

Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas

María Auxiliadora Sotomayor, José Luis Balcázar

Dpto. de Microbiología, Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M"
Centro de Información y Documentación, Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Campus Politécnico, P.O. Box 09-01-4519, Guayaquil (Ecuador)
e-mail: msotoma@cenaim.espol.edu.ec

Resumen

Las mezclas de cepas probióticas fueron sometidas a una prueba de inhibición *in vitro* con vibrios patógenos (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 y *V. parahaemolyticus* PA2) para demostrar su efecto antagónico. Las mezclas P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%. Estas mezclas de cepas probióticas tienen potencial aplicación para el control de vibrios patógenos en los sistemas acuícolas.

Summary

Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by mixture of probiotic strains

A series of probiotic strain were challenged using an *in vitro* inhibition test with three pathogenic vibrios (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 and *V. parahaemolyticus* PA2) in order to confirm its antagonistic effect. The mixtures P63-Ili, P62-P64 and P62-P63-Ili presented a percentage of inhibition greater than 50%. This probiotic mixtures strain have potential applications to control shrimp pathogenic vibrios in aquaculture systems.

Introducción

En los últimos años, muchas investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Peeters y Rodríguez (1999) señalan que los problemas de enfermedades muchas veces son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de ataques bacterianos.

La tendencia actual es de restringir o reducir el uso de antibióticos debido a la aparición de resistencia bacteriana, problemas ecológicos, restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de camarones y su incidencia en la salud humana. Las estrategias de control han sido encaminadas hacia el uso de técnicas mejoradas en larvicultura (Alday, 1999), programas de selección genética (Pérez y Gómez, 2001), uso de tolerinas (Melena y cols., 2000), aplicación de lipopolisacáridos (Newman, 2000), β -glucanos y peptidoglucanos (Otero y cols., 2000; Newman, 2000) para incrementar el rendimiento y resistencia a enfermedades de origen viral o bacteriano.

Una estrategia de control bacteriológico, muy interesante y con resultados prometedores, se enfoca al empleo de probióticos, como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de exclusión competitiva. Es una

herramienta viable, ya que las bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como directamente del tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos (Moriarty, 1999; Berger, 2000; Newman, 2000; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001; Gullian 2001).

Varios estudios han demostrado que el uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, ya que la posibilidad de establecer poblaciones probióticas a pesar de las variaciones ambientales es mayor. Además, se han observado procesos sinérgicos entre cepas, que han incrementado los resultados deseados (Douillet, 2000).

El mecanismo de exclusión competitiva es una propiedad que ha sido aprovechada por varios investigadores, para realizar pruebas de desafío con patógenos, con el fin de demostrar la capacidad probiótica de las bacterias en estudio.

Materiales y métodos

Material biológico

- **Cepas probióticas**

Se utilizaron cuatro cepas probióticas proporcionadas por CENAIM para realizar las evaluaciones experimentales:

- La cepa Ili (*Vibrio alginolyticus*) aislada por (Morales *vide* San Miguel, 1992), caracterizada por San Miguel (1996) y estudiada su efecto probiótico en larvas de camarón por Serrano (1996).
- Las cepas P62 y P63 (*Vibrio* sp.) y P64 (*Bacillus* sp.) aisladas del hepatopáncreas de animales silvestres sanos de *Litopenaeus vannamei* y estudiados sus efectos probióticos individualmente en camarones juveniles por Gullian (2001).

