



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

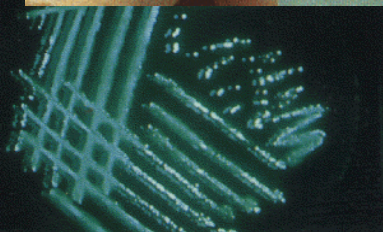


BIOTECNOLOGIA APLICADA A LA ACUACULTURA



Universidad de Nariño
30 de septiembre del 2004

Emmerik Motte, Ph.D.



¿Qué entendemos por “Biotecnología”?



La **Biotecnología** → **conjunto amplio de tecnologías** en las cuales se utilizan componentes biológicos, ya sea organismos vivos o parte de estos, para generar productos, procesos o servicios.

Ejemplos:

- **Producto:** cultivo resistente a enfermedades causadas por virus.
- **Proceso:** producción de proteínas recombinante.
- **Servicio:** utilización de ciertas especies de bacterias con propiedades “probióticas” para el mejoramiento de los cultivos (biocontrol, bioremediación ...).

¿Qué es la biotecnología?



Desde un punto de vista amplio, la Biotecnología corresponde a « la producción de productos comerciales generados por la acción metabólica de microorganismos ».

Def. del Convenio sobre la Biodiversidad Biológica (CDB):

“toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”.

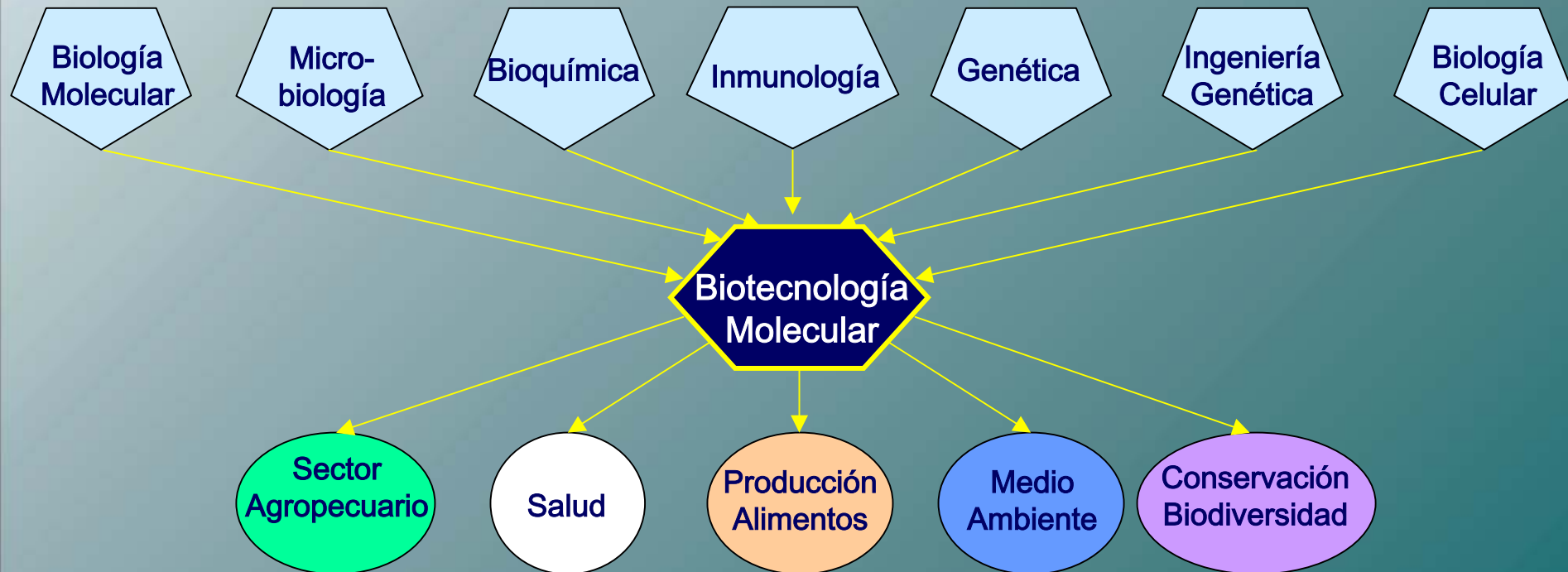
La naturaleza de la Biotecnología ha cambiado con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante.

La ingeniería genética facilitó los medios para crear o al menos aislar, cepas de alto rendimiento productivo. Los microorganismos y células eucariotas pueden ser utilizadas como « industrias biológicas ».

La Biotecnología Molecular



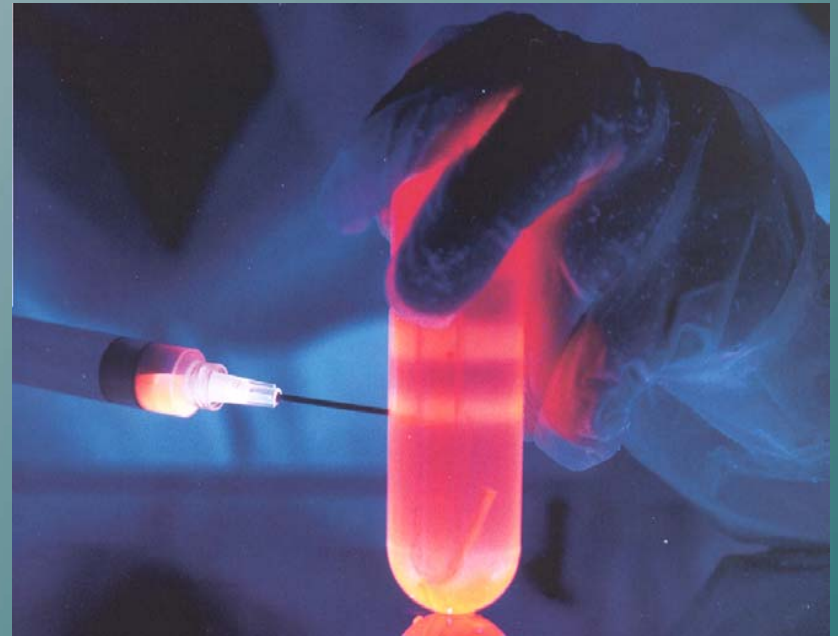
La unión de la **tecnología del ADN recombinante** con la **biotecnología tradicional** ha resultado en un campo altamente competitivo de estudio, que hoy conocemos como la **Biotecnología Moderna o Molecular**.



¿Qué es la Biotecnología Molecular?



