



ALLIANCE™

(<https://www.globalseafood.org>).



Health &
Welfare

¿Puede la inclusión dietética de arcilla de montmorillonita ayudar a mitigar la pandemia de AHPND del camarón cultivado?

12 June 2023

By Wing-Keong Ng, Ph.D., FASC

Los resultados de los ensayos de alimentación sugieren el potencial para mejorar el crecimiento y la salud



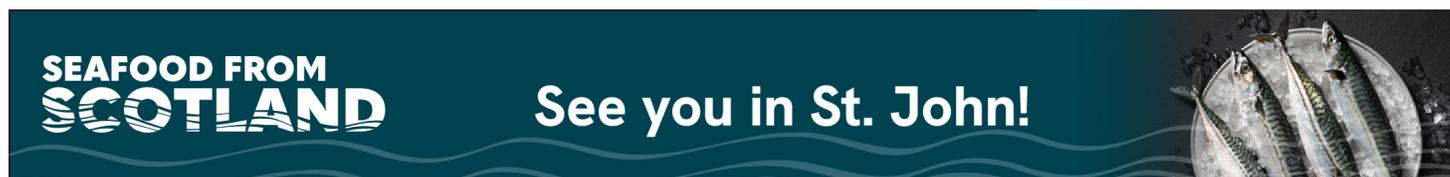
Este estudio investigó la inclusión dietética de arcilla de montmorillonita en alimentos funcionales para mitigar la pandemia de AHPND en camarones cultivados.

Con la creciente intensificación de los sistemas de cultivo, prevalecen los brotes de enfermedades del camarón. En años recientes, el cultivo de camarones ha sufrido pérdidas económicas significativas debido a la aparición de una enfermedad bacteriana llamada enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, por sus siglas en inglés), que había causado y sigue causando mortalidades de camarones del 40 al 100 por ciento durante los primeros 35 a 45 días después de la siembra de postlarvas en estanques de engorde. Una enfermedad infecciosa que se propaga por países y continentes, la AHPND es una pandemia bacteriana en la industria del cultivo de camarones.

Los estudios han revelado que las bacterias *Vibrio* que causan AHPND ahora muestran resistencia a una amplia gama de antibióticos. Con las tendencias regulatorias globales cambiantes sobre el uso de antibióticos en la cría de animales, es imperativo encontrar alternativas al uso profiláctico y terapéutico de antibióticos en los alimentos acuícolas para camarones. Se están sugiriendo muchos aditivos alimentarios con diferentes modos de acción dirigidos directa o indirectamente a la bacteria *Vibrio* y/o al huésped del camarón. Una idea innovadora para mitigar la infección por AHPND sería unir directamente las toxinas de AHPND, lo que daría como resultado que las toxinas se eliminen del cuerpo a través de la expulsión fecal antes de que puedan migrar al hepatopáncreas y causar daño.

Los minerales arcillosos (por ejemplo, la montmorillonita) se usan comúnmente como adsorbentes para disminuir los efectos de las micotoxinas en la dieta de los alimentos para animales. Una empresa estadounidense (Amlan International Inc.), a través de sus colaboradores de investigación, descubrió que su producto comercial existente de montmorillonita de calcio (Calibrin[®]-Z, disponible en mercados internacionales selectos) puede unir las toxinas AHPND PirAB *in vitro*. Por lo tanto, decidimos realizar un ensayo de alimentación para evaluar la efectividad y la eficacia de Calibrin-Z (CL) para mitigar la AHPND.

La montmorillonita pertenece al grupo de la esmectita de minerales arcillosos y es esencialmente un aluminosilicato de calcio y/o sodio hidratado. Una fuente importante de montmorillonita en la naturaleza es la roca bentonita de arcilla. Se informó que los componentes principales de la montmorillonita utilizada en este estudio eran al menos un 70 por ciento de montmorillonita y un 15 por ciento de dióxido de silicio hidratado amorfo. Se seleccionó específicamente por su capacidad para unir toxinas y se procesa con un tratamiento térmico patentado para activar la unión de toxinas de amplio espectro. Se ha demostrado que se une a toxinas fúngicas y bacterianas *in vitro* y mitiga sus efectos en aves y ganado.