- **Cepas patógenas**

Se utilizaron tres cepas patógenas para realizar las evaluaciones experimentales:

- La cepa bacteriana E22 fue aislada por Arauz en 1994 de larvas de camarón que presentaron el síndrome de "bolitas" y fue identificada bioquímicamente como *Vibrio harveyi* (Serrano, 1996).
- La cepa S2 (*V. vulnificus*), aislada de larvas que presentaron el Síndrome de "Bolitas". Sotomayor (2001) demostró la naturaleza patógena de la cepa en camarones juveniles.
- La cepa PA2 (*V. parahaemolyticus*), aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

Evaluación *in vitro* del efecto inhibitor de las mezclas de cepas probióticas sobre el crecimiento de vibrios patógenos

- ***Mezclas probióticas***

Para la preparación de las mezclas, la técnica consistió en sembrar las cepas individualmente considerando su fase exponencial en LB (Lennox L. Broth Base) 2% NaCl para obtener una concentración base de 10^5 UFC/ml de cada cepa. Para medir la concentración bacteriana requerida, se utilizó un espectrofotómetro JENWAY 6400® a una longitud de onda de 550 nm. La cantidad de UFC/ml se registró multiplicando el valor obtenido por espectrofotometría con el número de colonias de cada cepa, establecido por Gullian (2001).

Una vez obtenida la concentración deseada para cada cepa, se procedió a realizar las mezclas para observar interacción entre ellas, agregando 1 ml de cada cepa en tubos de 10 ml con Caldo LB 2% NaCl, manteniéndolas por 5 horas y media, a 28°C en constante movimiento.

Para realizar la siembra y el posterior conteo de las UFC se utilizó Agar Mueller Hinton (AMH) (DIFCO®) al 2% NaCl, ya que este agar permitió establecer diferencias morfológicas entre las cepas. En cada mezcla se realizaron diluciones con solución salina al 2% NaCl. Se sembró 100 µl de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} . Luego, las cajas fueron incubadas durante 8 horas a 30°C, antes de iniciar el conteo de las colonias. Se escogieron las mezclas en que las cepas utilizadas no produjeron inhibición entre ellas o aquellas en que la inhibición fue hasta el 25% como máximo.

La concentración final de las mezclas de cepas probióticas utilizadas fue de 1×10^5 UFC/ml.

- ***Mezclas patógenas***

Para la preparación de las cepas patógenas (E22, S2 y PA2), se partió de una siembra en agar TSA (Tryptic Soy Agar), incubada por 8 horas a 30°C. Una colonia de cada cepa patógena fue replicada en 10 ml de Caldo LB al 2% CNa, incubándose por 6 horas a 28°C, en baño maría y agitación continua. La concentración de E22, S2 y PA2 utilizada fue de 1×10^6 UFC/ml.

- ***Inhibición***

Con el fin de determinar el efecto antagónico de las mezclas, se empleó una adaptación de la técnica descrita por Gómez (1998). La técnica consistió en sembrar 1 ml de cada mezcla con 1 ml del patógeno correspondiente en tubos con 10 ml de Caldo LB 2% NaCl, manteniéndolas por 5 horas y media a 28 °C en constante movimiento.

Para realizar el conteo de las UFC se utilizó AMH al 2% NaCl. Se sembró 100 µl de cada mezcla utilizando diluciones 10^{-3} a 10^{-5} UFC/ml en las cajas, que posteriormente fueron mantenidas en una incubadora a 30°C. La lectura se realizó después de 8 horas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% bajo principios de normalidad y homogeneidad de varianza. Para contrastes entre tratamientos se utilizó la prueba de Fisher (Least Significant Difference, LSD).