La Biotecnología Molecular se basa en la habilidad de los investigadores para aislar, manipular, transferir unidades de información genética de un organismo a otro, utilizando **las técnicas de la ingeniería genética**, y con el objetivo de producir un producto útil o proceso comercial.



A comienzos de los años 70 se creó la capacidad de manipular el material genético (ADN) en el laboratorio de forma tal de unir segmentos provenientes de distintos organismos, obteniéndose moléculas recombinantes.

Organismos procariotas y eucariotas utilizados en procesos biotecnológicos:



Bacterias	Levaduras	Células eucariotas en cultivo
<p><i>Acremonium chrysogenum</i> <i>Bacillus brevis</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. thuringiensis</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Erwinia herbicola</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Nitrobacter spp.</i> <i>Nitrosomonas spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Rhizobium spp.</i> <i>Streptomyces spp.</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Xanthomonas campestris</i> <i>Zymomonas mobilis</i></p>	<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>Hansenula polymorpha</i> <i>S. pombe</i></p>	<p>Células de insectos Plantas Células mamíferas Invertebrados marinos Vertebrados marinos</p>

Clasificación de los microorganismos según su temperatura de proliferación

Psicrófilos	-5 a 20 °C
Psicrótrofos	-5 a 35 °C
Mesófilos	10 a 47 °C
Termófilos	45 a >90°C

Campo de desarrollo de la biotecnología marina



- ❑ **Alimentación** (gelificantes, espesantes, oligoelementos) , combatir la desnutrición.
- ❑ **Productos industriales**
 - quitina (de crustaceos) para mejorar la resistencia del papel, remover tóxicos de aguas sucias, producción de geles, películas, fibras etc....
- ❑ **Alimentos** para la producción animal y acuicultura
- ❑ **Tratamientos médicos**
 - organismos acuáticos son estudiados para curar desordenes neurológicos (Alzheimer & Parkinson), buscar moléculas terapéuticas....
 - adhesivos naturales para unión de huesos rotos
- ❑ **Tratamientos de desechos** : bioremediación, biodegradación
 - microorganismos (bacterias)
 - plantas adaptadas a ambientes como humedales, y ambientes salinos.
 - desarrollo de detectores de contaminación
- ❑ **Industria farmacéutica**
 - químicos (esponja del Pacífico) utilizados como anti-inflamatorios o contra el cáncer
 - antibióticos
- ❑ **Industria cosmética** (algas marinas)
- ❑ **Producción acuícola**
 - selección genética por hibridación o manipulación genética (reproducción, crecimiento, resistencia a enfermedades)
- ❑ **Agricultura**
 - transferencia de genes de resistencia a ambientes salinos
 - pesticidas
 - lucha contra enfermedades y plagas

La Biotecnología y la Acuicultura



❑ La “Acuicultura” es el **cultivo de organismos acuáticos** en ambientes controlados.

❑ La demanda creciente de alimentos del mar combinada con una relativa baja oferta de productos acuícolas, llevo a los científicos y las industrias a encontrar vías en que **la Biotecnología Marina pueda incrementar la producción de productos del mar para la alimentación.**

❑ El uso de técnicas de **biotecnología**, incluyendo la **tecnología molecular** y del **ADN recombinante**, permite a los científicos de la acuicultura **estudiar las bases biológicas y moleculares:**

- del crecimiento y desarrollo de los organismos acuáticos,
- de la resistencia a enfermedades o a condiciones ambientales adversas,
- del sistema inmunitario,
- para el mejoramiento de la productividad y el mejoramiento genético.

❑ **La biotecnología** también busca soluciones **para mejorar la productividad** a través del desarrollo:

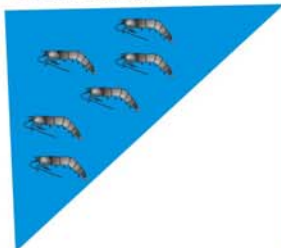
- de técnicas de diagnóstico moleculares,
- de nuevos aditivos alimenticios empleados en la actividad acuícola,
- de vacunas,
- de agentes terapéuticos

La Biotecnología y la Acuacultura



PREVENCIÓN Y ERRADICACIÓN DE VIROSIS PARA LA SUSTENTABILIDAD ECONÓMICA Y ECOLÓGICA DEL CULTIVO DE CAMARÓN

Repoblación del stock natural



CERTIFICACIÓN

DOMESTICACIÓN



Probióticos/
Diagnóstico

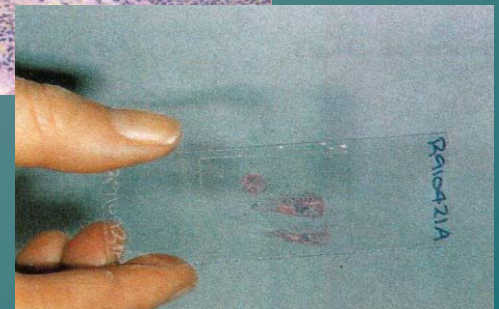
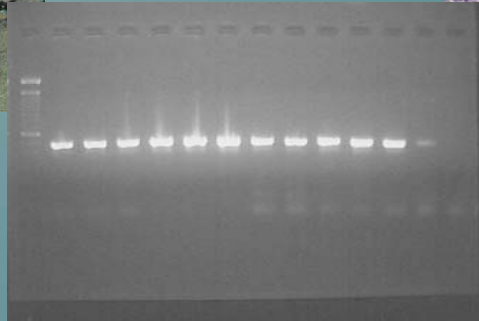
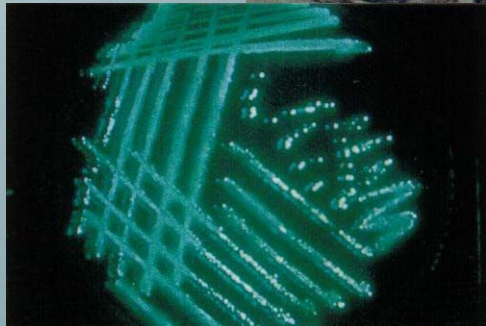
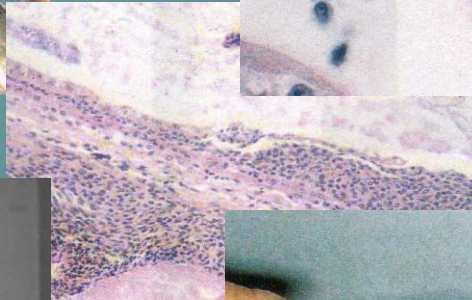
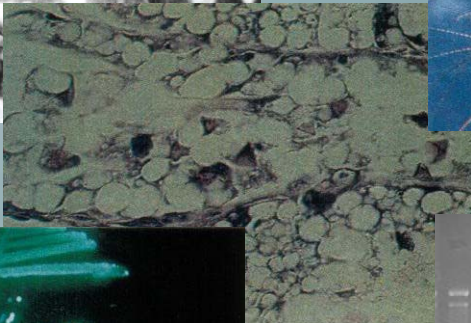
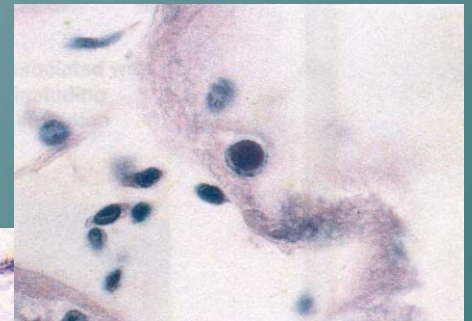
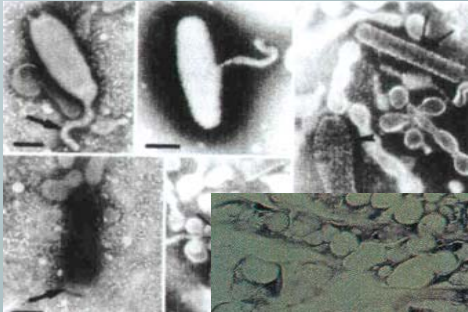
~~ENFERMEDADES~~

