

Alimentación del Salmón

Perspectivas del Uso de Microorganismo para Mejorarla

Chile llegó a ser uno de los líderes en producción de salmónes en el mundo, sólo superado en breve margen por Noruega. Sin embargo, el elevado costo de ingredientes en los alimentos y las enfermedades infecciosas amenazan la proyección de esta actividad. La crisis sanitaria, aunque fuertemente asociada a la aparición de virus ISA, arrastra temas pendientes que se relacionan con mortalidades que pueden presentarse en diferentes etapas productivas, donde los patógenos bacterianos del salmón forman aún parte importante de este problema.

A pesar de la aversión que generan las infecciones bacterianas, se debe tener presente que solo una fracción de las bacterias que interactúan con el salmón son dañinas; la mayor parte son inocuas. Es en este sentido, que los microorganismos de la microbiota del tracto digestivo de peces han sido investigados tanto por su posible aporte

a la digestión de alimentos, como por su papel en la estimulación del sistema inmune y en el control de enfermedades. En el Laboratorio de Biotecnología del INTA en la Universidad de Chile se realizan estudios enfocados a sacar partido de la microbiota de los peces. El principal objetivo es aislar microorganismos desde el tracto digestivo de peces e identificar aquellos que presenten propiedades beneficiosas y luego re-introducirlas en el tracto digestivo de salmónidos usando como vehículo al alimento. La estrategia de selección ha incorporado dos criterios. Por una parte, se buscan bacterias capaces de inhibir el crecimiento de patógenos de géneros como *Vibrio*, *Flavobacterium* y *Piscirickettsia*. En segundo lugar, se identificaron microorganismos capaces de disminuir el efecto de la presencia de factores antinutricionales en insumos vegetales, a través de la expresión de enzimas (proteasas, glucosidasas, fitasas). Co-

mo resultado se obtuvo un panel de cepas en las cuales se han determinado una veintena de propiedades, como sus parámetros de crecimiento, producción de exoenzimas, tolerancia a sales, entre otras. Luego de este análisis se perfilan al menos 3 candidatos a probióticos. Los primeros ensayos de persistencia en el tracto digestivo indican auspiciosas aplicaciones de estas bacterias candidatas.

Identificación y propiedades beneficiosas para la nutrición

Se obtuvieron numerosos aislados de los géneros *Lactococcus* y *Carnobacterium*. Estos géneros representan bacterias frecuentemente asociadas al tracto digestivo como lo revelan estudios de microbiota realizados a través de análisis molecular (Hovda 2007, Navarrete, 2009). Además, se obtuvieron en menor proporción representantes de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

Los aislados fueron testeados en su capacidad para producir enzimas (Tabla 1). Aquellos identificados como *Lactococcus* presentaron actividad amilasa y proteasa, pero ninguno presentó actividad glucosidasa. En cambio, *Carnobacterium* presentó actividad proteasa y algunos una destacada actividad glucosidasa. Las levaduras ensayadas presentaron las actividades buscadas, lo cual las convierte en potenciales probióticos, ya que podrían aportar estas enzimas en su paso por el sistema digestivo. Esto ayudaría a la digestión compensando la presencia de antinutricionales de los componentes vegetales, como los polisacáridos y los inhibidores de proteasa presentes en la soya. En especial estas levaduras pueden aportar fitasa, enzima que degrada el fitato, polímero de fosfato presente en la soya. Esto ayudaría a hacer más disponible esta fuente de fósforo y reduciría sus efectos deletéreos en la nutrición asociados a la mala absorción de minerales y proteínas.

Antagonismo contra patógenos

Teniendo en consideración los efectos de la crisis sanitaria y la restricción creciente al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas, se realizó un esfuerzo para caracterizar los aislados en su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos más comunes. Se incluyeron en esta prueba tanto levaduras como aislados bacterianos. Esta elección se basó en que los aislados correspondían a poblaciones microbianas previamente reportadas como frecuentes dentro de la microbiota de salmónidos (Navarrete 2009, Gate-soupe 2007).

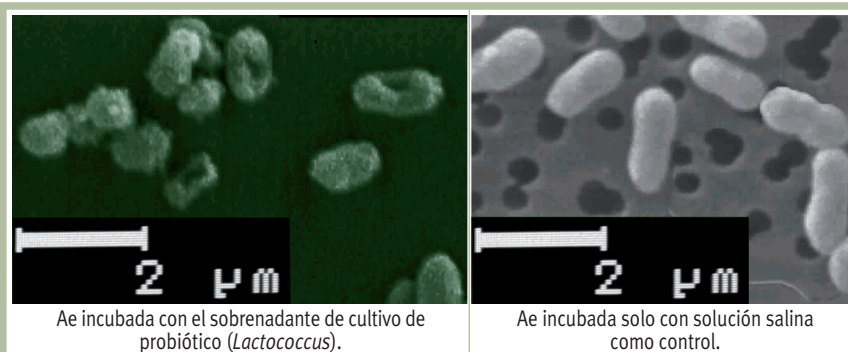
Los resultados se resumen en la Tabla 1 que presenta los halos de inhibición del crecimiento de patógenos en cul-

