

Probiótico para alimento de camarón cultivado en granjas para inhibir el desarrollo de bacterias patógenas causantes de mortalidades

L. Galaviz-Silva¹, Z.J. Molina-Garza¹, M.F. Salazar-Hinojosa¹, J.C. Ibarra-Gómez², G. E. Cázares-Jaramillo¹ y R. Sánchez-Días².

1 Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. **2** Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental, Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola, Instituto Tecnológico de Sonora.

lucio.galavizsl@uanl.edu.mx

RESUMEN: La camaronicultura produce 4 millones de toneladas en el sudeste de Asia y América Latina. Sin embargo, el mayor problema se debe al impacto de las enfermedades como AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease), causada cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. Las bacterias que habitan ambientes marinos son capaces de producir agentes bactericidas potenciales. El presente trabajo está enfocado a investigar la presencia de bacterias de ecosistemas marinos que produzcan sustancias antimicrobianas y usarlas en alimento como tratamiento. Los muestreos se realizaron en las costas de Sonora. La selección se realizó *in vitro* contra *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32) patógenos. De 180 cepas, las mejores probióticos fueron la 36R, 13L y 36Y. La biomasa se cosechó por centrifugación para aplicar por aspersión (0.4 ml/g de alimento) en 500 g de alimento comercial para camarón juvenil (Camaronina, Purina-Cargill) en cuatro dosis para los retos. Después de agregar el inóculo de *V. parahaemolyticus* AHPND a los tratamientos, se registró la mortalidad cada hora y se graficó la sobrevivencia, identificándose dos *Bacillus cereus* (36R y 36Y) como los mejores probióticos en los retos, disminuyendo la mortalidad hasta en el 70 %.

Palabras clave: Probiótico, cultivo de camarón, *Vibrio parahaemolyticus*.

ABSTRACT: Shrimp farm produce 4 million tons in South East Asia and Latin-America. However, the major problem is due by diseases impacts as AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease), caused by pathogenic strains of *Vibrio parahaemolyticus*. Bacteria that inhabit marine environments can produce potential bactericidal agents. This work is focused on investigating the presence of bacteria from marine ecosystems that produce antimicrobial substances and use them in food as a treatment. Collection of samples were performed in Sonora coasts. Selection of antagonist were made *in vitro* against pathogenic *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32). From 180 strains, the best probiotic strains were 36R, 13L y 36Y. The biomass was harvested by centrifugation to apply by spray (0.4 ml / g of feed) in 500 g of commercial feed for juvenile shrimp (Camaronina, Purina-Cargill) in four doses for each challenge. After adding the inoculum of *V. Parahaemolyticus* AHPND to the treatments, mortality was recorded every hour, two *Bacillus cereus* (36R y 36Y) were identified as the best probiotic, decreasing mortality up to 70%.

Keywords: Probiotic, shrimp farm, *Vibrio parahaemolyticus*.

Área: Nutrición y nutraceuticos

INTRODUCCIÓN

La producción de crustáceos ha tenido un crecimiento anual promedio de 18% durante el período de 1970-2008, el cual supera por mucho el crecimiento de las demás especies acuícolas (FAO, 2010). A nivel mundial la camaronicultura produce casi 4 millones de toneladas (Valderrama y Aderson, 2011). La mayor producción se centra en 12 países entre el sudeste de Asia y América Latina. Sin embargo, el mayor problema de esta actividad se debe al gran impacto de las enfermedades. La patología viral más devastadora en acuicultura es el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV= White Spot Syndrome Virus), debido a las altas mortalidades y persistencia en cultivos camaroneros de 1999 al 2013 (Galaviz-Silva *et al.*, 2004). Sin embargo las enfermedades bacterianas también denotan gran interés; la vibriosis es una de ellas, ampliamente distribuida y responsable de mortalidades en los cultivos de camarón (Lightner *et al.*, 1996). Los vibrios son difíciles de erradicar del ambiente natural

