



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

INDICE

| | |
|---|------|
| INDICE DE FIGURAS | IV |
| INDICE DE TABLAS..... | V |
| ABREVIATURAS | VI |
| RESUMEN..... | VIII |
| 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 el patógeno | 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..... | 8 |
| 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 | 10 |
| 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 |
| 2.1.1. Cepas bacterianas..... | 12 |
| 2.1.2. Animales | 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. harveyi</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 | 19 |
| 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 |
| 2.2.7.4. Concentración de proteínas plasmáticas (PP) | 21 |
| 2.2.7.5. Cálculo del índice inmunitario | 21 |
| 2.2.8. Pruebas inmunitarias <i>in vitro</i> para la evaluación de la interacción probiótico | |
| plasma..... | 22 |
| 2.2.8.1. Cuantificación de la actividad Fenoloxidasa <i>in vitro</i> | 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..... | 31 |
| 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 | 33 |
| 5. CONCLUSIONES | 42 |
| 6. RECOMENDACIONES | 44 |
| 7. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS | 46 |
| 8. ANEXO | 55 |

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, Pseudomona y 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 poliacrilamida con los iniciadores, OPA9 y OPA10.... | 27 |
| Fig. 11. Porcentaje 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 Fenoloxidasa de las bacterias Ili, P64, P62 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 31 |
| Fig. 17. Índice Inmunitario global de los animales inoculados con las bacterias P62, P64, Ili. | 32 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición | 23 |
| Tabla 2. Identificación fenotípica de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 en base a criterios morfológicos y bioquímicos..... | 24 |
| Tabla 3. Valores inmunitarios de camarones estimulados con Ili, P64, P62 y control ... | 32 |
| Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados en la pre-mezcla..... | 55 |
| Tabla 5. Condiciones de amplificación para RAPDs bacterianos..... | 55 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|--|
| AA | Actividad antibacteriana |
| ADN | Acido desoxiribonucleico |
| AFLP | Polimorfismo de longitud en fragmentos amplificados |
| AP-PCR | Reacción de polimerización en cadena iniciada aleatoriamente |
| BG | Betaglucanos |
| Ca ⁺⁺ | ion calcio |
| Cac | Acido cacodílico |
| °C | Grados centígrados |
| dNTP _s | deoxinucleótido trifosfato |
| DHC | Conteo hemocitario diferencial |
| D.O. | Densidad óptica |
| DOPA | dihidroxifenilalanina |
| g | gramo |
| GR | Granulosos |
| HH | Hialinos |
| HP | Hepatopáncreas |
| hrs | Horas |
| Ili | Cepa probiótica de <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| Lb agar | Agar Luria Bertani |
| Lb-broth | Caldo Luria Bertani |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| lts | litros |
| mg | miligramos |
| ml | mililitros |
| NaCl | Cloruro de Sodio |
| NBT | Nitro blue tetrazolium |
| ng | nanogramo |
| NHT | Número total de hemocitos |
| nm | nanómetro |
| O ₂ ⁻ | Anión Superóxido |
| OPA | Código de oligonucleótidos sintéticos |

| | |
|-------|--|
| pls | postlarvas |
| PG | Peptidoglucanos |
| PO | Fenoloxidasa |
| PP | Proteínas plasmáticas |
| ProPO | Profenoloxidasa |
| ® | Marca registrada |
| RAPD | Patrones de polimorfismo aleatorio de ADN |
| ROIs | Intermediarios de 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 |
| TM | Toneladas métricas |
| ups | unidades prácticas de salinidad |
| UFC | Unidad formadora de colonias |
| μ | micras |
| μg | microgramo |
| μl | microlitro |
| μM | micromol |
| U.V. | ultravioleta |
| v/v | volumen / volumen |

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 larvario 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 hepatopancreas de camarones silvestres sanos. Los camarones fueron capturados en San Pablo (Prov. Guayas, Ecuador) y tuvieron un peso de $26 \text{ g} \pm 3$. 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 (BCCM/LMG) mostraron tener un efecto inhibidor sobre S2. 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 $1 \text{ gr} \pm 0.2$ fueron analizados utilizando perfiles de RAPDs con 3 iniciadores. Las cepas P62, P63, P64, lograron porcentajes de colonización de 83, 60.8 y 58.4 % respectivamente. La cepa *Vibrio* P65 fue descartada por causar daños histopatológicos. *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili) utilizado como probiótico control, logró un 22% de colonización. El porcentaje de competencia probiótica *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 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 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.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria camaronera en la última década, ha estado caracterizado por el surgimiento de muchas restricciones en la producción, entre ellas la más importante es la ocurrencia de enfermedades infecciosas. Desde 1994 la producción mundial de camarón ha mantenido su mismo volumen. El aumento de producción en las zonas que se recuperan de las enfermedades, no ha podido compensar el descenso registrado en las zonas donde aún se están padeciendo.

En Taiwan por ejemplo, la producción de camarón en el año 1987-88 decayó mas del 60% debido a una masiva mortalidad causada por agentes patógenos. Semejante situación se vive actualmente en Ecuador, enfrentando en el año 2000 la crisis de producción más aguda en su historia a consecuencia del virus de la mancha blanca (WSSV). En ese año la producción alcanzó 45.000 TM, un 50% menos que en 1999, y 70% menos con respecto a 1998. Esta situación repercutió considerablemente en la reducción de los volúmenes exportables, generado un gran impacto económico y social.

Al igual que esta afección viral, agentes patógenos bacterianos han estado igualmente implicados. Algunas especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum* *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, han sido frecuentemente asociados a mortalidades, siendo responsables de grandes pérdidas económicas tanto en larvicultura como en engorde. Estos agentes bacterianos considerados oportunistas, asumen un perfil patológico bajo condiciones ambientales o fisiológicas de estrés.