(<https://events.seafoodfromscotland.org/>).

Recientemente realizamos un estudio para evaluar si, y en qué medida, la inclusión de CL en la dieta podría proporcionar beneficios para el rendimiento del crecimiento, la utilización del alimento y la resistencia a enfermedades del camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) al AHPND. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de los efectos de la montmorillonita dietética en la microbiota del estómago del camarón durante una infección por AHPND. Teniendo en cuenta la magnitud de la pandemia de AHPND y el gran interés de los camaroneros en encontrar una solución rentable, es pertinente y crucial investigar posibles alternativas a los antibióticos.

Prueba de alimentación y desafío de enfermedades

Se prepararon cuatro dietas prácticas utilizando un alimento post-larval de camarón comercial (Post Larva II crumbles #902, Gold Coin Specialties Ltd., Malasia) como formulación base. El alimento comercial para camarones se molió en un polvo fino antes de volver a peletizar. La dieta de control positiva (posCON) y negativa (negCON) consistió en alimento comercial para camarones fabricado con la adición de un aglutinante de gránulos (Pegabind[®], Bentoli AgriNutrition Co., Ltd., Tailandia). Solo los camarones alimentados con la dieta posCON fueron posteriormente desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* (VP_{AHPND}). También se peletizaron otras dos dietas con la inclusión de 0,25 por ciento (0,25 por ciento CL) o 0,5 por ciento (0,5 por ciento CL) de arcilla de montmorillonita (Calibrin[®]-Z) a expensas de α -celulosa. Las dietas de control no tenían arcilla añadida.

Al comienzo de la prueba de alimentación, todos los camarones SPF (PL30) se privaron de alimento durante la noche y se pesaron grupos de 20 camarones aparentemente sanos, se transfirieron a cada uno de los acuarios de 15 litros y se asignaron al azar a uno de los tratamientos dietéticos. Grupos triplicados de camarones fueron alimentados a mano con su respectiva dieta tres veces al día a las 9 a.m., 2 p.m. y 6 p.m. hasta la saciedad aparente durante dos semanas. Todos los camarones se contaron y pesaron por lotes al final de la prueba de alimentación. A lo largo de la prueba de alimentación, la salinidad, el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura del agua de cultivo estuvieron dentro del rango de $23 \pm 1\text{‰}$, $5,5 \pm 0,1$ mg/L, $8,1 \pm 0,2$, $28 \pm 0,4$ grados-C, respectivamente.

Después de que se completó la prueba de crecimiento, se extrajo aleatoriamente de cada acuario una submuestra del número requerido de camarones de cada tratamiento dietético, se agruparon y luego se repoblaron a 16 camarones por acuario para la prueba de desafío de la enfermedad. El desafío de la enfermedad se llevó a cabo utilizando el método de inmersión. Los camarones de cada acuario en los grupos posCON, CL al 2,5 por ciento o CL al 5 por ciento se colocaron durante 15 minutos (con