de producción, por tanto requieren de un enfoque de bioseguridad diferente en los cultivos. En 2009, se reportó en Asia una enfermedad emergente, el Síndrome de la Mortalidad Temprana (EMS= Early Mortality Syndrome), hoy designada como AHPND (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease), la cual ha causado pérdidas en los principales países productores, valuadas en más de mil millones de dólares. Es causada por varias cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, las cuales producen una potente toxina que afecta a los organismos (Flegel, 2012; Tran *et al.*, 2013). Hernández y Olmos (2004) analizaron 15 muestras de *Vibrio* spp. de camarones sanos y enfermos de granjas de camarón y se probó la patogenicidad. Dos cepas llamadas Z2 y Z3 fueron patógenas causando el 100 % de mortalidad. La caracterización molecular se realizó por RFLP y PCR, usando primers para diferenciar la virulencia y reguladores transcripcionales o genes “quorum sensing”. Los primers diseñados para *luxN* fueron específicos e identificaron las muestras como *V. harveyi*, *Vibrio nigripulchritudo* es otra especie reportada como causante de mortalidades en Nueva Caledonia por Goarant *et al.* (2006), asociadas las patologías llamadas “Síndromde de Verano” y “Síndrome 93”, fue identificada usando la técnica de AP-PCR (PCR arbitrariamente primado). Haldar *et al.* (2007) reportaron mortalidades masivas de *P. monodon* cultivado en Chennai, al sur de la India. Las bacterias *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* fueron identificadas como los agentes etiológicos por pruebas bioquímicas y por secuenciación de la región 16SrRNA. En México desde el 2013 se presentaron grandes mortalidades en granjas camaroneras del Noroeste, causando pérdidas del 80-100 % en la producción (Soto-Rodríguez *et al.*, 2015).

Las bacterias que habitan ambientes marinos, son capaces de producir agentes bactericidas potenciales (Kamat y Kerkar, 2011); incluso se han reportado otros que poseen propiedades antivirales, antimicóticas, anticoagulantes y antitumorales (Molinski, 1993). El presente trabajo está enfocado a encontrar bacterias que antagonicen con estos patógenos, pues el uso de probióticos o compuestos antimicrobianos en alimento se perfilan como una herramienta alternativa para la prevención y control de patologías en organismos acuícolas. Los alimentos funcionales que contienen aditivos liberan activos antimicrobianos en el tracto de los organismos cada vez que son alimentados, esto puede ser una importante estrategia para prevenir enfermedades bacterianas como el EMS (Coutteau y Goossens, 2013). Lo anterior justifica el desarrollo y originalidad de este proyecto, aunado a investigar la presencia de bacterias asociadas a sustratos marinos (camarón, bivalvos, algas y minas de sal) que produzcan sustancias antimicrobianas, y las cuales puedan aplicarse en alimento como tratamiento profiláctico o terapéutico en el control de enfermedades de los cultivos de camarón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron en escolleras, esteros y depósitos salinos de las siguientes regiones del Sur de Sonora: Bahía de Lobos, Mélagos, La Atanasia, El Riíto y Yaváros. Se colectaron los siguientes especímenes: el camarón silvestre, los bivalvos se colectaron en canales de llamada. Las algas se removieron del sustrato adherido en escolleras. El agua marina se tomó directamente con una bolsa de plástico estéril (Whirl-pak, Nasco), a 15-30 cm de profundidad; y el sedimento salino se colectó en bancos salinos naturales con espátula y bolsas estériles, a 20 cm de profundidad.

Bacteriología de especímenes y aislamiento de cepas. Los moluscos bivalvos, camarones y algas se lavaron y homogeneizaron, agregando 1 g en 9 ml de solución salina (2% NaCl) para preparar la suspensión (Báez-Hidalgo, 2008). Del sedimento se agregó 1 g en 9 ml de solución salina y se homogenizó en vórtex (Holt *et al.*, 1994). Se sembraron 100 µl por extensión en medios Agar soya tripticasa (TSA, Difco) al 2% de NaCl y Agar Marino (AM, Difco). Se incubaron a 28-30°C (Binder, BD) por 24, 48 y 72 h. Se seleccionaron diferentes bacterias considerando el morfotipo colonial, coloración y origen.

Para los retos de antagonismo se utilizaron cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de epizootias de AHPND en cultivos camaroneros de Sonora (2013-2015) y cepas de referencia (ATCC y MTCC) (Tabla 1).

