bacillus* P64 es primordial como norma de bioseguridad. Dirigir el trabajo a la identificación de genes implicados en los procesos de patogenicidad y probiosis mediante técnicas de biología molecular, nos resolvería parte de la controversia existente hoy en día para el caso del uso de Vibrios como probióticos.

Una vez concluídos estos trabajos es esencial investigar la mejor forma de administración y conocer la dosis efectiva mínima para estabilizar los efectos del probiótico permitiendo la reducción de costos de producción.

Se necesita más información acerca de la manera en que los probióticos actúan. Cuando se obtenga esa clase de información, será posible someter las cepas bacterianas a manipulación genética, siendo posible mantener juntos la habilidad de sobrevivir en el organismo con la habilidad de producción de metabolitos responsables del efecto probiótico.

7. REFERENCIAS

- Adams, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. *Fish and Shellfish Immunology* 1: 59-70.
- Alday-Saenz, V. 1994. Studies on the pathogenesis of *Vibrio spp.* infection in *Penaeus monodon* Fabricius, Ph.D thesis. Univ. of Stirling, Scotland.
- Alday, V. y Flegel, T. 1999. Diagnosis of Shrimp Diseases: with emphasis on the black tiger shrimp *P. monodon*. (en CD-ROM)- FAO Multimedia Asia Co, Ltd.
- Aqua Farm News. 1996. Using bacteria to fight bacteria. *Aqua Farm News* Vol. XIV (4 and 5), 12-13, 17.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A., Effendi, I. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18: 93-96.
- Babior, B. 1988. Microbicidal oxidant production by phagocytes. *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*, Alan R. Liss, Inc., 39-51.
- Bachère, E., Mialhe, E., Rodríguez, J. 1995. Identification of defense parameters in the haemolymph of crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate), prospects and application. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 597-612.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191: 71-88.
- Bell, T.A. y Lightner, D.V. 1988. A Handbook of Normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. University of Arizona, USA.
- Bergey 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.R. Krieg editor. Williams and Wilkins, London.
- Boyd, C.E. y Massaut, L. 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering* 20: 113-132.
- Chisholm, J.R.S. y Smith, V. 1992. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J. Marine Biology. Assoc.* 72: 529-542.

- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachère, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). The Journal of Biological Chemistry 45:28398-28406.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Bulet, P., Bachère, E. 2000a. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 1260- 1271.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère, E. 2000b. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science, 113: 461-469.
- Direkbusarakom, S., Yoshimizu, M., Ezura, Y., Ruangpan, L., Danayadol, Y. 1997. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogens viruses. Journal of Marine Biotechnology 6: 266-267.
- Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). Comp. Biochemistry Physiology 32: 709-731.
- Dopazo, C.P., Lemos, M.L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, L., Toranzo, A.L. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology 65:97-101.
- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S., De Simone, C. 1997. Stimulation of immunity by probiotics. Pages 137-161 in: R. Fuller, editor. Probiotics 2. Applications and practical aspects. Chapman and Hall, London.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 66: 365-378.
- Garriques, D. y Arevalo, G. 1995. An Evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. Pages 53-59 in Browdy C.L. y Hopkins, J.S., editores. Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

- Gibson, J. M. Saavedra, S. Macfarlane and G.T. Macfarlane. 1997. Probiotics and intestinal infections. Pages 10-31 in R. Fuller, editor. Probiotics 2. Chapman and Hall, London.
- Gomez-Gill, B. and Roque, A. 1998. Selection of probiotic bacteria for use in aquaculture. Page 174 in T.W. Flegel, T.W. editor. **Advances in Shrimp Biotechnology**, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiangmai, Thailand.
- Gomez-Gill, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Tumbull, J.F., Inglis, V., Guerra-Flores, A.L. 1998. **Species** of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163: 1-9.
- Gomez-Gill, B., Roque, A., Tumbull, F. J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. Aquaculture 191: 259-270.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. Appl. Environ. Microbiology 65: 969-973.
- Griffith, D.R.W. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: P. Lavens, E. Jaspers, I. Roelants editores. Larvi' 95 – Fish and Shellfish Larviculture. Symposium European Aquaculture Society, Special Publication, Gent, Belgium.
- Hammed, A.S., Sahul. 1995. Susceptibility of three penaeus species to a *Vibrio campbellii* - like Bacterium. Journal of the World Aquaculture Society 26: 315-310.
- Hernández-López, J., Gollas-Galvan, T., Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C: 61-66.
- Huber, J.T. 1997. Probiotics in cattle. Pages 162-186 in R. Fuller editor. Probiotics 2, Chapman and Hall, London.
- Hungate, R.E. 1975. The rumen microbial ecosystem. Ann Rev. Ecol. Syst. 6: 39-66.