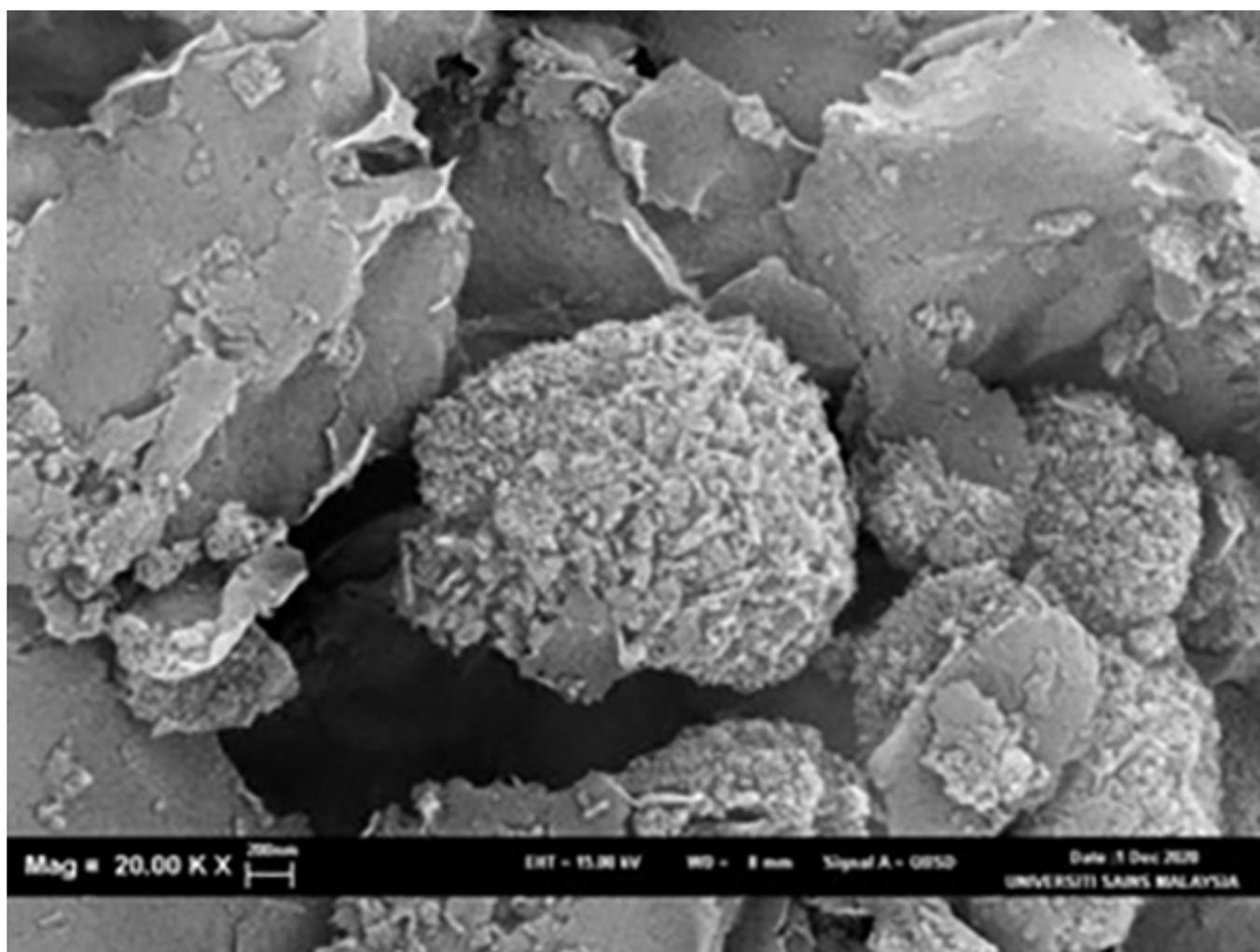


Fig. 1: Micrografía de microscopía electrónica de barrido de Calibrin®-Z que muestra los numerosos poros apilados, enrejados e interconectados de la arcilla activada térmicamente que puede unir toxinas. Las lepisferas de ópalo (OL), que son agregados microesféricos de dióxido de silicio, se pueden ver intercaladas entre las redes de arcilla (aumento: 20,000x).

aireación) en un matraz Erlenmeyer de 1 litro que contenía 150 ml de cultivo VP_{AHPND} (10^8 UFC/ml). Luego, la suspensión bacteriana, incluidos los camarones, se vertió directamente en su respectivo acuario que contenía agua de mar artificial limpia para obtener una densidad bacteriana de aproximadamente 10^6 CFU/mL. El tratamiento de control negativo (negCON) se incluyó para servir como control ambiental y los camarones no fueron desafiados con VP_{AHPND} sino sumergidos en caldo de soya trípico estéril más 1,5 por ciento de NaCl. Durante la prueba de desafío de la enfermedad de siete días, los camarones fueron alimentados dos veces al día con su dieta respectiva y recibieron un cambio de agua del 50 por ciento por la mañana. Todos los camarones fueron observados cada tres horas para monitorear los signos clínicos macroscópicos y la mortalidad. Los camarones muertos fueron registrados y retirados de los tanques experimentales.