Tabla I. Cepas de trabajo y referencia utilizadas en el estudio.

Cepa	Clave	Fuente
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (AHPND)	MC32	ITSON (Instituto Tecnológico de Sonora)
	B25	
	E14V2	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11DC	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	MTCC 451	MTCC (Microbial Type Culture Collection)

La selección inicial de las antagonistas se realizó con el método de estría cruzada (CSM) a partir de un cultivo de 24 h. Del mismo modo se preparó una suspensión con la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32) y se sembró en un ángulo de 90° atravesando la zona de la bacteria candidata. Se observó la interacción con la presencia o ausencia de inhibición (Kamat & Kerkar, 2011). La caracterización microbiológica y bioquímica incluyó la tinción de Gram y Shaeffer-Foulton, se determinó la agrupación de las bacterias y presencia de endosporas. Se utilizaron las galerías de pruebas bioquímicas API 20E para identificar las cepas Gram positivas (BioMerieux) y API 50 CHB (BioMerieux) siguiendo el protocolo del fabricante. Identificación molecular por amplificación del gen 16S ARNr. Se amplificó el gen 16S ARNr de las bacterias marinas antagonistas. Los primers utilizados fueron: U1F (5' - CTYAAAKRAATTGRCGRRRSC - 3') y U1R (5' - CGGGCGGTGTGTRCAARRSC - 3') (Rivas *et al.*, 2004). Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1%, se purificaron con el kit QIAquick PCR (Qiagen) y fueron enviados a secuenciación en Servicios Genómicos de CINVESTAV-LANGEBIO, Irapuato, Guanajuato.

Preparación de dietas. Las mejores cepas probióntes 36R, 13L y 36Y se reactivaron en caldo y se sembraron en placas de TSA (2% NaCl) por 24 h a 30°C. Se inocularon 2 colonias en un matraz con 500 ml de TSB (2% NaCl) o MB y se incubaron en un agitador orbital por 24 h a 30°C y 150 RPM. La biomasa se cosechó por centrifugación a 5,000 RPM durante 10 min, y se resuspendió en 250 ml de solución salina para aplicar por aspersión (0.4 ml/g de alimento) en 500 g de alimento comercial para camarón juvenil (Camaronina, Purina-Cargill) con 35% de proteína. De cada suspensión bacteriana se estimó la carga de UFC mediante siembra en placas de TSA o MA, por dilución. Se prepararon cuatro dietas: D1 con 36R, D2 con 13L, D4 con 36Y y D4 con una mezcla 1:1 de 36R y 36Y, y C dieta control sin aditivo bacteriano. El alimento se colocó en charolas para agregar un segundo recubrimiento (gelatina al 6%), y posteriormente se secó en un horno a 50°C (Yamato) por 3 h. El alimento desecado se guardó en recipientes de plástico etiquetados hasta su uso (Manilal *et al.*, 2011; Sugathan *et al.*, 2014).

Preparación y aplicación de inóculo bacteriano

Para el desafío se utilizó la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32), la cual se reactivó en TSB y se sembró en placas de TSA (2% NaCl), TCBS y CHROMagar Vibrio para corroborar su fenotipo. A partir de una colonia pura, se realizó un preinóculo en 3 ml de TSB (2% NaCl) por 1 h a 30°C. Posteriormente el preinóculo se agregó a un matraz con 2.5 L de TSB (2% NaCl), y se incubó a 30°C en agitación orbital, hasta alcanzar una OD a 600 nm de 1 (10⁷-10⁹ cel ml⁻¹ aprox). Se agregaron 140 ml de inóculo (4.7 ml L⁻¹ aprox.) a cada pecera de desafío, y al control negativo se agregó TSB estéril (Tran *et al.*, 2013; Joshi *et al* 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). Los resultados de pruebas antagonicas y biofilm se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía al 95%. Los resultados del bioensayo de desafío en camarón fueron analizados mediante ANOVA y Kaplan Meier, para determinar las diferencias entre los tratamientos y la sobrevivencia, respectivamente

Tabla II. Cepas seleccionadas con potencial antagonico.