Resultados

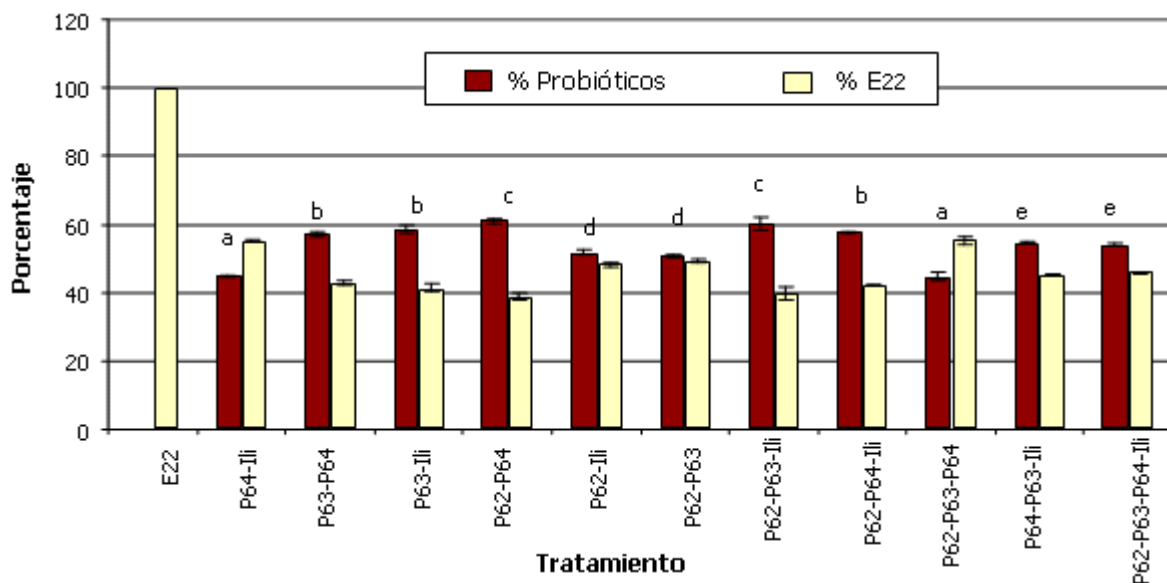
La adaptación de la técnica descrita por Gómez (1998) permitió conocer el porcentaje de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de cepas patógenas E22, S2 y PA2.

Esta evaluación *in vitro* permitió determinar el efecto antagonico de las mezclas sobre el crecimiento de E22 (figura 1). Las mezclas P62-P64 y P62-P63-Ili presentaron porcentajes de inhibición significativamente mayores ($p < 0.05$) entre las mezclas que lograron inhibir a la cepa patógena.

Todas las mezclas bacterianas lograron inhibir a la cepa S2 en porcentajes mayores al 50% (figura 2). Las mezclas P63-P64, P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili, P62-P64-Ili y P64-P63-Ili presentaron superiores porcentajes de inhibición, sin embargo la mezcla P62-P63-Ili registró diferencias significativamente mayores ($p < 0.05$) entre las mezclas.

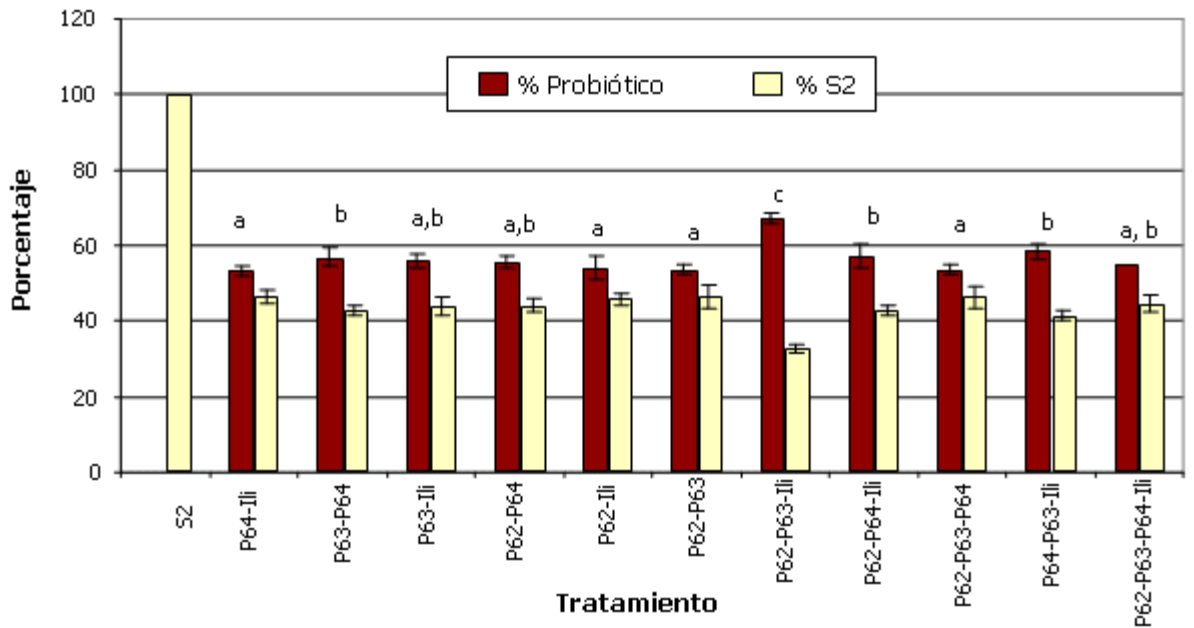
En la evaluación con PA2, para observar la capacidad de inhibición de las mezclas, los resultados demostraron un efecto de inhibición mayor al 50% en las mezclas P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili, P62-P64-Ili y P64-P63-Ili (figura 3). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las mezclas que lograron inhibiciones mayores al 50%.