Después de la exposición a AHPND, se extirpó asépticamente el hepatopáncreas para análisis microbiológico e histopatológico. El estómago del camarón también se extrajo para el análisis de microbiota. Todos los datos recopilados fueron luego sometidos a análisis estadístico. Los detalles

completos sobre las metodologías utilizadas se pueden encontrar en la **publicación original** (<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115581>) de Ng *et al.* (2023), *Dietary montmorillonite clay improved Penaeus vannamei survival from acute hepatopancreatic necrosis disease and modulated stomach microbiota*. Animal Feed Science and Technology 297, 115581.

¿Protegen las dietas suplementadas con fitobióticos al camarón blanco del Pacífico contra AHPND?

Las dietas de camarones suplementadas con fitobióticos y aplicadas en períodos críticos podrían mitigar el impacto de AHPND y otras patologías.



Global Seafood Alliance

La eficacia de la arcilla de montmorillonita (Calibrin®-Z)

Todas las dietas experimentales fueron bien aceptadas por los camarones y, al final de la prueba de alimentación, los camarones duplicaron con creces su peso corporal inicial. La inclusión de CL en la dieta no influyó negativamente en el crecimiento, la eficiencia de utilización del alimento, ni en el consumo de alimento y la supervivencia de los camarones, y todos los parámetros no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$). La tasa de conversión alimenticia (FCR) fue excelente con valores cercanos a 1,0 y la supervivencia de los camarones fue del 95 por ciento o más en todos los grupos de tratamiento.

Los camarones del grupo negCON (no desafiados con VP_{AHPND}) mostraron una supervivencia promedio de $95,8 \pm 2,1$ por ciento durante los siete días del ensayo de desafío de la enfermedad. Solo hubo dos muertes de camarones de un total de 48 camarones en el grupo negCON. Los camarones en el grupo posCON desafiado con VP_{AHPND} tuvieron la supervivencia promedio más baja de $39,6 \pm 10,4$ por ciento, que fue significativamente más baja ($P < 0,05$) en comparación con el control negativo. Los camarones infectados mostraron signos clínicos típicos de AHPND. La supervivencia de los camarones alimentados con dietas suplementadas con CL, independientemente del nivel dietético, no fue significativamente diferente en comparación con el grupo de negCON no desafiado. No hubo diferencias significativas en la supervivencia de los camarones alimentados con 0,25 por ciento o 0,5 por ciento de CL durante la prueba de desafío de la enfermedad.

Fig. 2: Supervivencia acumulada (n=3) de *L. vannamei* alimentado con la dieta de control (control positivo) o con dietas suplementadas con arcilla de montmorillonita (Calibrin®-Z) cuando se expuso a *V. parahaemolyticus* (cepa 3HP). Los camarones en el grupo de control negativo no fueron desafiados. Letras diferentes indican diferencias significativas (P <0,05).

Fig. 3: Secciones transversales representativas del hepatopáncreas de *L. vannamei* alimentado con la dieta de control (control positivo) o con dietas añadidas de Calibrin®-Z después de ser desafiado con *V. parahaemolyticus*. (A) El hepatopáncreas del grupo de control positivo mostró un desprendimiento masivo de células epiteliales del túbulo hepatopancreático y no mostró células B ni R. (B) Se observó que el hepatopáncreas de los camarones alimentados con una dieta de 0,25 o 0,5 por ciento de arcilla, respectivamente, tenía menos daño y mostraba una estructura casi normal. Barras de escala = 50 µm.

Microbiota estomacal

Fig. 4: Gráfica de diversidad alfa (índice de Simpson) de cada muestra del control negativo (negCON), control positivo (posCON), 0,25 por ciento de Calibrin®-Z (0,25 por ciento CL) y 0,50 por ciento de Calibrin®-Z (0,50 por ciento CL) de los grupos experimentales.

El índice de Simpson del gráfico de diversidad alfa mide la riqueza (número de variantes de secuencia de amplicón, ASV) y la uniformidad de ASV que componen la riqueza de la muestra. Un índice de Simpson alto indica un alto número de ASV y proporciones más similares de ASV. Cuando se desafió con VP_{AHPND} , se observó que la diversidad bacteriana en el grupo posCON estaba deprimida en comparación con los camarones sanos no desafiados en el grupo negCON. Complementar las dietas de los camarones con 0,25 por ciento de CL tendió a restaurar la riqueza bacteriana del estómago y el índice de diversidad mucho más que el grupo con 0,5 por ciento de CL.