Cepa	Localidad	Espécimen
36R- <i>Bacillus cereus</i>	La Atanasia	Salina
42 <i>Bacillus sp.</i>	Lobos	Salina
13L <i>Bacillus sp.</i>	Lobos	Salina
36Y <i>B. cereus</i>	El Riíto	Hipersalina
02Y	Yaváros	Alga

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron por bacteriología diferentes especímenes de distintas localidades y a partir de cultivos heterótrofos y se aislaron 180 cepas con características distintas. Mediante la evaluación preliminar *in vitro* del lote de bacterias por CSM con la cepa *V. parahaemolyticus* AHPND (MC32), se seleccionaron cinco aislados con potencial antagonico para una caracterización bioquímica y genómica (16SRNA) identificandose dos *Bacillus cereus* (36R y 36Y).

Pruebas de antagonismo *in vitro*. En la prueba de CSM los antagonistas produjeron halos de inhibición de entre 8 a 39 cm con los distintos *V. parahaemolyticus* patogénicos.

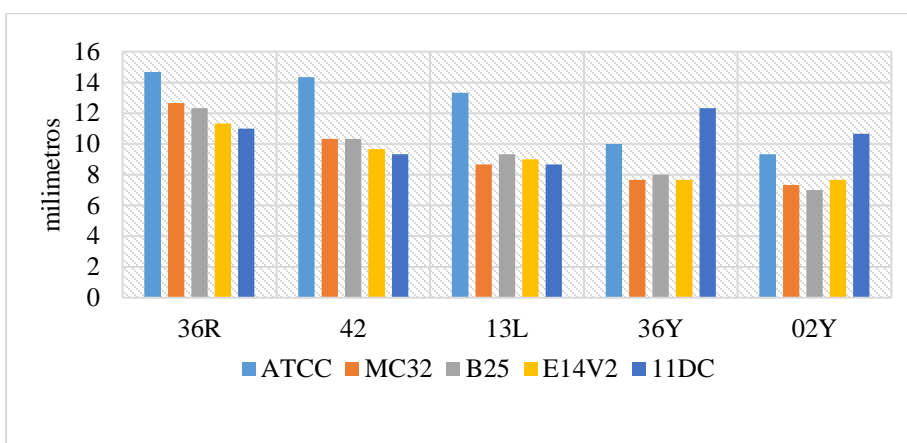


Figura 1. Promedio de zonas de inhibición en mm entre cepas.

Las cepas 36R y 36Y pertenecientes al género *Bacillus* mostraron mayor rendimiento antagonico (Figura 1)

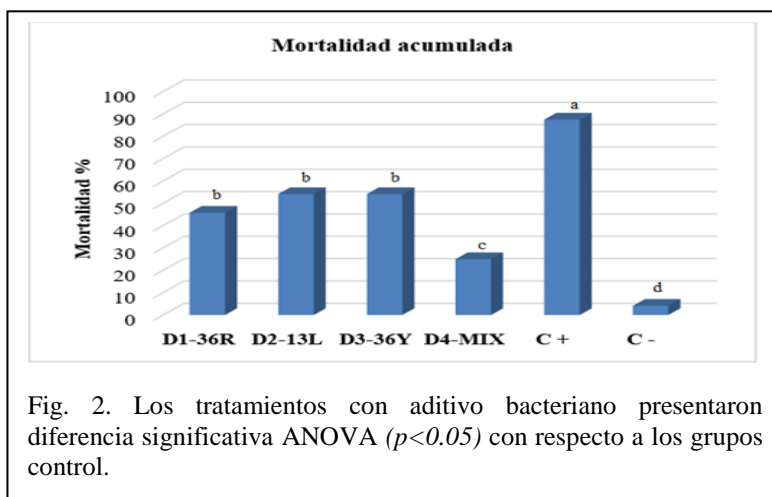


Fig. 2. Los tratamientos con aditivo bacteriano presentaron diferencia significativa ANOVA ($p < 0.05$) con respecto a los grupos control.