Figura 1. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de E22



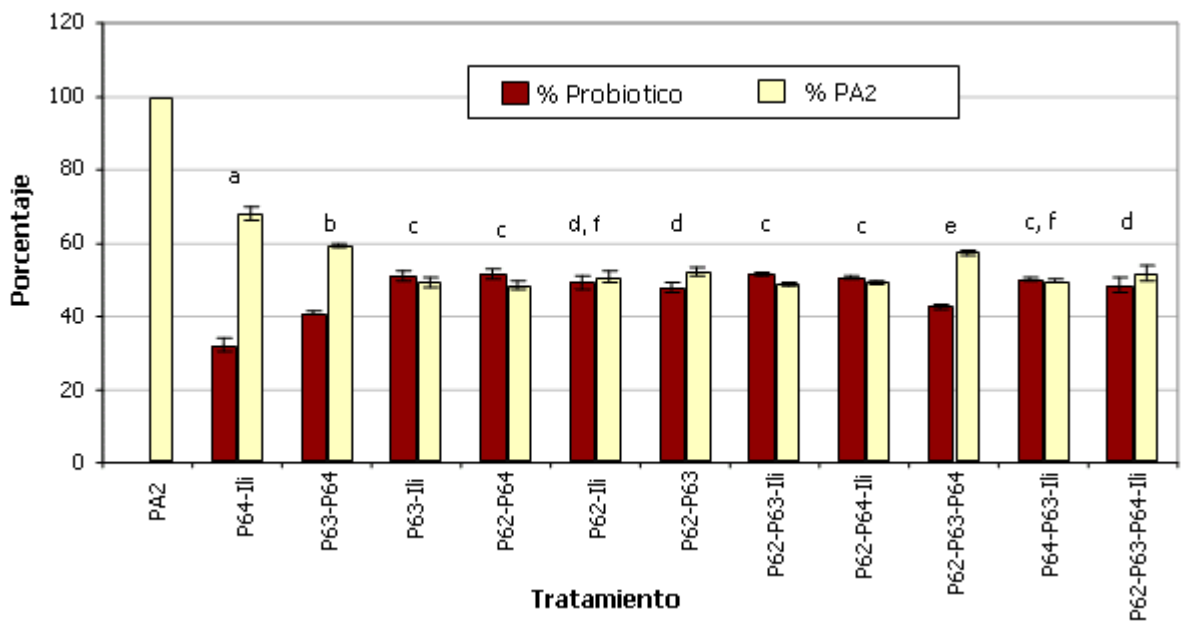
*Barras con iguales letras no tienen diferencia significativa.

Figura 2. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de S2



*Barras con iguales letras no tienen diferencia significativa.

Figura 3. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de PA2



*Barras con iguales letras no tienen diferencia significativa.

