

Autores: M. Sc. M. Lourdes Cobo &
M. Sc. Ricardo Cedeño



"Uso de la bacteria *V. alginolyticus*, cepa ILI, como probiótico en la larvicultura del camarón *L.vannamei*"

Las enfermedades bacterianas son consideradas la principal causa de mortalidad en la larvicultura de camarones (Gomez-Gil et al., 2000). Estrategias convencionales, como el uso de desinfectantes y químicos antimicrobianos para la prevención y cura de enfermedades han tenido un éxito limitado.

Más aún, existe la preocupación acerca del uso y particularmente del abuso de antibióticos utilizados en medicina humana, agricultura y también en acuicultura. Este abuso, puede llevar al desarrollo de resistencia bacteriana contra los antibióticos, como resultado las bacterias resistentes pueden proliferar después de la mortalidad causada por acción de los antibióticos y pueden transferir sus genes de resistencia a otras bacterias que nunca fueron expuestas a estos. En consecuencia, la resistencia al antibiótico puede ser transferida a un patógeno para el organismo tratado, o para otros organismos incluyendo los humanos (Subasinghe, 1997).

Algunas alternativas al uso de antibióticos han sido propuestas y están siendo utilizadas exitosamente en acuicultura. El uso de bacterias digestivas beneficiosas en humanos y en nutrición animal está bien documentado. Las bacterias probióticas, en base a los precedentes mencionados, puede ser una alternativa de control biológico en acuicultura. La posibilidad de modificar la flora bacteriana y la ecología de los sistemas de larvicultura, a través de la inoculación de bacterias beneficiosas, es muy viable para que la fuente de postlarvas de laboratorio pueda continuar con estabilidad en el futuro.

En este campo, lo más novedoso que se plantea es la producción y utilización de

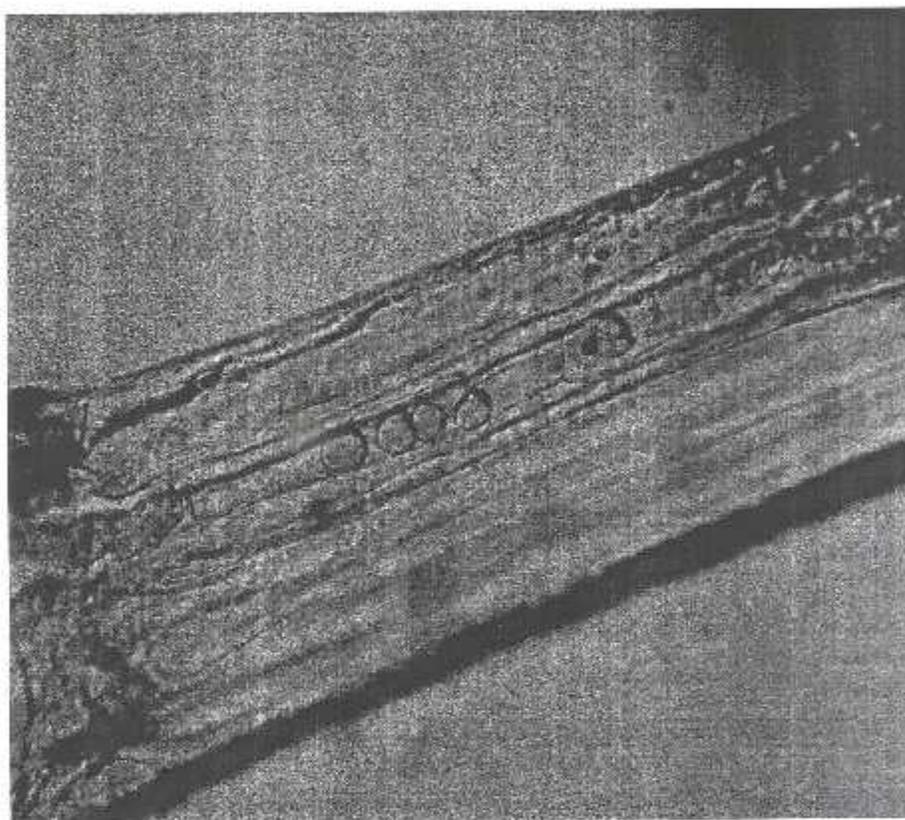


Foto 1. Migración de las "bolitas" en el tracto digestivo de una larva de *Penaeus vannamei*

probióticos para manipular la flora bacteriana en los laboratorios comerciales. Verschuere et al (1995), plantean que existen varios mecanismos de acción de los probióticos en los sistemas de Acuicultura, y entre estos: exclusión competitiva de bacterias patógenas; mejoramiento de la nutrición por el suministro de nutrientes esenciales; incremento de la nutrición por el suministro de enzimas esenciales; obtención directa de materia orgánica transformada por bacterias; acción inmunoestimuladora; y producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas. Esta práctica incluye el cultivo de cepas seleccionadas de bacterias beneficiosas que son

inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura.