Candidatos Probióticos		Patógenos ensayados							Enzimas presentes			
Identificación	Nombre cepa	Vo	Lp	Ae	Ye	FL-CSF	FL-T23	PS-01	Amilasa	Proteasa	Glucosidasa	Fitasa
<i>Carnobacterium</i>	2 A-7L39	11	6	10	6	6	10	6	-	-	+	-
<i>Lactococcus</i>	AoP1-7	15	13	10	6	8	12	8	++	+++	-	-
	AoP1-9	14	12	6	6	9	8	11	+++	+++	-	-
	AoP3-15	14	14	9	6	6	9	9	+++	+++	-	-
	BoP1-8	15	12	9	6	13	13	9	+++	+++	-	-
<i>Pediococcus</i>	Bo12	15	14	13	8	Nd	Nd	6	-	-	+	-
Levadura	K1(-)1	6	6	6	6	6	6	6	+	+	+++	+++

nd: No determinado, *Vibrio ordalii* (Vo), *Lactococcus piscium* (Lp), *Aeromonas salmonicida* (Ae), *Yersinia ruckeri* (Ye), *Flavobacterium psychrophilum* (FL CSF y T23), *Piscikrickettsia salmonis* (PS PS-01).

Tabla 1

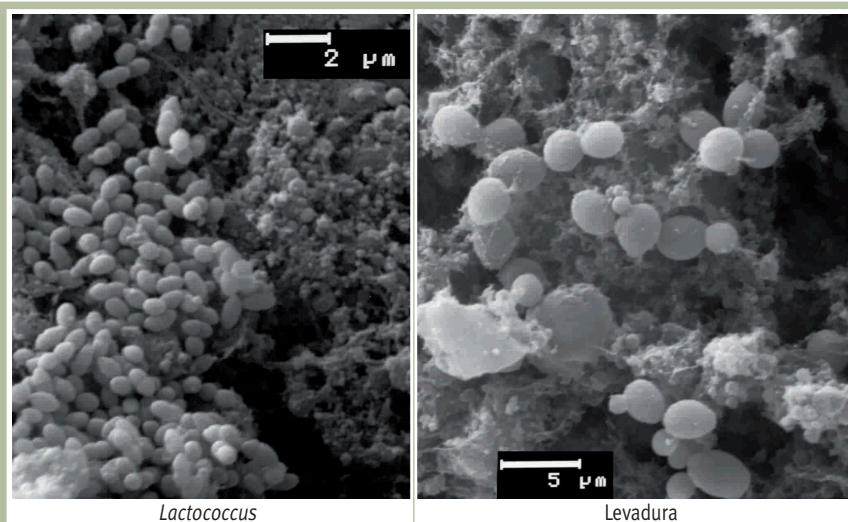
Visualización de *Aeromonas salmonicida* por microscopía electrónica de barrido



Fotos de microscopía electrónica de barrido Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Figura 1

Asociación de los probióticos a mucus intestinal de salmón del Atlántico



Fotos de microscopía electrónica de barrido Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Figura 2

tivos in vitro. Cada celda indica los diámetros de halos en mm (se debe considerar que cada pocillo tiene diámetro 6 mm). Algunos candidatos del género *Lactococcus* muestran antagonismo contra diferentes patógenos incluso sobre *Piscirickettsia salmonis*, con considerables halos de inhibición. Los candidatos *Carnobacterium* y *Pediococcus* presentaron antagonismo aunque con un espectro más reducido de acción. El efecto que lograrían los probióticos sobre los patógenos puede apreciarse en la Figura 1. En ella se muestra cómo la integridad de *Aeromonas salmonicida* podría ser afectada por los probióticos. Después de incubar algunas horas con el sobrenadante de cultivo de la cepa de B0P1-8 (*Lactococcus*), se puede apreciar deterioro de las estructuras externas del patógeno.


Asociación a mucus intestinal

Debido a que los probióticos deben ser absolutamente inocuos para el salmón,

cada aislado fue sometido a pruebas de seguridad e inocuidad. Las cepas inocuas seleccionadas deberían presentar fuerte asociación al tracto digestivo para ejercer su acción. Una de las propiedades más comunes en las cepas probióticas es su capacidad para adherirse al mucus del tracto digestivo. Por lo tanto, se ensayaron dos propiedades: la asociación al mucus intestinal y su capacidad para multiplicarse usando solo mucus como nutriente. Las cepas de Levaduras y algunos *Lactococcus* presentaron un notable crecimiento en mucus, con rápida velocidad de multiplicación sobre el mucus intestinal. Además, estos probióticos se asocian al mucus intestinal, como se muestra en la Figura 2.

Perspectivas

Los aislados de *Lactococcus* mostraron propiedades promisorias que proyectarían su uso como probióticos en base a la capacidad antagónica mostrada contra varios patógenos. A pesar

de que no presentan claro antagonismo contra patógenos, las levaduras aisladas podrían convertirse en un excelente complemento nutricional dado el aporte de enzimas tipo glucosidasa y fitasa. Además, la asociación al mucus de estas cepas y su capacidad para multiplicarse en ese microambiente, podrían explotarse para evitar la unión y proliferación de patógenos por competencia. 

REFERENCIAS:

Gatesoupe F.J. (2007). Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267: 20-30.

Hovda MB, Lunestad BT, Fontanillas R, & Rosnes JT (2007) Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 272: 581-588.

Navarrete P., Magne F., Mardones P., Riveros M., Opazo R., Suau A., Pochart, P., Romero J. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Microbiology Ecology*. En prensa. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00769.

Jaime Romero,
Laboratorio de Biotecnología INTA
Universidad de Chile