PROGRAMA DE SELECCIÓN Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

Salud y prevención de enfermedades

DIAGNÓSTICO

- ❑ El uso de técnicas de diagnóstico por los acuacultores es indispensable para llevar un manejo adecuado de la producción y asegurar así una buena productividad.
- ❑ La alta **especificidad** de los **diagnósticos moleculares**, los vuelven más **rápidos**, **confiables** y **sensibles** que las técnicas de diagnóstico tradicionales.



Salud y prevención de enfermedades

Principales agentes patógenos virales del camarón



PARVOVIRIDAE



ADNss

IHHNV

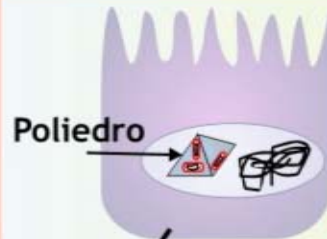
(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus)

Tamaño: 22 nm Genoma: 4.1 Kbp

HPV

(Hepatopancreatic Parvo-like Virus)

Tamaño: 22 nm Genoma: 5 Kbp



Poliedro

Tamaño (virión): 300 nm - **BP** (Baculovirus penaei)
Genoma: 120 Kbp

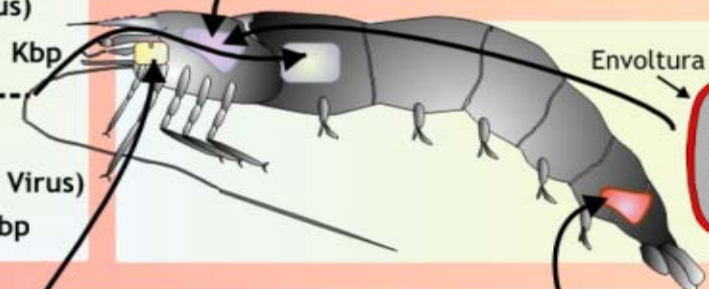
BACULOVIRIDAE

- **MBV** (Monodon BaculoVirus)



ADN

Nucleocápside



Envoltura

NO CLASIFICADO

WSSV (White Spot Syndrome Virus)

Tamaño (virión): 350 x 144 nm

Genoma: 292 Kbp

ADNds

YHV

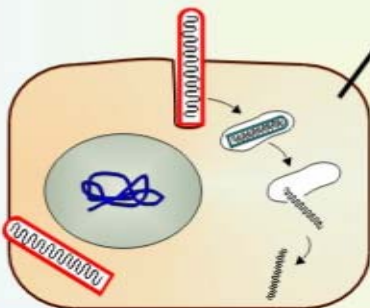
Yellow Head Virus

RHABDOVIRIDAE

ARNss

Tamaño: 150x50 nm

Genoma: 22 Kbp



PICORNAVIRIDAE

TSV

(Taura Syndrome Virus)

ARNss

Genoma: 9 Kbp

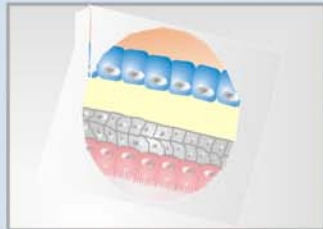
Tamaño: 30 nm



Salud y prevención de enfermedades



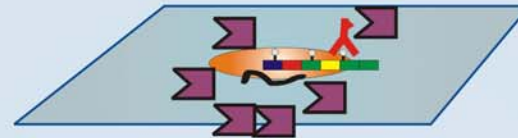
Diagnóstico de Virus Ventajas e inconvenientes



Corte histológico

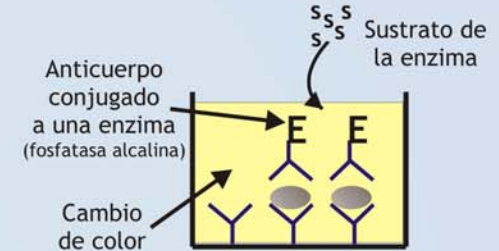
- (-): Sensibilidad
- (-): Especificidad
- (-): Tiempo

Histología



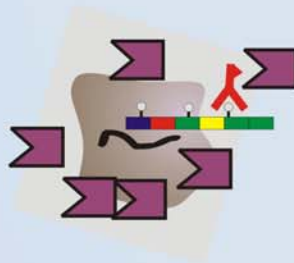
- (-): Sensibilidad
- (-): Especificidad
- (-): Costo del equipo

Hibridación *in situ*



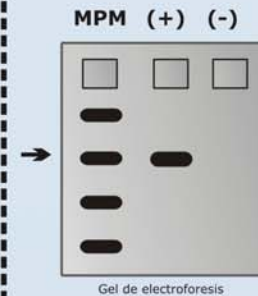
- (-): Fosfatasa endógena
- (-): Especificidad