En Ecuador los primeros registros del uso de "probióticos" a nivel de laboratorios de cultivos larvarios datan de 1992. Morales (1992), aisló una cepa bacteriana, la cual fue denominada ILI, la misma que fue utilizada en tanques de cultivo de larvas para controlar el denominado síndrome de "bolitas". Este síndrome se caracteriza por presentar animales con tracto digestivo vacío, inflamación de las paredes del hepatopáncreas, atrofia de los lóbulos del hepatopáncreas y con la presencia de "bolitas" en el tracto digestivo producto de la descamación del epitelio (Fotos 1 y 2).

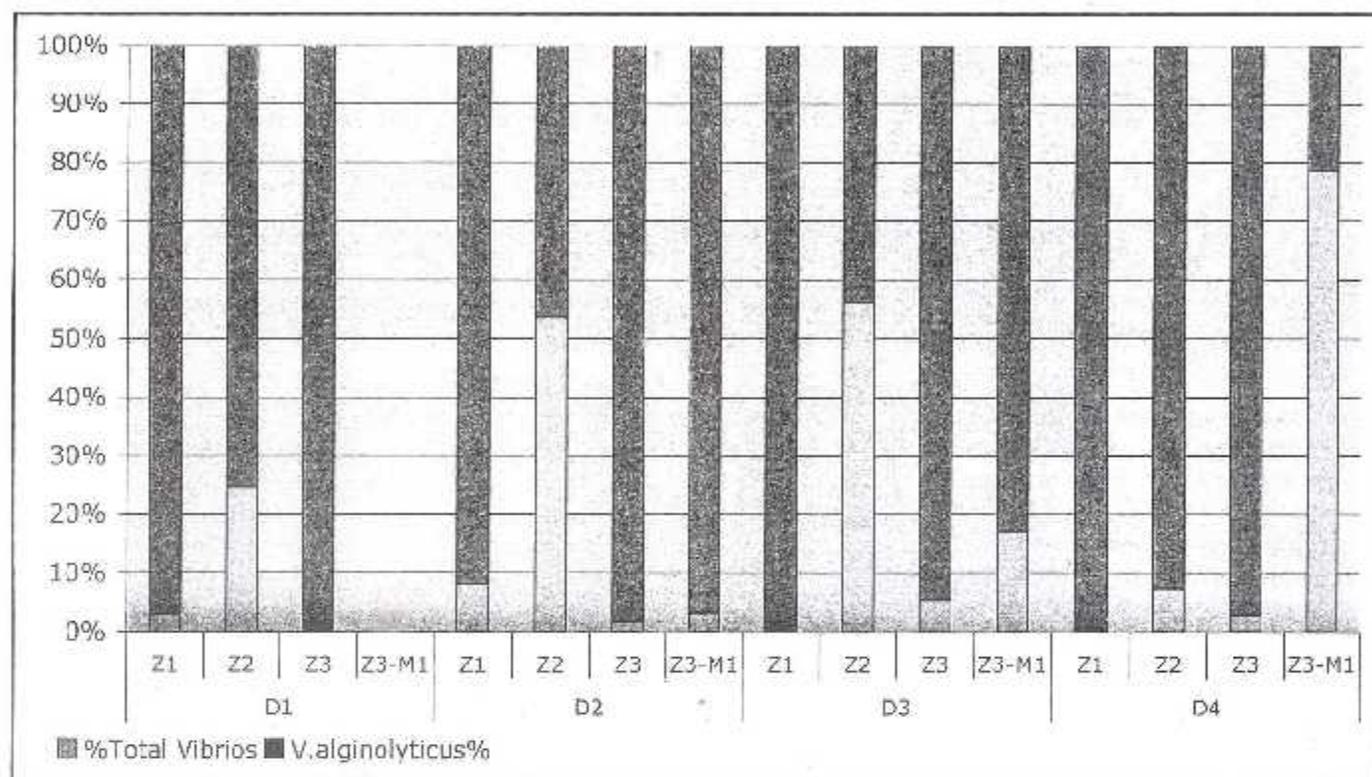


Figura 1. Porcentaje de *Vibrio alginolyticus* (cepa ILI) en los diferentes sub-estadios de zoea a diferentes densidades de siembra (D1=750 nauplios/L, D2=1000 nauplios/L, D=1500 nauplios/L, D4=2000 nauplios/L), sobre el total de vibrios recuperados de larvas de camarón.