Evaluación *in vivo* de cepas con potencial probiótico: Los organismos después de ser alimentados 28 días con las dietas de aditivos bacterianos, se transfirieron a una sala de desafío donde cada tratamiento con 50 camarones demostró aumentar la sobrevivencia de hasta el 70 % con la dieta compuesta por una mezcla de dos bacterias. Estos resultados subrayan las propiedades de algunas cepas de *Bacillus* y *Pseudoalteromonas* con propiedades bactericidas, como Liu *et al.* (2015) quien

reporta el aislamiento de *Bacillus pumilus* y *Bacillus mojavensis* los cuales demostraron actividad antimicrobiana *in vitro* contra *V. parahaemolyticus*. Ambas cepas producen actividad enzimática hidrolítica y antagonismo a más de una bacteria *in vitro*, lo cual indica que estas dos cepas tienen un amplio espectro de aplicación como probióticos en acuicultura. Interaminense *et al.* (2018) encuentra en *Bacillus subtilis* propiedades antagonicas contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* y lo utilizan a manera de aditivo en alimento ayudando a mejorar el crecimiento y estado sanitario de los organismos.

BIBLIOGRAFÍA

- Báez-Hidalgo, R. 2008. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja, caracterización y patogénesis. Universidad de Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. España. 102 – 9.
- Coutteau, P., & Goossens, T. 2013. Novel additives to reduce the economic impact of disease on shrimp production. *International Aquafeed*. January February 2013 pp. 28-32.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010: El Estado Mundial de la Pesca y La Acuicultura [en línea]. <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf>
- Flegel, T.W. 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J Inv Pathol*, 110, 166-173
- Galaviz-Silva L.; Molina-Garza Z.J., Alcocer J.M., & Rosales-Encinas J.L. 2004. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. *Aquaculture*, 242, 53–68.
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Deckera, S., Saulnier, D., & le Roux, F. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst Appl Microbiol*, 29, 570-580.
- Haldar, S., Chatterjee, S., Asakura, M., Vijayakumaran, M., & Shinji, Y. 2007. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Non-O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post larvae and juveniles. *Ann Microbiol*, 57, 55-60
- Hernández, G., & Olmos, J. 2004. Molecular identification of pathogenic and nonpathogenic strains of *Vibrio harveyi* using PCR and RAPD. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 722–727.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sheath, P.H.A., Staley, J.T., & Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Interaminense, J.A. Gouveia, W.S., Portela, J.P., Oliveira, H.A., Andrade, S.M., Peixoto, R.B., & Bezerra, R.S. 2018. *In vitro* and *in vivo* potential probiotic activity of *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* for use in *Litopenaeus vannamei* rearing. *Aquaculture*, 488, 114-122.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chend TI, Nuangsaenge B, Suthienkul O, Lo CF, Flegel TW, Sritunyaluksana K., & Thitamadee, S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428-429, 297–302.
- Kamat, T., & Kerkar, S. 2011. Bacteria from salt pans: a potential resource of antibacterial metabolites. *Recent Res Sci Technol*, 3, 46–52.
- Lightner, D.V. 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev Scient Tech Off Int Epizoot*, 15, 579-601.
- Liu, X.F., Li, Y., Li, J.R., Cai, L.Y., Li, X.X., Chen, J.R., & Lyu, S.X. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus spp.* antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*, 31(5), 795-803.
- Manilal, A., Selvin, J., Sugathan, S., & Panikkar, M.V.N. 2011. Evaluation of therapeutic efficacy of Indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (j. agardh) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon*. *Thalassas An Int J Mar Sci*, 28(1), 33-46.
- Molinski, T.F., 1993. Marine pyridoacridine alkaloids: structure, synthesis, and biological chemistry. *Chem Rev*, 93, 1825–1838.
- Rivas, R., Velázquez E., Zurdo-Piñero J.L., Mateos P.F., & Martínez Molina E. 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J Microbiol Met*, 56, 413– 426.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M.S. 2015. Field and Experimental Evidence of *Vibrio parahaemolyticus* the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 81(5), 1689–1699.
- Sugathan, S., Manilal A., & Selvin J. 2014. Development of a probiotic for the management of shrimp Vibriosis. *Scholars' Press, India*, pp. 96-98.
- Tran, L., Nunan, R., Redman, M., Mohny, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D.V. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Org*, 105, 45–55.
- Valderrama, D. & Anderson, J.L. 2011. Shrimp production survey. GOAL 2011, Santiago, Chile.