Inmunoensayo



- (+): Sensibilidad
- (+): Especificidad

Sonda nucleica



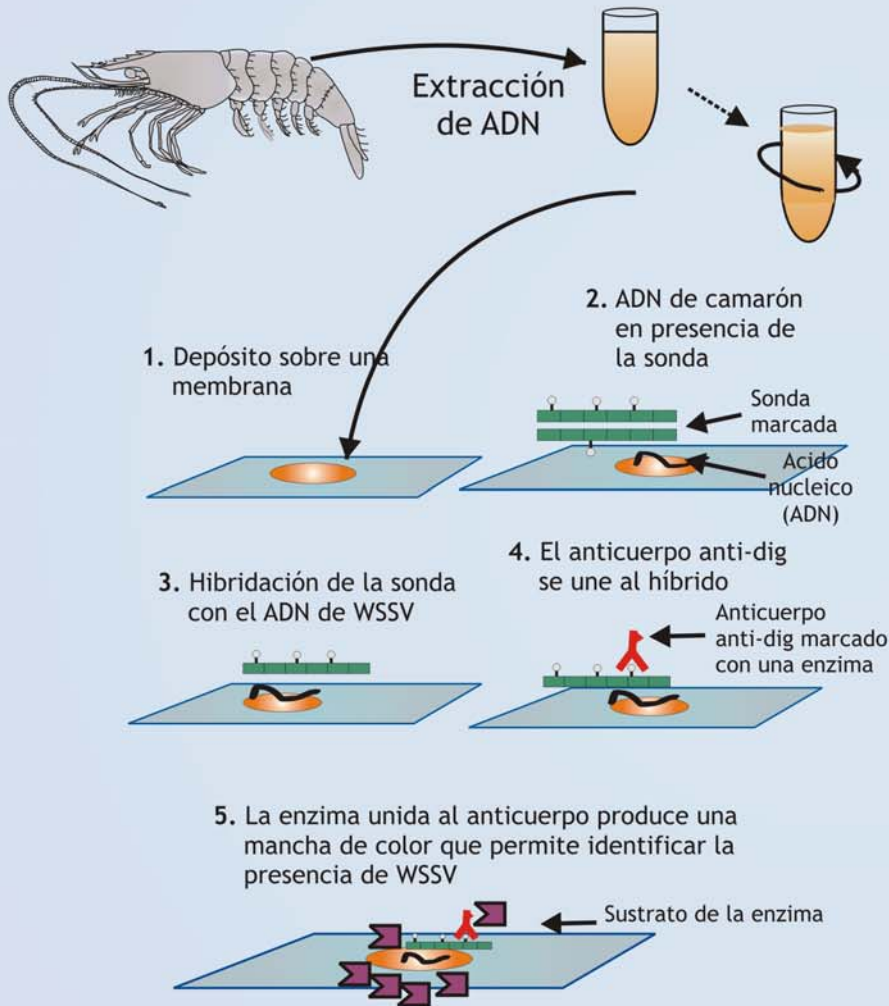
- (++): Sensibilidad
- (++): Especificidad
- (++): Rapidez

PCR

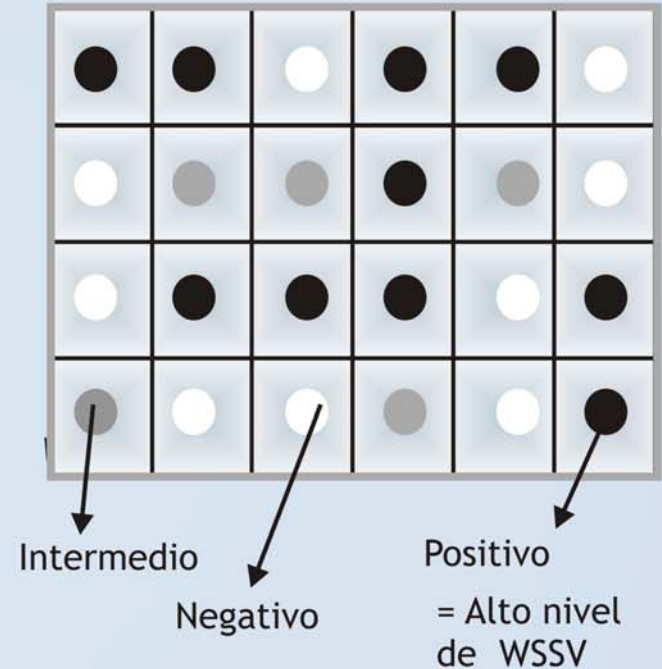
Salud y prevención de enfermedades



Dot-Blot



Resultado



Salud y prevención de enfermedades



Hibridacion *in situ*

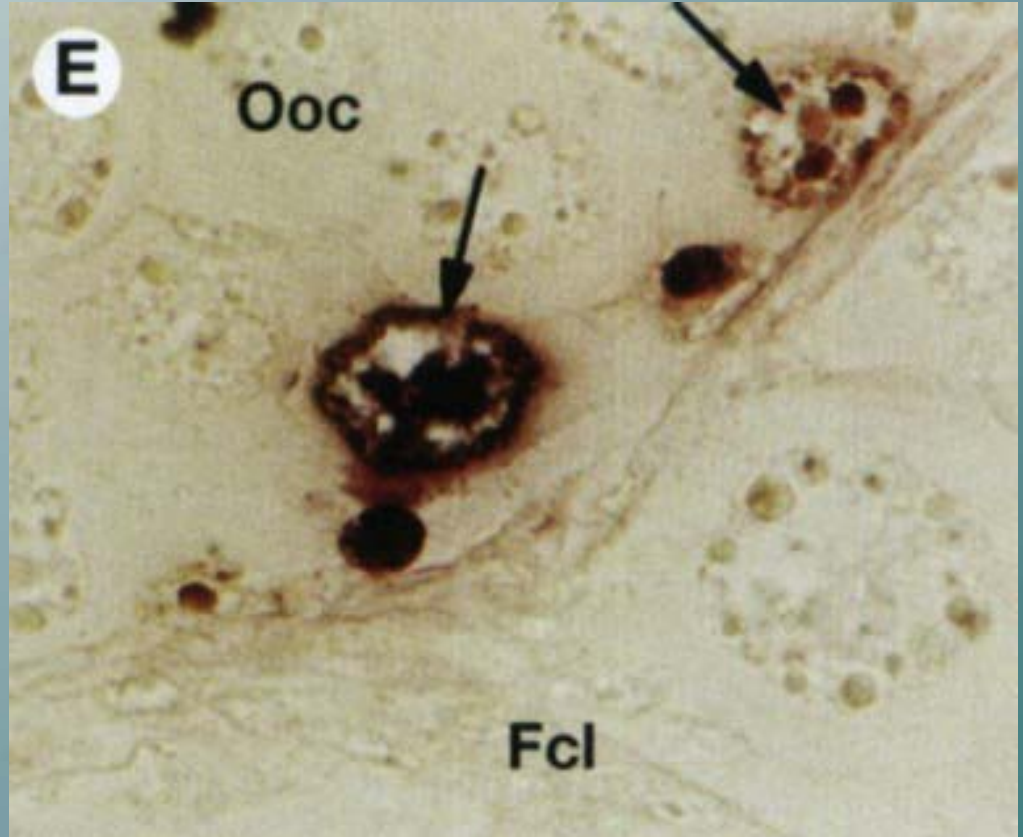


Foto de un ovocito contaminado con WSSV
identificado con hibridación *in situ*

(Tomado de Lo *et al*, 1997).