Ante la desesperación del sector productivo, muchas medidas se han tomado para mitigar las pérdidas económicas. La ausencia de métodos efectivos en el control de las enfermedades, tornó la utilización de antibióticos una práctica rutinaria. El abuso en las concentraciones y la falta de información en cuanto a su espectro de acción, han sido las principales causas de aparición de cepas bacterianas resistentes en los cultivos de camarón.

El aumento de la resistencia, y las condiciones patológicas en las cuales los antibióticos no responden, han llevado a experimentar con una amplia gama de alternativas terapéuticas, la mayoría con éxito relativo. Lo cierto es que actualmente, los 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 algunos laboratorios de cultivo larvario en Ecuador, el uso de bacterias probióticas ha demostrado ser eficiente en la profilaxis de enfermedades bacterianas relacionadas a la vibriosis. 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. 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 intentando modificar la flora bacteriana presente en sistemas de acuicultura, con el fin de prevenir enfermedades y aumentar la producción. Se han usado bacterias benéficas para la descomposición de materia orgánica, reducción de 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 & 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 nutrientes (Fuller, 1989; Wang *et al.*, *fide*), tendrían directa intervención del huésped.

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 *et al.*, (1998a) 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 *et al.*, 1998a).

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 & Maeda, 1992; Direkbusarakom *et al.*, 1997; Tanasomwang *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998). Otros investigadores en cambio, han aislado del intestino de diferentes especies de peneidos (Wang *et al.*, *fide*;

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* (Griffith, 1995; Garriques & Arévalo, 1995), *Vibrio fluvialis*, *Vibrio campbellii* (Wang *et al.*, *fide*), 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 & Liao, 1992). Sí bien Gomez *et al.*, (1998b) demostró 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.

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. 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 hospedero, pueden administrarse a intervalos mas 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 solo 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 (Tanasomwang *et al.*, 1998; Rengpipat *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 & 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 para larvas de *P. vannamei* en laboratorios de producción de Ecuador (Griffith, 1995; Garriques & Arévalo, 1995), considerando también el concepto de sustitución de especies bacterianas. En este caso la cepa empleada como probiótico correspondió a *V. alginolyticus*. 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. Las mortalidades debido a *Vibrio* sp. se produjeron en aquellos estanques de cultivo que no habían recibido el probiótico.

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.

1.1. LA RESUPUESTA 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 & Söderhäll, 1997).

1.2.1. METODOS 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 (Rodríguez & Le Moullac, 2000; Muñoz *et al.*, 2000). De igual forma se puede considerar los parámetros humorales, como la actividad antibacterial del plasma y la concentración de proteínas plasmáticas (Rodríguez & Le Moullac, 2000).

1.2.1.1. Hemogramas

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 & Cerenius, 1992; Rodríguez *et al.*, 1995), y granulosos (GR) que contienen enzimas que forman parte del sistema profenoloxidasa (proPO) (Smith & 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 & Le Moullac, 2000). Le Moullac *et al.* (1998) reportó que camarones *Penaeus stylirostris* con un bajo THC sometido a una situación de hipoxia, eran más sensibles a la infección con *V. alginolyticus* virulento. En este estudio el DHC fue también 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 mas 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.

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 & 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 & Hsieh, 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). 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 & 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 & 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; Vargas-Albores *et al.*, 1997; Perazzolo & Barraco, 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 antibacterial

Estudios en crustáceos (Chisholm & Smith, 1992; Noga *et al.*, 1996) han mostrado la habilidad de la hemolinfa de inhibir el crecimiento bacteriano. Sung *et al.*, (1996a) 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* (Dextoumieux, 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 bacterial en placas de agar (Adams, 1991; Sung *et al.*, 1996a; Rengpipat *et al.*, 2000). Otros en cambio han empleado el método turbidométrico en medio líquido observando fuerte actividad antibacterial de la hemolinfa de *P. vannamei* contra diferentes bacterias marinas (Rodríguez, datos no publicados).

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 & Le Moluac, 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 Famularu *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.*, 1996a; Sung *et al.*, 1998), o compuestos extraídos de la pared celular de bacterias y levaduras (Sung *et al.*, 1994; Song & 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

2.1.1. CEPAS BACTERIANAS

Ili: (*Vibrio alginolyticus*)

S2: (*Vibrio harveyi*)

P: Cepas bacterianas en estudio, aisladas de hepatopáncreas (HP) de camarones silvestres de la especie *P. vannamei*.

2.1.2. ANIMALES

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).

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

24 hrs. Luego de la incubación, se procedió a la identificación morfológica de las colonias en base al manual de Norrell & 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. harveyi* (S2) como agente patógeno.

Para éstas pruebas, solo se utilizaron aquellas cepas aisladas de animales histologicamente 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. harveyi*, 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 & Messley (1997).

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

Para la realización de las pruebas bioquímicas se utilizó la técnica miniaturizada propuesta por Solis (1996). Se partió de un cultivo en agar tripticasa de soja (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, ornitina 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 (T_{-2}), 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 (T_{-1}) 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 (T_0) 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 26,7 °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 muestra 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 & 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 & 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 0.9μM. 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.

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. Así se seleccionaron los siguientes iniciadores: OPA 3 (5'AGTCAGCCAC3'), OPA 8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA 9 (5' GGGTAACGCC 3'), OPA 10 (5' GTGATCGCAG 3').

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).

2.2.3. 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 por 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 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 0.5 μ 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 pools 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 pool, se sembraron en placas de petri conteniendo agar Lb 2% NaCl. La siembra se realizó

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 4^o 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, 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 34 ups, con recambio de agua diario del 50%. El agua fue filtrada a 5 μ . 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 de agua. 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 preparon 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 (THC) 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 Fenoloxidasa (PO)

Para la realización de esta prueba se empleó el protocolo simplificado por Henández-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 de el 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 ug/ul. 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:

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

Vt: valor transformado.