La cepa codificada (ILI) fue identificada bioquímicamente por el CENAIM como *Vibrio alginolyticus*. Garriques y Wyban 1993, realizaron experimentos en laboratorios comerciales para incrementar los niveles de "buenos vibrios" denominados fermentadores de sucrosa. Para este propósito, los autores adicionaron azúcar de mesa a los tanques de cultivo de larvas para estimular el crecimiento de especies de *Vibrio* fermentadoras de sucrosa, observando que la supervivencia promedio y el peso húmedo de las larvas en los tanques donde se adicionaron inóculos bacterianos fue mayor comparados con las larvas que recibieron dosis profilácticas de oxitetraciclina y que las del grupo control. Griffith (1995), reportó que la producción de larvas fue incrementada en un 35% y la disminución del uso de antibióticos fue del 94% después de la consiguiente introducción de probióticos en los sistemas de cultivo de larvas.

Zherdmant (1996), realizó las primeras pruebas de interacción *in vitro* entre la cepa ILI y la cepa patógena E22

(identificada bioquímicamente como *Vibrio harveyi*). Esta cepa (E22), fue aislada a partir de animales enfermos con el síndrome de bolitas, y experimentalmente fue capaz de inducir la sintomatología de la enfermedad. A partir de sus experiencias, destacó que la cepa era capaz de competir contra el patógeno por tener una gran capacidad de crecimiento, pero no pudo concluir sobre el mecanismo de inhibición contra la cepa E22.

Paralelamente- San Miguel (1996), llevó a cabo una serie de ensayos *in vivo* con aplicación de diferentes densidades y tiempos de exposición frente a inóculos bacterianos de ILI y E22 para estudiar las interacciones. San Miguel, menciona que las larvas expuestas a ILI antes de ser desafiadas con E22 mostraron un efecto protector por parte de ILI, concluyendo que la pre-exposición de los animales con la cepa ILI antes de la exposición al patógeno E22 tiene una función probiótica. Un trabajo similar fue realizado por Serrano (1996), sometiendo estadios larvarios de camarón al patógeno E22 con inclusión

de ILI, y concluye la existencia de una competencia entre las dos cepas bacterianas ILI y E22 por ocupar el tracto digestivo de los animales infectados, lo cual fue corroborado empleando un anticuerpo monoclonal específico (2B6) para la detección de la cepa ILI.

Desde 1999, el CENAIM comienza a producir larvas en el Laboratorio de Larvas ESPOL, con un protocolo en el cual se incluye el uso de la cepa ILI (Reporte Técnico, 1999). La cepa es utilizada en el régimen de manejo a razón de 105 UFC/ml concentración final en el tanque de cultivo. La capacidad competitiva de la cepa ILI frente a otros vibrios, durante los diferentes estadios larvarios, es presentado en la Figura 1. La primera inoculación es realizada en el estadio NV, entre 7 y 10 horas después de la siembra. Desde el estadio Z1 hasta la cosecha, se recomienda aplicarlo diariamente en el mismo horario. Desde su inclusión en el protocolo de larvicultura, no hemos registrado problemas del Síndrome de Zoea y el Síndrome de Bolitas durante los sub-estadios de zoea en el cultivo larvario.