Salud y prevención de enfermedades

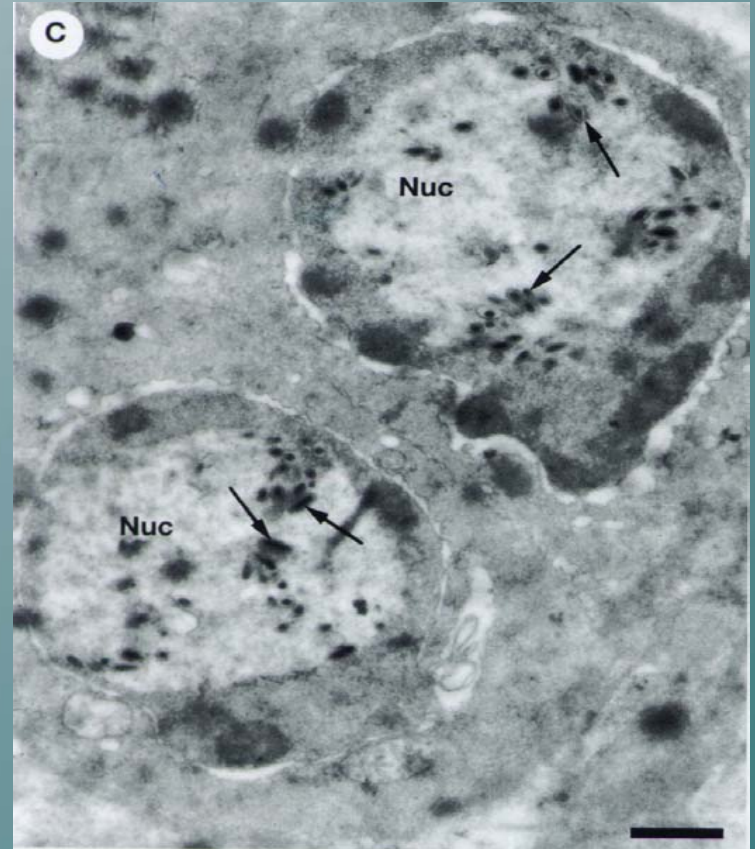
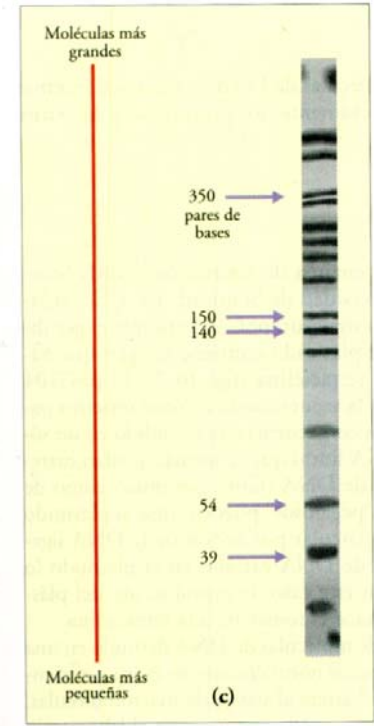
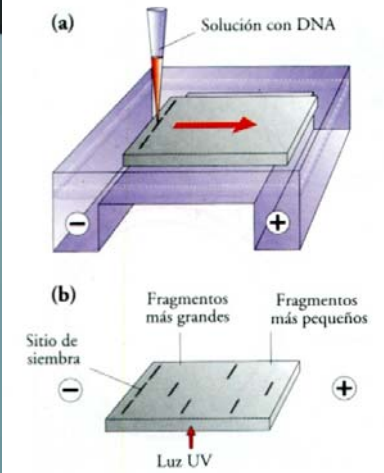
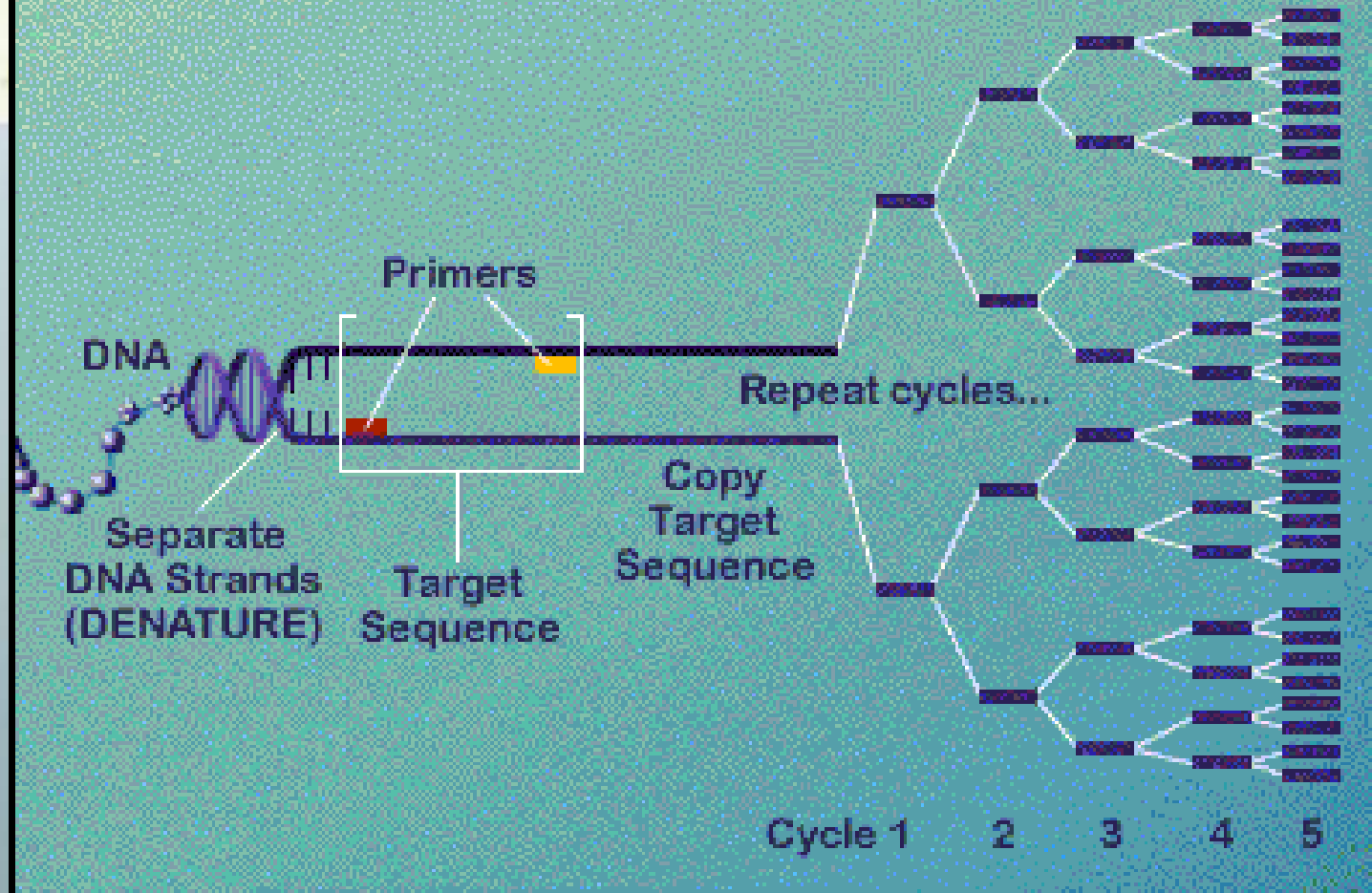