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

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

2.2.8.1. Cuantificación de la actividad Fenoxidasa (PO) *in vitro*

Con esta prueba 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 ESTADÍSTICOS

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 5.1.

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).

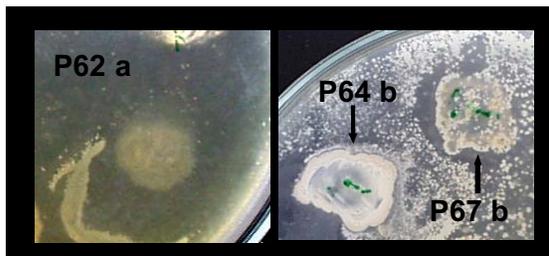


Figura 1. Halos de inhibición utilizando bacterias vivas (a) y bacterias muertas (b).

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición.

| Bacterias | Valores medios (mm) |
|-----------|---------------------|
| P62 | 21.10 |
| P63 | 16.20 |
| P64 | 15.30 |
| P65 | 16.10 |
| P66 | 14.50 |
| P67 | 18.20 |

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 el 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.

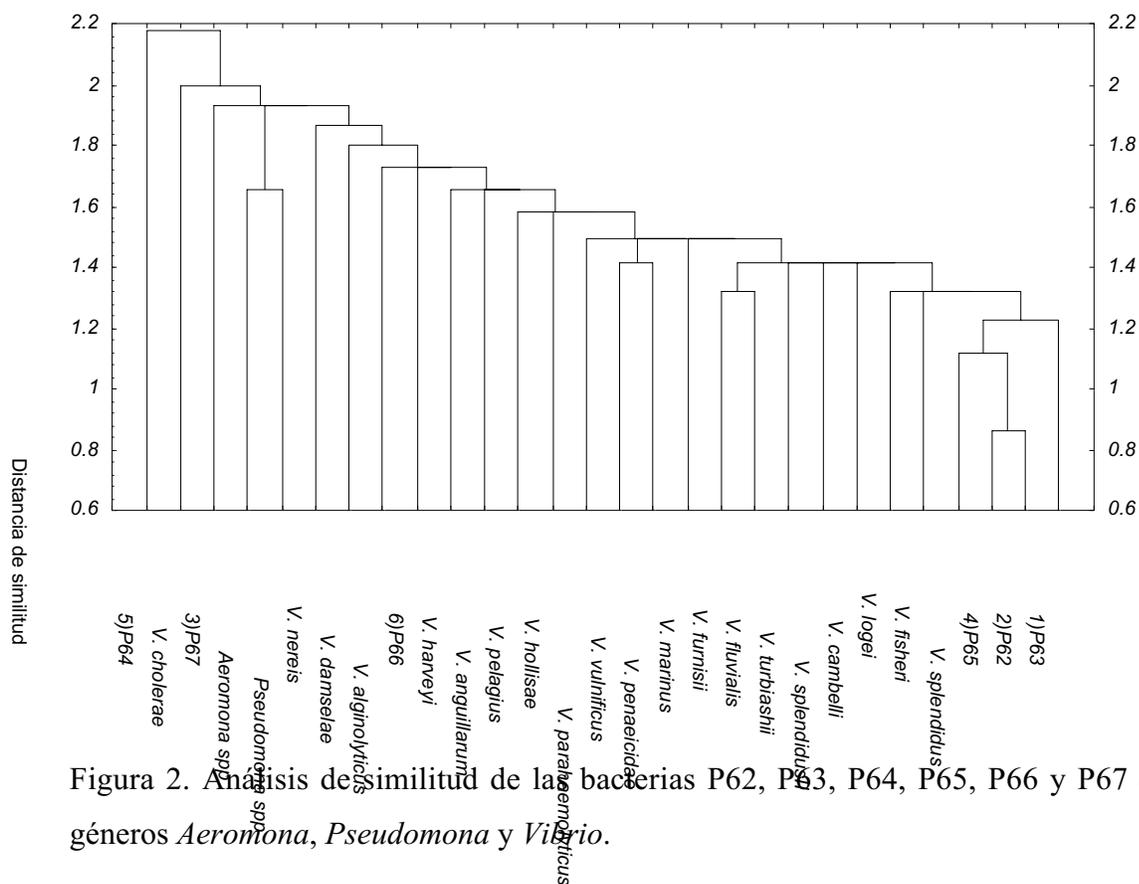


Figura 2. Análisis de similitud de las bacterias P62, P63, P64, P65, P66 y P67 con los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.

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.

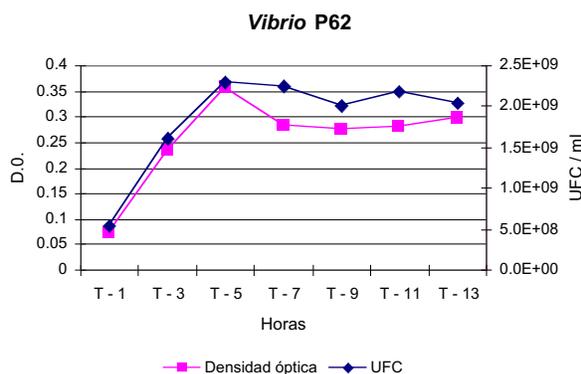


Figura 3. Curva de crecimiento de *Vibrio* P62

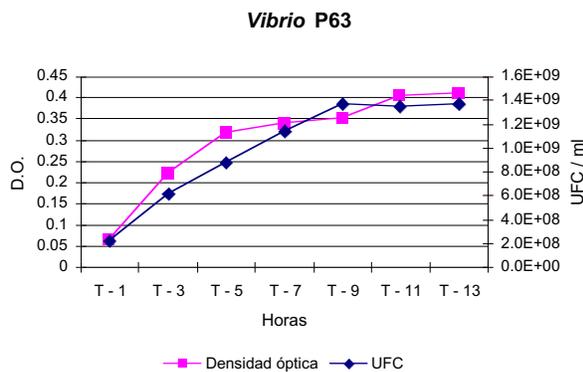


Figura 4. Curva de crecimiento de *Vibrio* P63

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).