A nivel de filo, la estructura de la comunidad bacteriana del estómago del camarón consistió principalmente en Proteobacteria y Bacteroidetes con Verrucomicrobia en un distante tercer lugar en abundancia relativa. La abundancia acumulada de estos tres filos fue superior al 90 por ciento en todos los grupos de tratamiento. El grupo posCON había aumentado la abundancia relativa de Proteobacteria y disminuido la abundancia relativa de Tenericutes en comparación con el grupo negCON. Se observó una mayor abundancia relativa de Verrucomicrobia y Actinobacteria en el estómago de camarones alimentados con dietas suplementadas con CL. En el grupo de tratamiento con CL al 0,5 por ciento, se observó una abundancia ligeramente mayor de Firmicutes.

El potencial de las arcillas montmorillonitas

El uso de montmorillonita como ingrediente en alimentos para ganado generalmente ha reportado resultados beneficiosos. Actualmente hay muy poca información disponible sobre el impacto de la montmorillonita en la dieta sobre el crecimiento de los animales acuáticos. Aparte de las diferencias específicas de las especies, las discrepancias entre varias investigaciones publicadas sobre los efectos de la montmorillonita en el rendimiento del crecimiento de los animales acuáticos probablemente se deban a la fuente y el tipo de montmorillonita utilizada. La pureza, la composición química y las propiedades funcionales de la montmorillonita natural dependen en gran medida del lugar donde se extrajo el mineral arcilloso. Calibrin[®]-Z es único en su ubicación de extracción y procesamiento, por lo que es posible que no sea posible extrapolar sus efectos positivos, como se observa en el presente estudio, a todas las montmorillonitas.

Fig. 5: Abundancia relativa media del filo bacteriano en diferentes grupos de tratamiento [control negativo (negCON), control positivo (posCON), 0,25 por ciento de Calibrin®-Z (0,25 por ciento CL) y 0,50 por ciento de Calibrin®-Z (0,50 por ciento CL)]. Cada filo bacteriano se representa con un color diferente en el gráfico de barras. La proporción combinada totaliza 1 para cada grupo de tratamiento. Los resultados del ensayo de crecimiento que llevamos a cabo mostraron que la suplementación con CL en los alimentos para camarones blancos no tuvo un impacto significativo en el rendimiento del crecimiento. La adición de montmorillonita en la forma del producto comercial CL hasta el 0,5 por ciento de la dieta no causó ningún problema de toxicidad o palatabilidad del alimento, como lo demuestra la alta supervivencia de los camarones y el excelente consumo de alimento y FCR observados.

Cuando se desafiaron con VP_{AHPND} , la supervivencia de los camarones alimentados con 0,25 por ciento o 0,5 por ciento de CL fue alta (83 a 94 por ciento) y no fue significativamente diferente en comparación con el grupo de control negativo no desafiado. Este resultado sugiere que la montmorillonita en la dieta pudo proteger a los camarones de la mortalidad causada por las toxinas bacterianas liberadas por VP_{AHPND} .

Creemos que el principal modo de acción de la montmorillonita para mitigar la AHPND es a través de la adsorción de las toxinas binarias PirAB de la AHPND en sus superficies y capas intermedias. Las toxinas bacterianas pueden migrar a través de poros interconectados y canales capilares hacia sitios de unión internos. Varios sitios con carga positiva en la estructura de la montmorillonita, como los cationes de la capa intermedia y los bordes de las unidades octaédricas, proporcionan los sitios de adsorción. Las lepisferas de ópalo naturales ayudan a mantener las estructuras de láminas en capas de CL y contribuyen a la alta capacidad de unión.