Foto de microscopía electrónica de un ovocito infectado con WSSV
(Tomado de Lo *et al*, 1997)

Salud y prevención de enfermedades

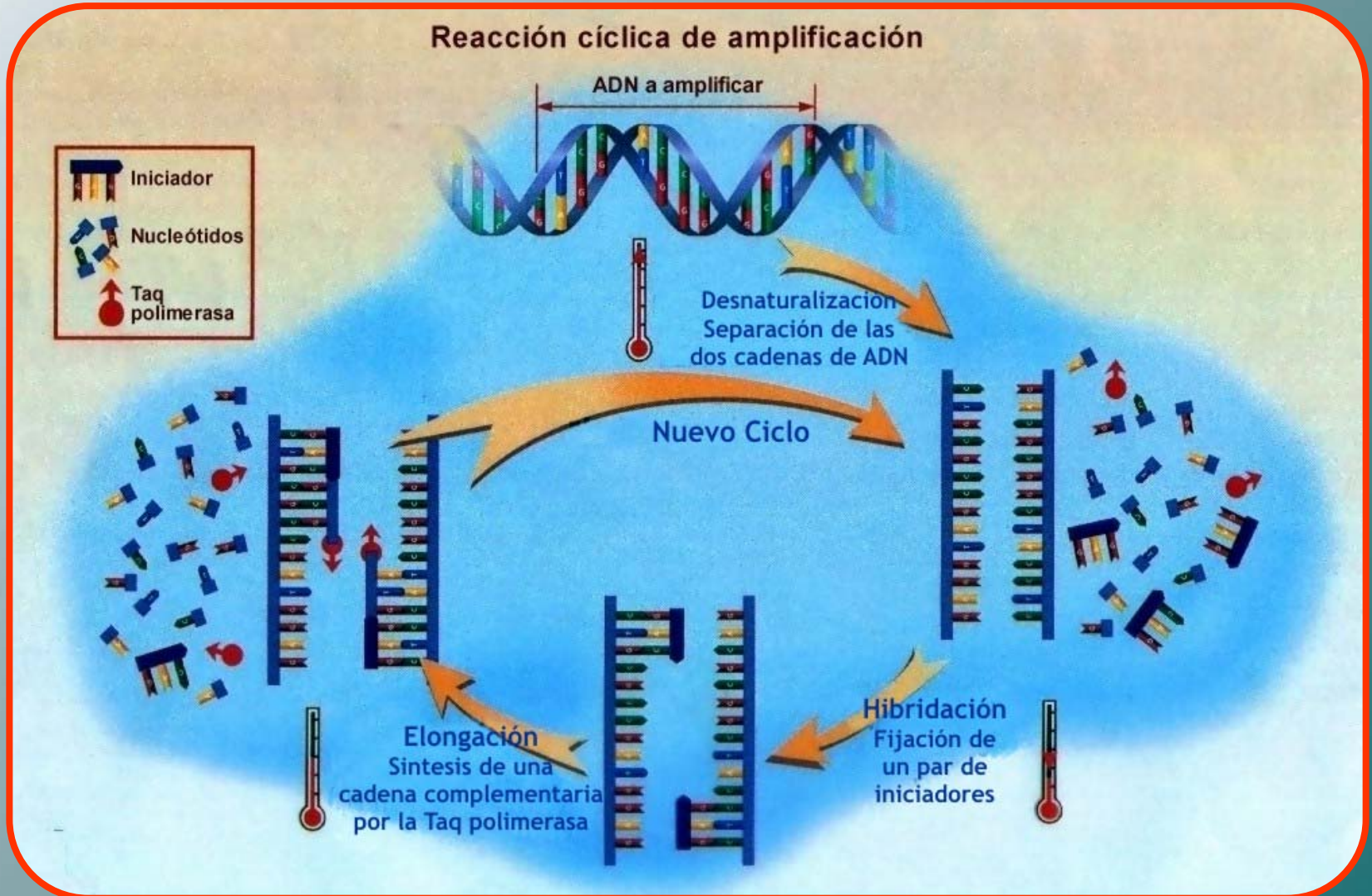
Reacción en Cadena de la Polimerasa : PCR