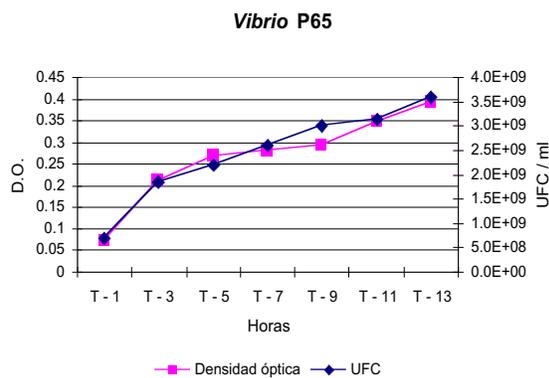
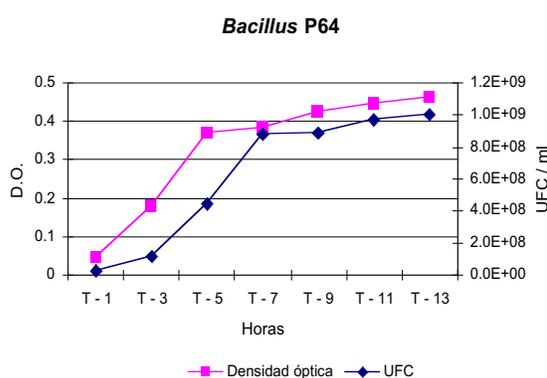


Figura 5. Curva de crecimiento de *Bacillus* P64

Figura 6. Curva de crecimiento de *Vibrio* P65

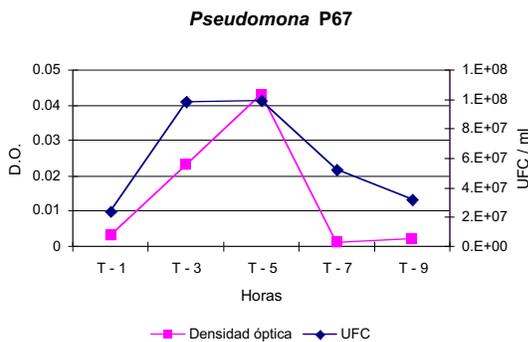
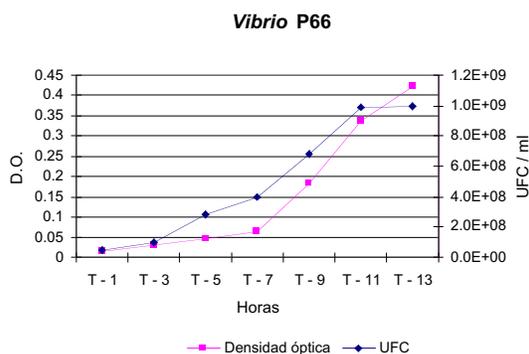


Fig 7. Curva de crecimiento de *Vibrio* P66

Fig 8. Curva de crecimiento de *Pseudomona* P67

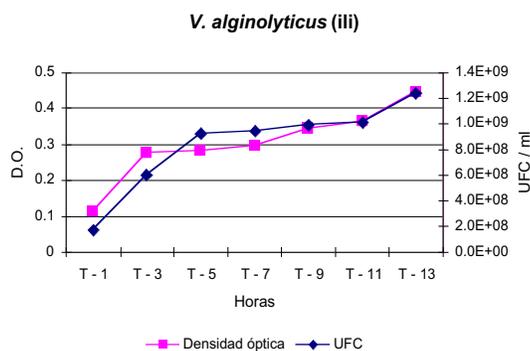


Figura 9. Curva de crecimiento de *V. alginolyticus* (Ili)

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 OPA8, OPA9 y OPA10 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 permitiéndolo una mejor diferenciación genómica.

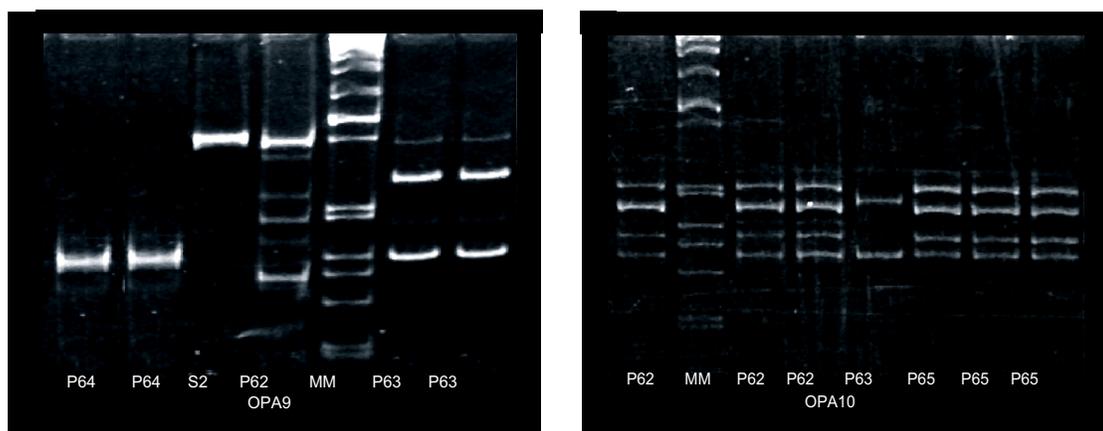


Figura 10. Perfiles de RAPDs en geles de poliacrilamida utilizando los iniciadores, OPA9 y OPA10.