Las fuerzas de unión por adsorción en las superficies de arcilla incluyen interacciones hidrofóbicas, quelación, enlaces de hidrógeno, atracciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals. En el presente estudio, creíamos que las toxinas bacterianas adsorbidas por la montmorillonita no estaban disponibles para la absorción en el intestino del camarón y finalmente se expulsaron del cuerpo a través de la excreción fecal. Además, el examen histopatológico del hepatopáncreas, el objetivo principal de las toxinas PirAB, confirmó que los camarones alimentados con dietas con montmorillonita añadida mostraron muy poco daño en comparación con los camarones desafiados con AHPND alimentados con la dieta de control sin montmorillonita añadida. Esto mostró que poca o ninguna toxina PirAB migró al hepatopáncreas para causar daño tisular, ya que las toxinas adsorbidas por MMT probablemente se movieron a lo largo del intestino lejos del hepatopáncreas por peristalsis y finalmente se excretaron a través de la materia fecal.

El presente estudio es el primer informe sobre la modulación de la microbiota del estómago del camarón por la montmorillonita en la dieta durante una infección por enfermedad. Se observó que la adición de montmorillonita en la dieta del camarón blanco aumenta la diversidad de la microbiota, especialmente en el grupo de 0,25 por ciento de CL. La AHPND redujo notablemente la diversidad microbiana del estómago de los camarones infectados en comparación con los camarones sanos.

Actualmente no hay mucha información disponible sobre los cambios en la microbiota estomacal en respuesta a AHPND, pero en general, se sabe que una mayor diversidad de bacterias intestinales refleja una mejor salud intestinal y la consiguiente salud animal.

A nivel de filo, identificamos Proteobacteria y Bacteroidetes como los grupos principales. Observamos que bajo la infección por AHPND, la abundancia relativa de Proteobacteria aumentó en comparación con los camarones no desafiados. Identificamos bacterias del género *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum* y *Marinimicrobium* como miembros del microbioma sano y *Lysobacter* como relativamente ricas en el estómago de los camarones infectados con AHPND. Quedan por dilucidar las funciones reales que desempeñan estos cambios en la comunidad bacteriana.

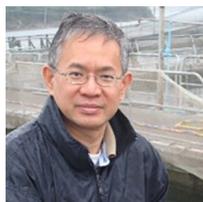
Los camarones alimentados con 0,25 por ciento de CL mostraron la mayor abundancia relativa de Verrucomicrobia y Actinobacteria, seguidos por el grupo de 0,5 por ciento de CL. La abundancia relativa de Firmicutes fue más frecuente en el grupo de 0,5 por ciento de CL en comparación con otros grupos de tratamiento. Se puede obtener una descripción completa de los resultados de la microbiota estomacal en la publicación original. Aparte de la capacidad de la montmorillonita para unirse a la toxina PirAB y mitigar la disbiosis estomacal infligida por AHPND, la capacidad de la montmorillonita dietética para modular la microbiota estomacal también podría deberse a la capacidad de la montmorillonita para adsorber e inmovilizar bacterias selectivamente en sus superficies y capas intermedias, lo que da lugar a diferentes perfiles bacterianos observados en este estudio.

Perspectivas

En conclusión, la montmorillonita dietética puede usarse como una alternativa a los antibióticos para la mitigación y prevención de la pandemia de AHPND en la acuicultura del camarón. Proporciona una solución natural a un problema crítico actual en la sostenibilidad del cultivo de camarones. En el presente estudio, intencionalmente usamos tamaños de camarones que se sabe que son más vulnerables a AHPND en el ciclo de producción. Con base en los resultados de laboratorio, sugerimos que se agregue CL en niveles dietéticos de al menos 0,25 por ciento en los alimentos comerciales para camarones como una “póliza de seguro” y una medida preventiva contra pérdidas económicas y de producción por posibles brotes de AHPND en granjas camaroneras. Se justifican más estudios de campo a más largo plazo para dilucidar completamente el impacto beneficioso de la montmorillonita en los alimentos para animales acuáticos de granja.

Referencias disponibles del autor.

Author



WING-KEONG NG, PH.D., FASC

Corresponding author

Retired Professor of Aquaculture Nutrition, School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia; and Asian Aquafeeds Services, Penang, Malaysia

wkng.usm@gmail.com (<mailto:wkng.usm@gmail.com>)

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.