Polymerase Chain Reaction: PCR

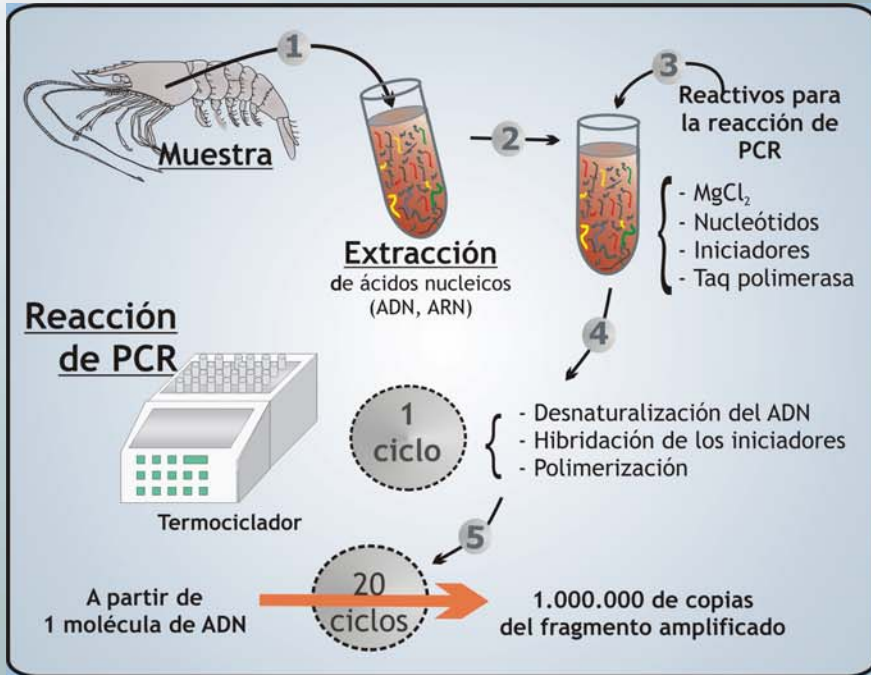


Salud y prevención de enfermedades

Reacción en Cadena de la Polimerasa : PCR

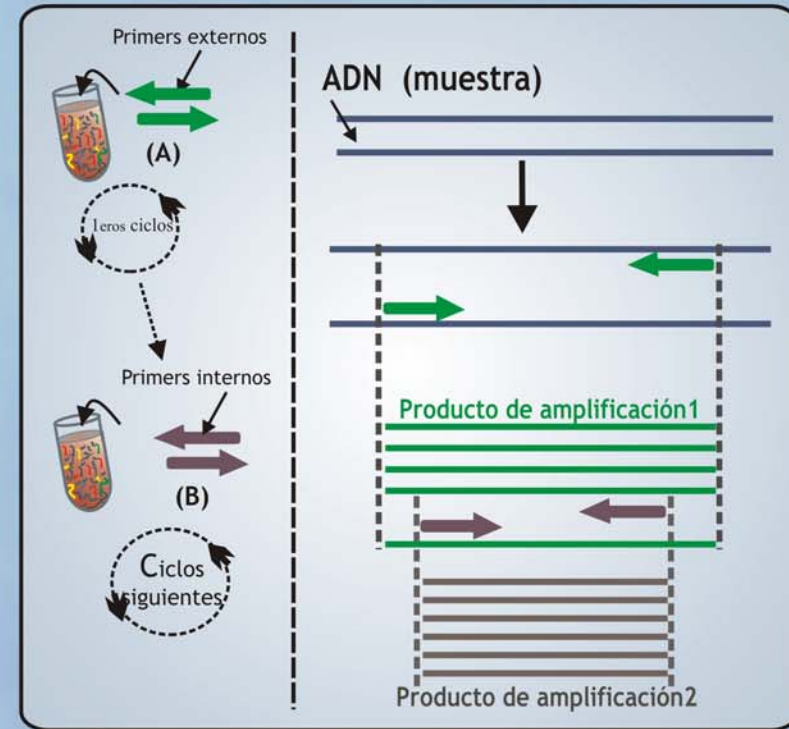


Salud y prevención de enfermedades

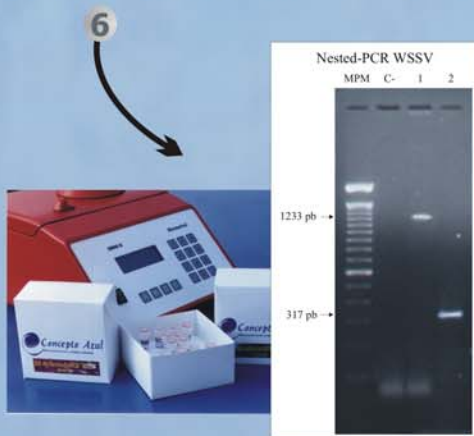


Técnica de nested-PCR

(Polymerase Chain Reaction)
(Reacción en cadena de la polimerasa)



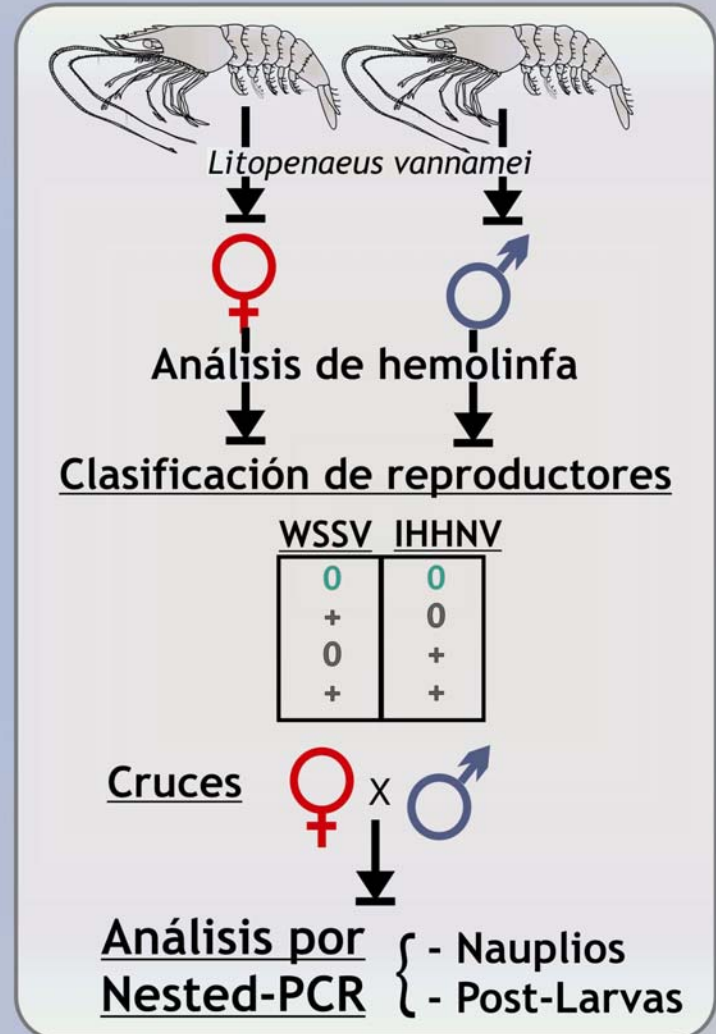
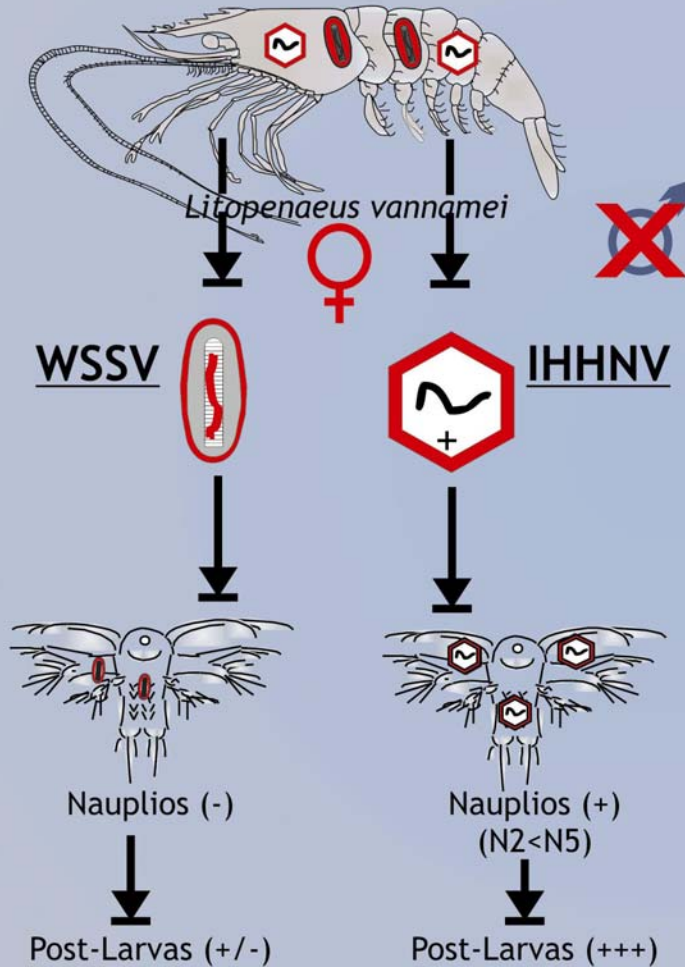
Observación del análisis en un gel de electroforesis