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. Los porcentajes de colonización, y los valores medios de concentración bacteriana alcanzados por cada cepa, están representados en la Figura 11. 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, 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.

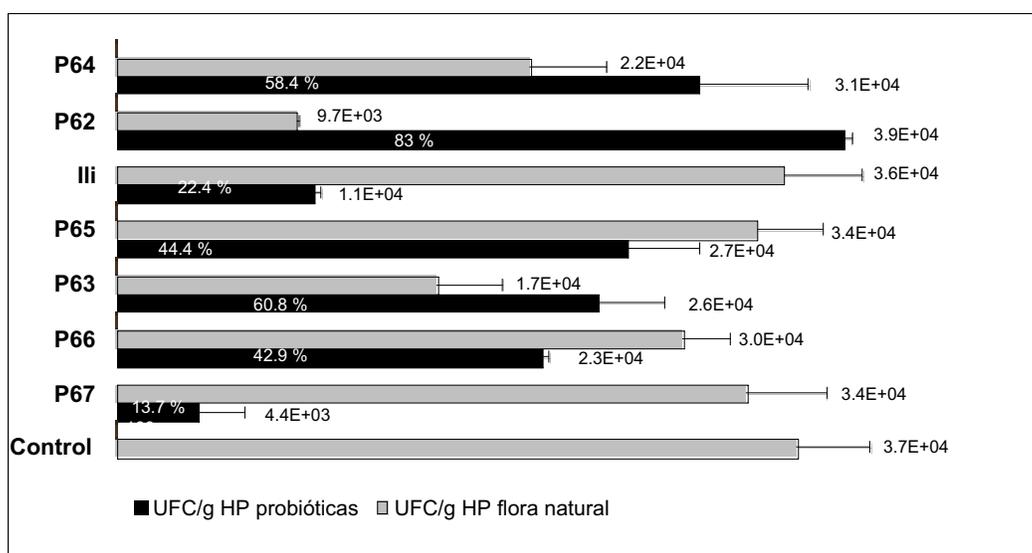


Figura 11. Porcentajes de colonización de bacterias P62, P63, P64, P65, P66, P67 e Ili.

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 PROBIOTICAS Y S2

En este bioensayo se probió las interacciones competitivas 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.

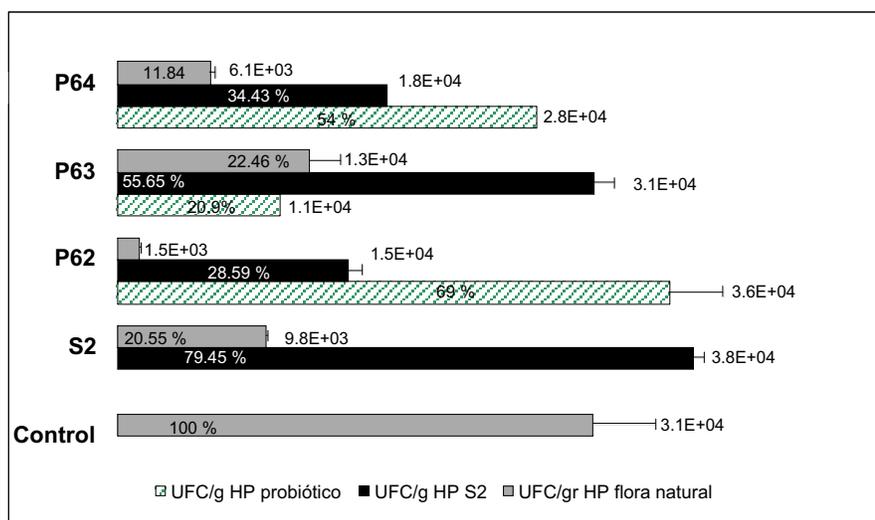


Figura 12. Interacción de las bacterias P62, P63, P64 con *V. harveyi* (S2)

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. La bacteria P63 inhibió en mayor porcentaje a la flora natural, sin embargo su efecto inhibitorio sobre S2 fue muy débil. El *Bacillus* P64 inhibió a la flora natural y compitió con el patógeno, aunque su efecto inhibitorio sobre S2 fue menor que P62.

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 la cepa Ili de *V. alginolyticus* y un control sin bacterias. Las bacterias P64 y P62 fueron seleccionadas por mostrar 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).

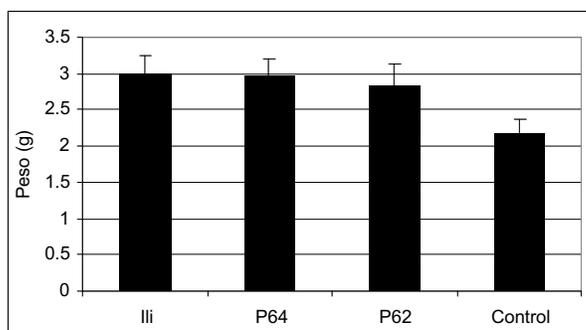


Figura 13. Peso promedio alcanzado de los camarones luego de 20 días de ensayo.

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.

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 cuál predominan las SG.

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 (Figura 15)

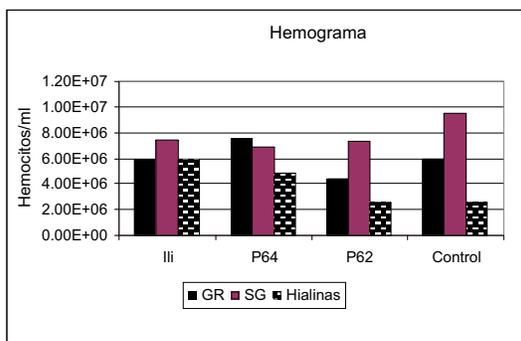


Figura 14. Cantidad de células plasmáticas en los tratamientos P62, P64, Ili y control.