- Inco, 2001. Antibacterial activity assay on shrimp plasma. Pages 15-17 in: Shrimp immunology. Training Course. European Union SI & DC INCO-DC Project. Hermosillo, Sonora; Mexico.
- Itami, T., Kubono, K., Asano, M., Tokushige, K., Takeno, N., Nishimura, H., Kondo, M., Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164: 277-288.
- Johansson, M.W. and Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPo system. *Parasitology Today* 5: 171 - 176.
- Jory, D. 1998. Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquaculture Magazine* January / February, 62-67.
- Karunasagar, I., Otta, S.K., Joseph, B. 1999. Manejo de las enfermedades del camarón, con énfasis en el uso de Probióticos e Inmunoestimulantes. In: Memorias del V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil -Ecuador.
- Kessler, 1981. Preparing *S. aureus* for Collecting Immune Complexes. Pages 620-621 in: E. Harlow and D. Lane editores. *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Klein, J. 1982. Immunology The Science of Self-Nonself Discrimination. Pages 424-429 in: J. Wiley and Sons editores. A Wiley-Interscience Publication, USA.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. C., Levy, P. 1998. Effect of hipoxie stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with moult cycle, protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 621-629.
- Lightner, D.V. 1983. Disease of culture penaeid shrimp. Pages 289-320 in: J.P. McVey editor. *Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture*. CRC. Press. Boca Raton, Florida, USA
- Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohny, L.L. 1992. A Review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/ shrimps of the Americas and Indopacific. Pages 57-80 in M. Shariff; R.P. Subasinghe and J.R. Arthur editores. *Diseases in Asian Aquaculture* 1, USA.

- Li, J., Li, Y., Wang, X.H., Zhang, X.H., Feng, J., Zi Zhong Qi, Ji, W.S., Xu, H.S. 1996. Pathogenicity and characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from hatchery-reared *Penaeus chinensis* larvae. Report of Dept. of Marine Biology, Ocean University of Qingdao, P.R. China.
- Liu, P.C., LEE, K.K. CHEN, S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Applied Microbiology 22: 413-416.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.L., Farr, A.L., Randall, R.J. 195 1. Protein measurement with the folin phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Maeda, M. and Liao, I. C. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 21: 25-29.
- Mohney, L.L., Lightner, D. V., Bell, T. A. 1994. An epizootic of vibriosis in ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Bonne (Crustacea:Decapoda). Journal of World Aquaculture Society 25: 116-125.
- Moriarty, D.J. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. Pages 217-222 in: R. Lesel, R. editor. Microbiology in Poeciloterms. Elsevier, Amsterdam
- Moriarty, D.J. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.
- Motte, E., Betancour, I., Solis, A., Siavichay, K., Zherdmant, M., San Miguel, L., Muñoz, M. Carrera, L., Mialhe, E. *vide*. New technologies for bacteriological survey in shrimp aquaculture. CENAIM, Ecuador.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodriguez, J., Van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 19 1: 89- 107.
- Murray and Thompson, 1980. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. Pages 2-10 in: F. Ausube, R. Brent, R. Kingston editores. Short Protocols in Molecular Biology. A Compendium of Methodos from Current Protocols in Molecular Biology. New York, USA.
- Newman, G.S. 1996. Prevention of diseases in commercially reared shrimp with emphasis on the use of immunestimulants. In: Primer Congreso Latinoamericano de camaricultura y exhibición. Panamá.

- Noga, E.J., Arroll, T.A., Fan, A. 1996. Specificity and some physico-chemical characteristic of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. Fish and Shellfish Immunology 6: 403-412.
- Nogami, K. and Maeda, M. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the Crab *Portunus trituber Culatus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 4.9: 2373-2376.
- Norell, S. and Messley, K. 1997. Microbiology. Laboratory Manual. Principles and Applications. Prentice-Hall, Inc. A Simon and Schuster/Viacom Company. New Jersey, USA.
- Omori, S.A., Martin, G.G., Hose, J.E. 1989. Morphology, hemocyte lysis and colting in the ridgeback prawn, *Suconia ingentis*. Cell Tissue Research 255: 117-123.
- Perazzolo, L.M., Barraco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Dev. Comp. Immunology 21(5): 385-395.
- Peeters, M. y Rodríguez, J. 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, practicas de manejo y alternativas de control. Pag. 13-18 en El Mundo Acuícola Vol 5 (1), Cenaim, Ecuador.
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Menasveta, P., Piyatiratitivorakul, S. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Peneaus monodon*, survival and growth. Aquaculture 167: 301-3 13.
- Rengpipat, S., Rukpratanpom, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000. hnrnunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). Aquaculture 191: 271-288.
- Rodríguez, J. and Le Moullac, G. 2000, State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191: 109-1 19.
- Rodríguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachère, E. 1995. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell Science 108: 1043-1050.
- Ruangpan, L., Naanan, P., Direkburarakom, S. 1998. Inhibitory effect of *Vibrio alginolyticus* on the growth of *V. harveyi*. Fish Pathology 33(4): 293-296.
- Ruiz, C.M., Roman, G., Sánchez, J.L. 1996. A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. Aquaculture Intemational 4: 289-291.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, Y.T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- San Miguel, L. 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio *in vivo* de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, Espol, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Siavichay, K. 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor, Espol, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Skjermo, J. And Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Smith, V. and Söderhäll, K. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 233: 295-303.
- Söderhäll, D. and Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. Annual Revision, Fish Diseases 3-23.
- Söderhäll, D., Cerenius, L., Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Ann NY Acad. Science* 712: 155-161.
- Solís, P.A. 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, Espol, Ingeniería Marítima y Ciencias de Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 3: 201-209.
- Sotomayor, M.A., 2001. Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Acuicultor, Espol, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T., Deguchi, Y. 1981. Bacterial flora of coastal bivalves. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 47: 655-661.

- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269-280.
- Sung H. H. and Song Y.L. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 145: 4 1-5 1.
- Sung, H.H., Kou, G.H., Song, Y.L. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29: 11-17.
- Sung, H.H., Yang, Y.L., Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. *J. Crustacean Biology* 16: 278-284.
- Sung, H.H., Chang, H.H., Chang, J.C., Song, Y.L., 1998. Phenoloxidase activity of haemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal Invertebrate Pathology* 71(1): 26-33.
- Sung, H.H., Li, H.C., Tsai, F.M., Ting, Y.Y., Chao, W.L. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *J. Exp. Marine Biol. Ecology* 236: 261-271.
- Sung, H.H., Hsu, S.F., Chen, C.K., Ting, Y.Y., Chao, W.L. 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture* 196: 10 1- 110.
- Tanasomwang, V., Nakai, T., Nishimura, Y., Muroga, K. 1998. *Vibrio* -inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. *Fish Pathology* 33(5): 459-466.
- Tizard, I. 1988. *Immunología Veterinaria*. Interamericana S.A. de c. V. México.
- Thörnqvist, P.O. and Söderhäll, K. 1997. Crustacean Immune reactions, a short review. Pages 203-218 in T. W. Flegel, I. H. Macrae editores. *Diseases in Asian Aquaculture III*. Fish health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology* 2592-2597.

- Vargas-Albores, F., Hernández, L.J., Gollas, G.T., Hinojosa, B.P., Magallón, B.F. 1997. The brown shrimp *P. californiensis* (Holmes) prophenoloxidase system. In: Clem, L., Warr, W. editores. Issue Special Abstracts of the 7th Congress of the ISDCI, 21-25 July 1997, Williamsburg, USA.
- Vargas-Albores, F., Hernández, L.J., Gollas, G.T., Montaña, P. K., Jimenez, V.F., Yepiz, P.G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. Pages 161-166 in T. W. Flegel editor. Advances in shrimp biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiangmai, Thailand.
- Wang, X.H., Li, H.R., Feng, J., Han, L.L., Qi, Z.Z., Li, J., Li, Y., Zhang, X.H., Ji, W.S., Xu, H.S., Yang, X.S., Ma, J.K., Yu, X.Z., Sun, X.X. *vide*. Feasibility Study on the Delivery of a Probiotic Flora to Penaeid Larvae and the Bacterial Flora in the Digestive Tract of Adult Shrimp. Ocean University of Qingdao, P.R. China.
- Wyban, J.A., Swingle, J.S., Sweeney, J. N., Pruder, G.D. 1992. Development and commercial performance of high health shrimp using specific pathogen free (SPF) broodstock *Penaeus vannamei*. Pages 254-260 in: The World Aquaculture Society editor. Proceedings of the Special session on Shrimp Farming. Baton Rouge, Aquaculture 92, Orlando.
- Zherdmant, M.T. 1996. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la interacción *in vitro* con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, Espol, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Zherdmant, M.T., San Miguel, L., Serrano, J., Donoso, E., Mialhe, E. 1997. Estudio y utilización de probióticos en el Ecuador. Panorama Acuícola 2: 28.
- Ziemer, C.J. and Gibson, G.R. 1998. An Overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. International Dairy Journal 18: 473-479.

8. ANEXO

EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO Técnica simplificada (Motte et al. *fide*).

1. Transferir una colonia bacteriana en 300 μL de TAE buffer (1X) .
2. Calentar por 10 min a 100°C hasta romper la pared celular de las bacterias.
3. Enfriar los tubos en hielo.
4. Centrifugar por 10 min a 13 .000 rpm.
5. Recuperar el sobrenadante con el ADN.

CONDICIONES DE AMPLIFICACION

Cantidades de reactivos utilizados en la pre-mezcla.

Solución	Cantidad
H ₂ O	10.4 μL
Buffer 10X	2.6 μL .
MgCl ₂ 25 mM	2.1 μL
dNTPs 10 mM	0.5 μL
Primer	4.2 μL
Taq	0.2 μL
Template	5 μL /tubo

Condiciones de amplificación para RAPDs bacterianos.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Predesnaturalización (1)	94	240
Desnaturalización	94	5
Hibridación	46	45
Ramp rate	72	180
Polimerización	72	90
Polimerización final (2)	72	600
Conservación (3)	10	6000

(1) Solo primer ciclo

(2) Solo último ciclo

(3) Al completar 40 ciclos.