CENAIM INFORMA
Boletín Informativo Quincenal
30 de julio de 2001

Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei.*

Aunque la utilización de productos químicos (ej: antibióticos) 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 larvario en Ecuador, el uso de probióticos parece ser una alternativa potencial para el control de las enfermedades bacterianas que afectan a los peneidos.

El objetivo de este trabajo fue 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 26g ±3. Dos técnicas de inhibición in vitro contra el patógeno Vibrio harveyi (cepa S2) fueron utilizadas para comprobar su efecto probiótico.

Resultados

Seis de los ochenta aislados bacterianos, registrados como P62, P63, P64, P65, P66, P67 (BCCM/LMG), mostraron tener un efecto inhibidor sobre S2. Los porcentajes de colonización in vivo en animales de 1gr ± 0.2 fueron analizados utilizando perfiles de RAPDs con 3 iniciadores (Figura 1). Las cepas P62, P63, P64, lograron porcentajes de colonización de 83, 60 y 58% respectivamente. Vibrio alginolytcus (cepa lli) utilizado como probiótico control, logró un 22% de colonización. Luego de este bioensayo se descartó el aislado P65 ya que produjo lesiones histopatológicas en los animales. Con los aislados P66 y P67 se obtuvo porcentajes de colonización menores al 50%.*

*Los aislados P62 y P64 están siendo caracterizados mediante AFLPs** por Fabiano Thompson en el laboratorio del Dr. Jan Swing (Gante, Bélgica). Los resultados parciales de caracterización identifican a P62 como un Vibrio sp y a P64 como un Bacillus sp. El porcentaje de competencia in vivo probiótico versus patógeno (S2), fué evaluado utilizando RAPDs y anticuerpos monoclonales contra S_2, para caracterizar las colonias recuperadas de los camarones sometidos al desafío. Con Vibrio sp se obtuvo un porcentaje de inhibición de entrada del patógeno del 57.1%. El efecto inmunestimulante in vivo de las bacterias 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 Vibrio sp, Bacillus sp y V. alginolyticus con respecto al control sin probióticos (Figura 2). Por otra parte se encontró que los animales inoculados con los probióticos tuvieron un mayor crecimiento que los del control (Figura 3). La histopatología realizada en rutina luego de los bioensayos de competencia y de inmunoestimulación, ratificó la inocuidad de Bacillus sp y Vibrio sp, ya que no se observó ningún tipo de lesiones.*

***RAPDs:** *Técnica de PCR que utiliza iniciadores aleatorios para obtener perfiles de amplificación de una especie o población. Tiene la ventaja de que no requerir conocimientos previos de la secuencia del ADN que se va a utilizar.*

****AFLPs:** *(Amplified Fragment Length Polymorphism). Esta técnica permite la generación de marcadores moleculares de individuos, poblaciones o especies. El DNA individual al cual se le va a determinar el genotipo es inicialmente cortado con enzimas de restricción y los fragmentos son ligados a adaptadores de DNA, amplificados mediante PCR y separados en geles de poliacrilamida.*

***** Indice inmunitario global:** *La sumatoria de los índices parciales de cinco parámetros inmunitarios (Número total de hemocitos, Producción de superóxido, actividad fenoloxidasa, actividad antibacteriana y concentración de proteínas plasmáticas). Para calcular los índices parciales los valores obtenidos han sido tranformados a porcentajes. Cada parámetro medido tiene un peso máximo de 0.20 en el índice global.*

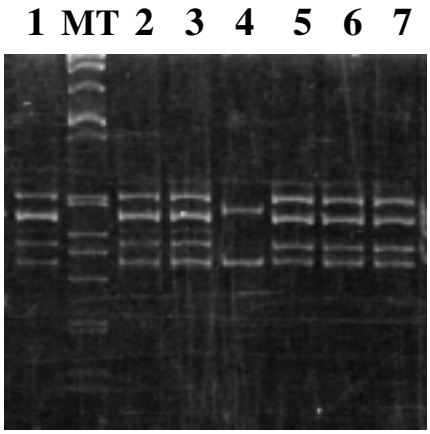

Figura 1. *Perfil RAPD en gel de poliacrilamida al 8%, de bacterias inoculadas y recuperadas luego del bioensayo de colonización. En la línea 2 Vibrio sp inoculado. En la línea 6 aislado P63 inoculado. En las otras líneas colonias recuperadas de los camarones sometidos al ensayo. Obsérvese que los perfiles en las líneas 1 y 3 son idénticos al perfil de Vibrio sp, indicando que se trata de la misma cepa bacteriana inoculada. En tanto que los perfiles en las líneas 5 y 7 son idénticos al perfil del aislado P63, indicando que se trataría de la misma cepa bacteriana inoculada. MT: Marcador de talla.*

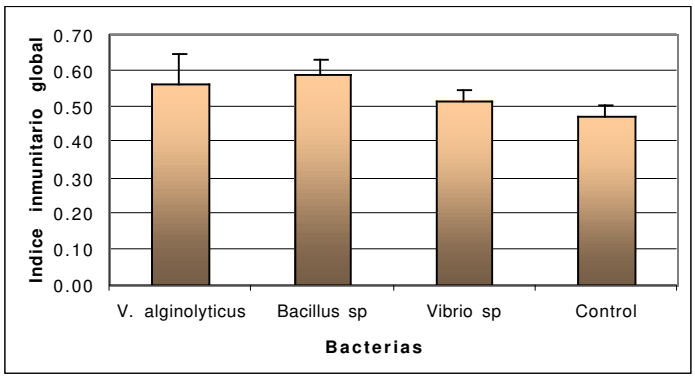

Figura 2*. Indice inmunitario global *** de los animales tratados con tres probióticos, Vibrio sp, Bacillus sp y Vibrio alginolyticus.*

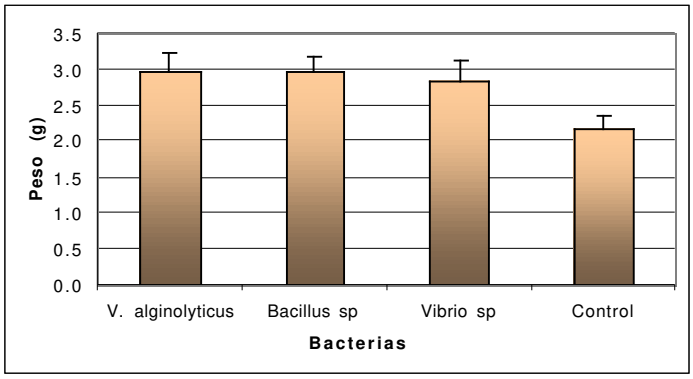

Figura 3*. Peso final de los animales tratados con tres probióticos, Vibrio sp, Bacillus sp y Vibrio alginolyticus.*

Trabajo de Tesis de Mariel Gullian, Director: Jenny Rodríguez, Ph.D. (CENAIM)

Fundación CENAIM - ESPOL * Teléfonos: 593-4-269494 / 750 / 751 * Fax: 593-4-269492
cenaim@espol.edu.ec * www.cenaim.espol.edu.ec