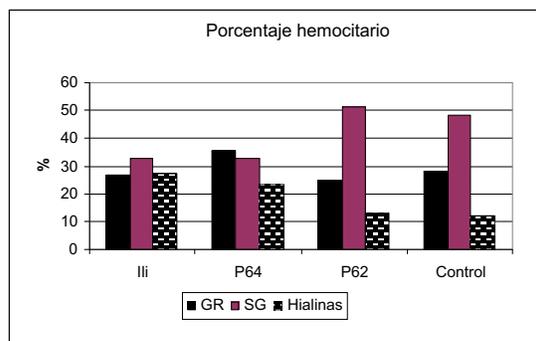


Figura 15. Proporción hemocitaria en los tratamientos P62, P64, Ili y control.

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).

3.8.3. Cuantificación de la actividad Fenoloxidasa

Los valores de fenoloxidasa fueron significativamente más 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.

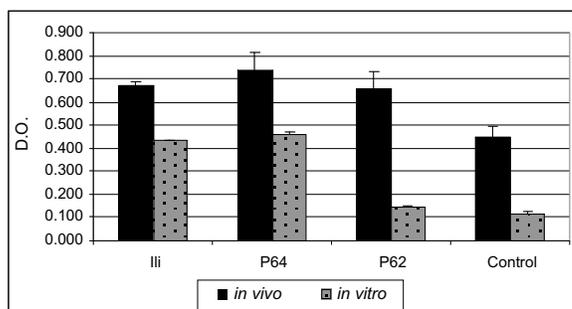


Figura 16. Comparación de los valores de densidad óptica para la cuantificación de la actividad fenoloxidasa de las bacterias Ili, P64, P62 *in vitro* e *in vivo*.

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 estadísticas con 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 \pm 0.08 | 1.20 \pm 0.09 | 1.15 \pm 0.11 | 1.105 \pm 0.05 |
| Inhibición bacteriana (%) | 8.5 \pm 5.6 | 20.6 \pm 8.7 | 25.4 \pm 13.7 | 30 \pm 9 |
| Proteínas (mg/ml) | 112.1 \pm 8.1 | 102.6 \pm 3.9 | 97.7 \pm 6.0 | 104.3 \pm 8.6 |

3.8.6. Indice 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.

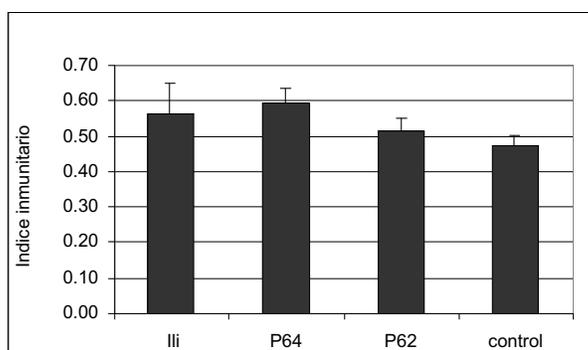


Figura 19. Índice Inmunitario global de los camarones inoculados con las cepas bacterianas P62, P64 e Ili.

4. DISCUSIÓN

El uso de probióticos en vertebrados ha sido ampliamente demostrado. A lo largo de los años se han estudiado las relaciones simbióticas de mezclas bacterianas, su mejor forma y frecuencia de administración. En acuicultura, esta práctica es reciente, por lo que muchas preguntas permanecen aún 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 (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 anatómo-fisiológicos. Sin embargo, Gomez *et al.*, (1998b) encontraron un amplio rango de especies de *Vibrios* en el hepatopáncreas de juveniles sanos de *P. vannamei*. Si bien el número de bacterias fue significativamente menor que en el intestino y en el estómago, la diversidad fenotípica fue 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. En nuestro estudio, el número de bacterias aisladas de animales sanos fue menor que en animales enfermos, de acuerdo con Gomez *et al.*, (1998b) podemos afirmar la existencia de bacterias en el hepatopáncreas de animales sanos, agregando que su origen silvestre los libera de la alteración anatómica a causa del 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 *Pseudomonas*, 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 Ghent, 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*, *V. campbellii* fueron aisladas por Wang *et al.*, (*fide*) del intestino de *P. chinensis* y utilizadas como probióticos en larvicultura de camarón. Gomez *et al.*, (1998b) 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) demostró que la cepa NICA 1031 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 inhibitorio *in vitro* fue estudiado por Rengpipat *et al.*, (1998), reportando que la cepa de *Bacillus* S11 tuvo un buen efecto inhibitorio contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Similares resultados han sido reportados por Sugita *et al.*, (1998) para *Bacillus* 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, permitiéndolo 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 superó 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 *Bacillus* 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 *Bacillus* P64 tuvo un 58.4% de colonización, pero desconocemos cuanto tiempo logrará permanecer en el HP, lo mismo para las otras bacterias inoculadas. Ésta 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.*, (1998b) 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 & Vadstein (1999), la colonización de los animales por bacterias, es un mecanismo complejo ya que la estabilización depende de varios factores, 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 *et al.*, (1996b). Ellos 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 fluorescencia en este órgano a las 12 hrs y manteniéndose relativamente presente incluso luego de 3 días post-inmersión.

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 las 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 (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. La especie *V. alginolyticus* se encontró 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 larvarios en el CENAIM, estableciéndose como una herramienta efectiva en la prevención de enfermedades relacionadas con *Vibrio 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.