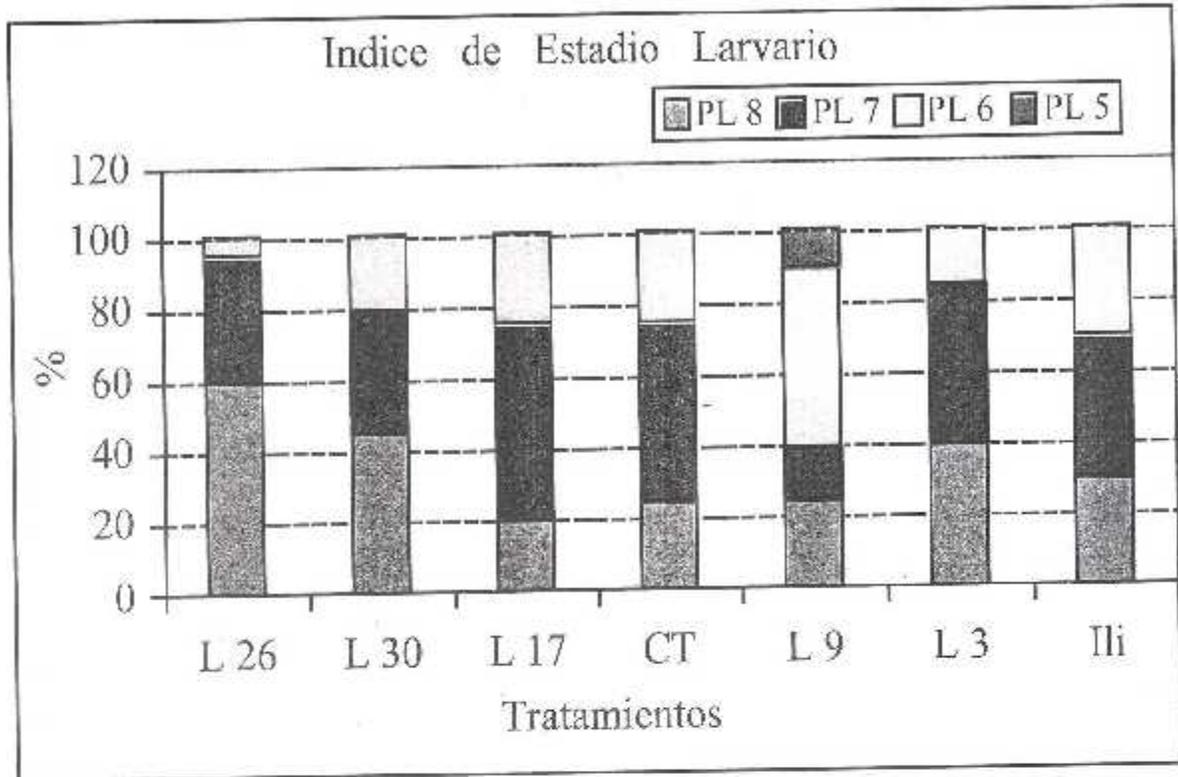


Figura 2. Índice de Estadio Larvario de larvas tratadas con bacterias potencialmente probióticas (BPP) durante el ciclo de cultivo.

El uso del *Vibrio alginolyticus* como cepa probiótica puede parecer controversial, debido a que este género ha sido asociado en muchas patologías del cultivo de camarones, pero trabajos como el de Vandenberghe et al. (1999), mencionan que esta especie ha sido encontrada asociada tanto a animales sanos como enfermos, lo que indicaría la existencia de cepas patógenas y no patógenas (Gullian et al., 2004).

Investigaciones para evaluar nuevas cepas con potencial probiótico, para ser utilizadas en la larvicultura de *L. vannamei* están siendo desarrolladas en el CENAIM. Un total de 31 bacterias potencialmente probióticas (BPP) aisladas de cultivos larvarios exitosos llevados en CENAIM y/o en laboratorios comerciales fueron evaluadas y seleccionadas mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, comparándolas con la cepa Ili como control positivo. Las cepas bacterianas fueron tentativamente identificadas utilizando un set de pruebas bioquímicas-fenotípicas.

A pesar de que no se observó la formación de halos de inhibición con ninguna de las BPP evaluadas, 6 cepas presentaron crecimiento sobre los

patógenos de las cepas *Vibrio* spp. En la prueba *in vivo*, las larvas tratadas con las BPP tuvieron supervivencias en el rango entre 54% y 60%, sin presentar diferencias significativas entre ellas. El mayor índice de estadio larvario lo obtuvieron las larvas tratadas con la cepa codificada como L26, las que presentaron el 60% de larvas en estadio Post-larva 8 por desarrollo branquial mientras por desarrollo en días, estaban en estadio Post-larva 5 (Figura 2). Una supervivencia del 85.6%, aunque no significativamente diferente de las otras, fue obtenida por larvas tratadas con la cepa L9, al ser sometidas a la prueba de desafío con el patógeno 246. La supervivencia de las larvas sometidas a las diferentes bacterias evaluadas no fue inferior al 75%, sugiriendo la actividad probiótica de éstas.

Es importante determinar el mecanismo de acción de las cepas probióticas utilizadas en los sistemas de cultivo, por lo cual estamos desarrollando pruebas para determinar el (los) mecanismo(s) de la cepa Ili en las larvas de camarón. Sin embargo, el trabajo realizado por Rodríguez et al., en el año 2004, sugiere un efecto inmunestimulante en los camarones tratados. En este trabajo, se

evaluó el efecto de la inclusión de la cepa probiótica *Vibrio alginolyticus* (Ili) y B-1,3-glucanos en la larvicultura de *Penaeus vannamei*, sobre la supervivencia y respuesta inmune de los camarones sometidos a un desafío con WSSV (White Spot Syndrome Virus, siglas en inglés).

El uso del probiótico Ili, mejoró la supervivencia durante las primeras 0-52 horas posteriores al desafío, sin embargo, al término del mismo no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos. La combinación del probiótico y B-1,3 glucanos mejoró la resistencia de los camarones al virus post-infección experimental, registrándose además un incremento de varios parámetros inmunarios.

Las Post-larvas con tratamiento probiótico y B-1,3-glucanos fueron sembradas posteriormente en una camaronera comercial en densidad de 18 animales m² en estanques de 0.20 Ha. Las supervivencias finales variaron entre 49% a 70%, sin registrarse eventos de mortalidad asociados a WSSV. Estos resultados sugieren el uso benéfico de cepas probióticas durante la larvicultura para la inducción del desarrollo temprano del sistema inmune en el camarón.