Discusión y Conclusiones

El uso de *V. alginolyticus* como probiótico ha sido reportado en literatura (Austin y cols., 1995; San Miguel, 1996; Serrano, 1996; Zherdmant, 1996; Gullian, 2001). Garriques y Arévalo (1995) reportaron que una cepa de *V. alginolyticus* redujo la presencia de bacterias patógenas en el cultivo de larvas comerciales de *Litopenaeus vannamei*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones *in vitro* con E22, S2 y PA2, las mezclas P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili, presentaron mayor capacidad de inhibición sobre el crecimiento de *Vibrio* sp. patógenos.

Las bacterias por naturaleza presentan mecanismos antagónicos que les permite subsistir en determinados ecosistemas. Así, varios investigadores en pruebas *in vitro* han utilizado la propiedad antagónica para la selección de cepas candidatas. Dopazo y cols. (1988) utilizando medios líquidos, observó que una bacteria marina cepa FP6 inhibió el crecimiento de cepas patógenas *A. hydrophila* B-32, *A. salmonicida* ATCC 14174 y *V. anguillarum* R-82 por la producción de una sustancia antibiótica.

Chythanya y cols. (2002) encontraron una bacteria marina *Pseudomonas* I-2, que produce una sustancia de bajo peso molecular, estable al calor, soluble al cloroformo y resistente a enzimas proteolíticas que inhibe el crecimiento de vibrios (*V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*) patógenos en camarones.

En conclusión, las mezclas de cepas probióticas tienen propiedades como agentes de biocontrol para el uso en laboratorios y granjas de cultivo, reduciendo la presencia de vibrios patógenos en los sistemas acuícolas.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado bajo el soporte y financiamiento del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M."

Bibliografía

1. Alday, V. (1999) Diagnóstico y prevención de la enfermedad del Punto Blanco. El Mundo Acuícola. 5:3-7
2. Austin, B., L. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi, y D. Griffith (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
3. Balcázar, J. (2002) Evaluación de mezclas de cepas probióticas en juveniles *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Ingeniero Acuicultor. Universidad de Machala. 92 pp.
4. Benetti, D. (2001) Proactive health management, using probiotics in marine fish hatcheries. The Advocate, 4:30
5. Berger, C. (2000). Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno-estimulación de camarones peneidos. En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M. y Civera, R., (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán
6. Chamberlain, G. (2001) Feed additives. The Advocate. 4:61-65
7. Chythanya, R., Karunasagar, En: Karunasagar, Id. (2002) Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture. 208:1-10
8. Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja, y A. Toranzo (1988). Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. Journal of Applied Bacteriology. 65:97-101
9. Douillet, P. (2000). Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. Aquaculture 182:241-248
10. Garriques, D. y G. Arévalo (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. y Hopkins, J. (Eds.), Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. 53-59
11. Gatesoupe, F. (1999) The use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture. 180: 147-165

12. Gómez, B. (1998). Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval culture. PhD Thesis University of Stirling, 179
13. Gullian, M. (2001). Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador
14. Melena, J., T. Flegel, y J. Calderón (2000). Ensayos para determinar los factores que influyen en la mortalidad por WSSV. El Mundo Acuícola. 6:39-46
15. Morales, I. (1992). Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. En: Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Guayaquil, Ecuador. 203-207
16. Moriarty, D. (1999). Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. En: Proceedings of the 8 International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C., Brylinsky, M. and Johnson, G., (Eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada
17. Newman, S. (2000). Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. Panorama Acuícola. 5:22-23
18. Otero, V., C. Molina, R. Cedeño, M. Sotomayor y J. Rodríguez (2000). Evaluación del efecto inmunoestimulante de los β -glucanos. El Mundo Acuícola. 6:46-51
19. Peeters, M. y J. Rodríguez (1999). Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. El Mundo Acuícola 5:13-18
20. Pérez, F. y L. Gómez (2000). Programa de genética Promogen-CENAIM. El Mundo Acuícola. 7:62
21. San Miguel, L. (1996). Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador
22. Serrano, J. (1996). Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (cepa E22) mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili). Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador
23. Sotomayor, M. (2001). Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador
24. Zherdmant, M. (1996). Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la interacción *in vitro* con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador