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 *Bacillus* 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 *Bacillus* 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. harveyi* fueron reportados por Rengpipat *et al.*, (1998), utilizando la cepa *Bacillus* S11 en *P. monodon*. Luego de 10 días de exposición, observó 100% de supervivencia en los tanques con probiótico y 26 % en el control. La dosis del patógeno fue de 10^5 UFC/ml seguida de una segunda inmersión de 10^7 /ml luego de 7 días. En tanques con probióticos, las colonias de *Bacillus* 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. El autor mencionó que la cepa *Bacillus* S11 produciría sustancias microbicidas que afectan el crecimiento de *V. harveyi*.

Si bien sigue siendo difícil saber por cuanto tiempo la cepa *Bacillus* 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 *Vibriosis* son dependientes de la dosis, periodo de exposición, y edad del camarón. Las bacterias del género *Vibrio* son patógenos oportunistas (Sung *et al.*, 1994; Hameed, 1996; Lightner *et al.*, 1992; 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 & 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) reportó resultados similares en pls.30 de *P. monodon* con la utilización de *Bacillus* S11 como probiótico en el alimento. Después de alimentar durante 100 días con células frescas, células en solución salina normal y liofilizadas, no encontró diferencias significativas en crecimiento ($p > 0.05$) entre los tratamientos probióticos, pero sí entre probióticos y el control ($p < 0.05$). El mismo autor en el año 2000, luego de alimentar 90 días con *Bacillus*

S11 tanques de *P. monodon*, encontró que los tratados con probiótico tuvieron mayor supervivencia que los no tratados, sin embargo no hubieron diferencias significativas en el crecimiento atribuyéndolo éstos resultados a diferentes condiciones de cultivo que en el año 1998. Garriques & 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 & 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 sí 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 que 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 inmunoestimulación *in vivo* utilizando bacterina de *V. vulnificus*, fueron realizados por Sung *et al.*, (1996a) en camarones *P. monodon*. Después de 3 hrs. de contacto por inmersión con el antígeno, se evaluaron los parámetros inmunes a las 3, 6, 12 y 24 hrs. La estimulación del sistema PO, se presentó antes que la producción de ROIs y la actividad antibacteriana. La generación de radicales de oxígeno fue aumentando hasta alcanzar niveles significativos a las 6 hrs, pero disminuyendo hasta valores menores que el control hacia las 12 hrs. 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* S11 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, este autor reporta 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 1g, e inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* el crecimiento de *V. harveyi*. no provocando daños 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, 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.

7. REFERENCIAS

- 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. & FLEGEL, T. (Copy-writer). 1999. CD-ROM. Diagnosis of Shrimp Diseases: with emphasis on the black tiger shrimp *P. monodon*. FAO & Multimedia Asia Co, Ltd.
- ADAMS, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish and Shellfish immunology, 1: 59-70.
- AQUAFARM NEWS. 1996. Using bacteria to fight bacteria. Aqua Farm News Vol. XIV (4 &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 defence parameters in the haemolymph of crustacean with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate), prospects and application. Fish Shellfish Immunology, 5: 597-612.
- BACHÈRE, E., DESTOUMIEUX, D., BULET, P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectoris of innate immunity. Aquaculture, 191: 71-88.
- BELL, T.A. & LIGHTNER, D.V. 1988. A Handbook of Normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society. University of Arizona, USA, 114 p
- BERGEY. 1994. Bergey's Manual of Sistematic Bacterology. KRIEG, N. R. (ed) Williams & Wilkins London, Vol. 1-2, 1599 p
- BOYD, C.E. & MASSAUT, L. 1999. Risk associated with the use of chemicals in pond aquaculture. Aquaculture engineering, 20: 113-132.
- CHISHOLM, J.R.S. & SMITH, V. 1992. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. J. Marine Biology. Assoc. U.K., 72: 529-542.

- DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., VAN DORSSELAER, A., RODRIGUEZ, J., BACHERE, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272(45), 28398-28406.
- DESTOUMIEUX, D., MUÑOZ, M., BULET, P., BACHERE, 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., BACHERE, 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 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. Biochem. Physiol., 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.
- FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. AFRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.
- FAMULARO, G., MORETTI, S., MARCELLINI, S., DE SIMONE, C. 1997. Stimulation of immunity by probiotics. In: Fuller, R. (ed.) Probiotics 2. Applications and practical aspects. Chapman & Hall, Chapter 6, 137-161.
- GARRIQUES, D. & 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. In: BROWDY C.L. & HOPKINS, J.S. (eds.) Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 53-59.
- GATESOUBE, F.J. 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture, 180: 147-165.

