

BIOPROSPECCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE CIANOBACTERIAS AISLADAS DE CULTIVOS DE *Litopenaeus vannamei* EN SAN FELIPE, B. C. MÉXICO

Norma García, Elizabeth Ponce, y Ma. Enriqueta Muñoz
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Departamento de Acuicultura,
Biotecnología Marina. Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B. C. México. C.P. 22860.
Fax: (646)175-05-34 E-mail: eponce@cicese.mx

Palabras clave: Cianobacterias, compuestos antimicrobianos, compuestos tóxicos

Introducción. Las cianobacterias son una fuente rica de una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos con interés biotecnológico tales como pigmentos, hormonas, antibióticos, polímeros y fármacos. Sin embargo, algunas de ellas también producen toxinas responsables de causar enfermedad y muerte aguda o crónica en organismos marinos tales como peces e invertebrados (1). La cianobacteria *Spirulina subsalsa* se han relacionado con un síndrome caracterizado por enteritis hemocítica aguda en estanques de cultivo de camarón de la especie *Litopenaeus stylirostris* (2). En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento e identificación de cianobacterias presentes en cultivos de *L. vannamei* de la granja Vizomar ubicada en San Felipe, B. C., México, así como bioensayos para detectar producción de compuestos antimicrobianos y biotoxinas.

Metodología. Se colectaron cianobacterias tanto del tracto intestinal de camarones como de tapetes microbianos de los estanques. Se crecieron en medio ASNIII, en fotoperiodo (12 h -12 h) y $30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las especies se aislaron por varios métodos: bloque invertido, diluciones, estriado, lavado por filtros y por goteo (3). Los cultivos unicianobacterianos axénicos fueron utilizados para identificar a las cianobacterias por métodos morfológicos y moleculares. Para la identificación se amplificó una de las regiones variables del gen ribosomal 16S. Los productos fueron secuenciados y alineados con secuencias de cianobacterias del GenBank. La región intergénica ribosomal 16S-23S de las cianobacterias se amplificó por PCR y se realizó un análisis de RFLP para comparara los patrones de bandeo entre las cepas. A partir de cepas liofilizadas se obtuvieron extractos tanto para los ensayos biotóxicos con *Artemia* sp. como para los bioensayos antimicrobianos (4) utilizando como prueba especies patógenas de camarón, principalmente del género *Vibrio*.

Resultados y discusión. Se aislaron seis cianobacterias marinas asociadas al cultivo de *L. vannamei* Las secuencias parciales del gen que codifica para el ARNr 16S obtenidas de las seis cianobacterias hasta el momento no ha sido suficiente para identificarlas a nivel de especie. Los análisis de restricción para la región intergénica con las enzimas *Hha I* y *Dde I* proporcionaron patrones de restricción claros y permitieron diferenciar entre las 6 cepas. Las cianobacterias aisladas e identificadas fueron: *Oscillatoria* sp. 1, *Synechocystis* sp., *Oscillatoria* sp. 4 (posible *O. laete-virens*), *Oscillatoria* sp. 5 (posible *O. limnetica*), *Phormidium* sp. y *Lyngbya* sp. Esta última fue la especie dominante en los tapetes microbianos y en el tracto digestivo del camarón, junto con *Oscillatoria* sp. 5. Asimismo, se evaluó la capacidad de

producción de compuestos antimicrobianos y toxinas por estas cianobacterias tanto de un cultivo como del tapete microbiano completo. Todas las cianobacterias mostraron propiedades antimicrobianas. Los halos de inhibición de crecimiento mas importantes se obtuvieron con los extractos de las cianobacterias *Oscillatoria* sp. 1 y *Lyngbya* sp. Estos halos de inhibición fueron observados principalmente contra *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, que son bacterias patógenas para el camarón, así como para la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en los bioensayos con *Artemia* sp., los nauplios fueron sensibles principalmente a los extractos de la cianobacteria *Oscillatoria* sp. 1. Esta cianobacteria fue considerada la más tóxica, por provocar el 100 % de mortalidad de *Artemia* sp. en 24 h. a una concentración de 100 mg/ml, mientras que *Oscillatoria* sp. 5 fue considerada como no tóxica por provocar la muerte de menos del 10 % de *Artemia* sp.

Conclusiones. Se aisló una cianobacteria unicelular y 5 filamentosas. Aun no se ha logrado identificarlas a nivel de especie. Los patrones de bandeo obtenidos por RFLP pueden ser utilizados en forma complementaria para la identificación rápida de estas cianobacterias. Las cianobacterias *Oscillatoria* sp. 5 y *Lyngbya* sp. fueron las especies dominantes del tapete microbiano y del tracto intestinal del camarón. Esto significa que el camarón se esta alimentando en forma selectiva de por lo menos estas dos cianobacterias. Estas cepas podrían estar actuando como probióticos en *L. vannamei*, ya que fueron clasificadas como no tóxica y poco tóxica para crustáceos como *Artemia*, respectivamente y ambas producen compuestos antimicrobianos contra *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

Agradecimiento: Este trabajo se realizó con el apoyo de SINVE No. 010-DE y CICESE

Bibliografía.

1. Smith, T. P. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of oscillatorias on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and brine shrimp (*Artemia salina*). *Elsevier Science*. 34 (8):857-869
2. Lightner, D. V. (1978) Possible toxic effects of the marine blue-green algae, *Spirulina subsalsa*, on the blue shrimp, *Penaeus stylirostris*. *J. Inv. Pathol.* 32: 139-150
3. Rippka, R., 1988. Recognition and Identification of Cyanobacteria. *Meth. Enzymol.* 167:28-50
4. Ostensvik, O., B. Skulberg, V. Hormazabal. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria-a comparative study of bacterial bioassays. *J. Applied Microbiol.* 84:1117-1124.