- GOMEZ-GILL, B., ROQUE, A. 1998a. Selection of Probiotic Bacteria for Use in Aquaculture. In: FLEGEL, T.W. (ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum* Chiangmai, Thailand, Sección Probiotics and Immunostimulants, p 174.
- GOMEZ-GILL, B., TRON-MAYÉN, L., ROQUE, A., TURNBULL, J.F., INGLIS, V., GUERRA-FLORES, A.L. 1998b. 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., TURNBULL, 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., MELCHIORSEN, 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. Microbiol.*, 65: 969-973.
- GRIFFITH, D.R.W. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANTS, I. (eds.), *Larvi' 95 – Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 24, Gent, Belgium, 478 p
- HAMMED, A.S., SAHUL. 1995. Susceptibility of Three *Penaeus* Species to a *Vibrio campbellii* - like Bacterium. *Journal of the World Aquaculture Society*, 26 (3), 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.
- INCO, 2001. Antibacterial activity assay on shrimp plasma. In: *Shrimp immunology. Training Course*. European Union SI & DC INCO-DC Project. Hermosillo, Sonora; Mexico. CIAD, A.C., 15-17.
- 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. & 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. In: HARLOW, ED. & LANE, D., 1988 (eds). *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA, (15) 620-621.
- KLEIN, J. 1982. *Immunology The Science of Self-Nonself Discrimination*. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, 424-429.
- LE MOULLAC, G., SOYEZ, C., SAULNIER, D., ANSQUER, D., AVARRE, J. C., LEVY, P. 1998. Effect of hipoxie stress on the inmune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with moult cycle, protection against vibriosis. *Fish Sellfish Immunol.*, 8: 621-629.
- LIGHTNER, D.V. 1983. Disease of culture penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (ed.), *Handbook of mariculture. Curstacean Aquaculture*. Vol.1 CRC. Press. Boca Raton. Fl., 289- 320.
- LIGHTNER, D.V., BELL, T.A., REDMAN, R.M., MOHNEY, L.L. 1992. A Review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/ shrimps of the Americas and Indopacific. *Diseases in Asian Aquaculture I*. (eds.): Shariff M., Subasinghe R.P.& Arthur J.R., 57 - 80
- 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-reare *Penaeus chinensis* Larvae. 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. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MAEDA, M. & 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. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358.
- MORIARTY, D.J. 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: LÉSEL, R. (ed.), *Microbiology in Poecilotherms*. Elsevier, Amsterdam, 217-222.
- MOTTE, E., BETANCOUR, I., SOLIS, A., SIAVICHAY, K., ZHERDMANT, M., SANMIGUEL, L., MUÑOZ, M. CARRERA, L., MIALHE, E. *vide*. New technologies for bacteriological survey in shrimp aquaculture. Ecuador.
- MUÑOZ, M., CEDEÑO, R., RODRIGUEZ, J., VAN DER KNAAP, W.P.W., MIALHE, E., BACHERE, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191: 89-107.
- MURRAY & THOMPSON, 1980. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: AUSUBE, F., BRENT, R., KINGSTON, R.(eds.). *Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of Methodos from Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Wiley, 2-10.
- 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 Shellfish Immunology*, 6: 403-412.
- NOGAMI, K. & 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. & MESSLEY, K. 1997. *Microbiology. Laboratory Manual. Principles and Applications*. Prentice-Hall, Inc. A Simon and Schuster/Viacom Company. New Jersey, USA, 295 p.

- OMORI, S.A., MARTIN, G.G., HOSE, J.E. 1989. Morphology, hemocyte lysis and coltting 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.
- RENGPIPAT, S., PHIANPHAK, W., MENASVETA, P., PIYATIRATITIVORAKUL, S. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*, survival and growth. Aquaculture, 167: 301-313.
- RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASAVETA, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271-288.
- RODRÍGUEZ, J., BOULO, V., MIALHE, E., BACHERE, E. 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J. Cell Science., 108: 1043-1050.
- RODRÍGUEZ, J. & LE MOULLAC, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture, 191: 109-119.
- 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 International, 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. (3)18.72-18.75.
- 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, 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. & VADSTEIN, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture, 177: 333-343.

- SMITH, V. & 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.
- SODERHALL, D. & CERENIUS, L. 1992. Crustacean Immunity, Annu, Rev, Fish Diseases, 3-23.
- SODERHALL, 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. & HSIEHT, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Developmental and Comparative Immunology. Vol.18(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, Ingeniería Marítima y Ciencias de 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., 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. 1996a. Enhancement of microbicidal activity in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. J. Crustacean Biology, 16: 278-284.
- SUNG H. H. & SONG Y.L. 1996b. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp. (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 145: 41-51.
- 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. Ecol., 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: 101-110.
- 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. Resistencia a las bacterias y microorganismos similares. In: Inmunología Veterinaria. Cap. 13, 227-242.
- THÖRNQVIST, P.O. & SÖDERHÄLL, K. 1997. Crustacean Immune reactions, a short review. In: FLEGEL, T.W., MACRAE, I.H. (eds.), Diseases in Asian Aquaculture III. Fish health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 203-218.
- VANDENBERGHE, J., VERDONCK, L., ROBLES-ARZARENA, 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 Probiotics. 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. (eds.), Issue Special Abstracts for the 7th Congress of the ISDCI, 21-25 July 1997, Williamsburg, USA. Dev. Comp. Immunol., 21: 212.
- VARGAS-ALBORES, F., HERNÁNDEZ, L.J., GOLLAS, G.T., MONTAÑO, P. K., JIMENEZ, V.F., YEPIZ, P.G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In: FLEGEL, T.W. (ed.) Advances in shrimp biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum Chiangmai, Thailand, 161-166.

- 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.
- 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, 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. & GIBSON, G.R. 1998. An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies. International Dairy Journal, 8: 473-479.

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 pre cría bajo el mismo esquema de diagnóstico. En sistemas de pre cría hay mas bacterias en el agua y en el suelo, por lo que la población colonizadora será más diversa y abundante que en sistemas experimentales. 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 microscopía 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.

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.

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.

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 concluidos 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 junto con la habilidad de producción de metabolitos responsables del efecto probiótico.

ANEXO

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

1. Transferir una colonia bacteriana en 300 μ l 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

Tabla 4: Cantidades de reactivos utilizados en la pre-mezcla.

| <u>Solución</u> | <u>Cantidad</u> |
|-----------------|-----------------|
| H2O | 10.4 μ l. |
| Buffer 10X | 2.6 μ l. |
| MgCl2 25 mM | 2.1 μ l. |
| dNTPs 10 mM | 0.5 μ l. |
| Primer | 4.2 μ l. |
| Taq | 0.2 μ l. |
| Template | 5 μ l/tubo |

Tabla 5: Condiciones de amplificación para RAPDs bacterianos.

| <u>Fase</u> | <u>Temperatura (°C)</u> | <u>Tiempo (seg)</u> |
|--------------------------|-------------------------|---------------------|
| 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.