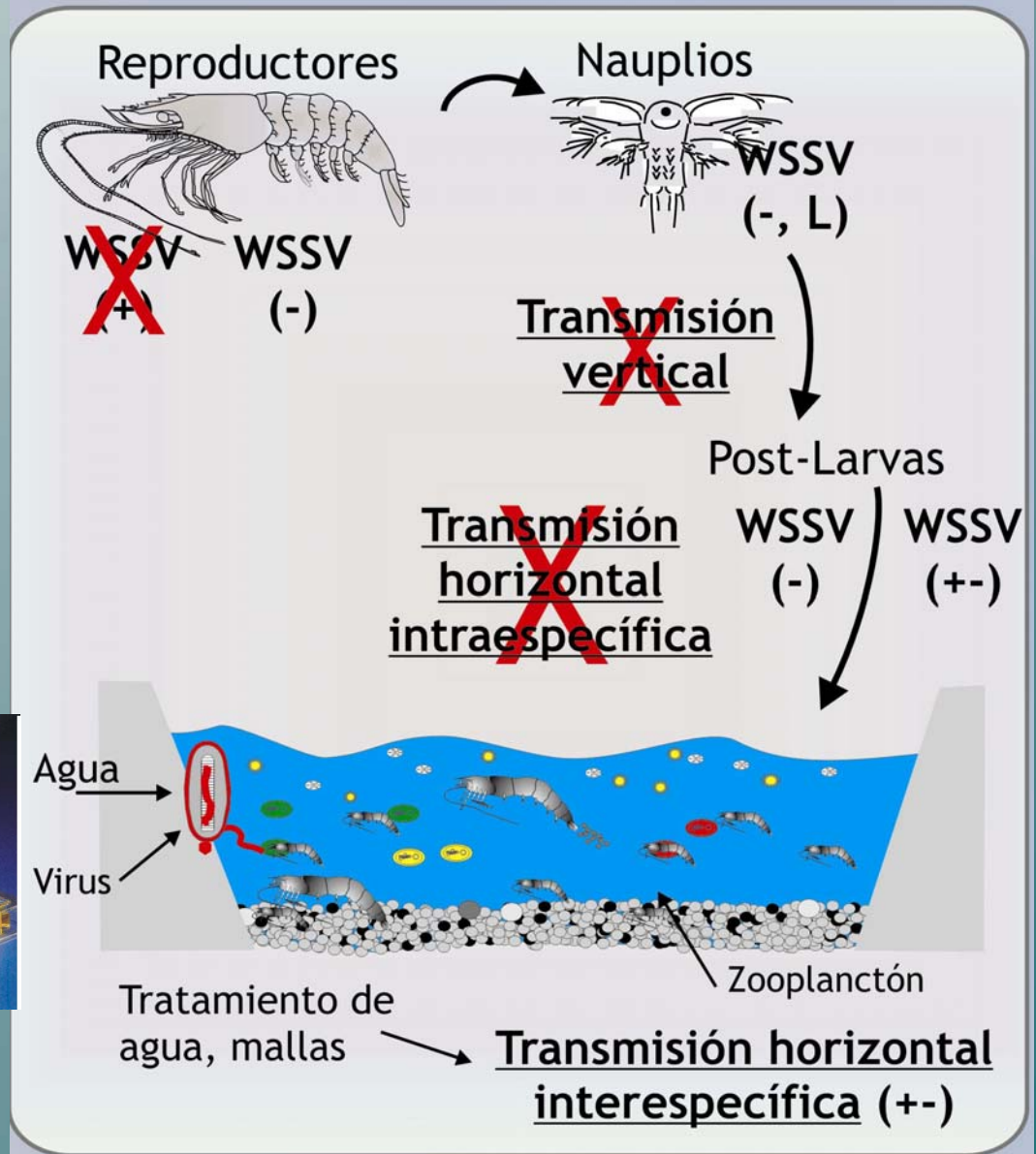
MPM: Marcador de Peso Molecular 1kpb
C-: Control negativo
Línea 1: Producto amplificado en la 1^{ra} reacción de la Nested-PCR
Línea 2: Producto amplificado en la 2^{da} reacción de la Nested-PCR

Salud y prevención de enfermedades

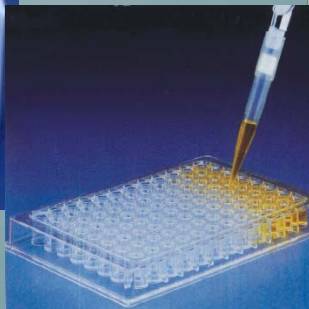
Clasificación y Certificación de reproductores



Salud y prevención de enfermedades



La biotecnología y el desarrollo de kits



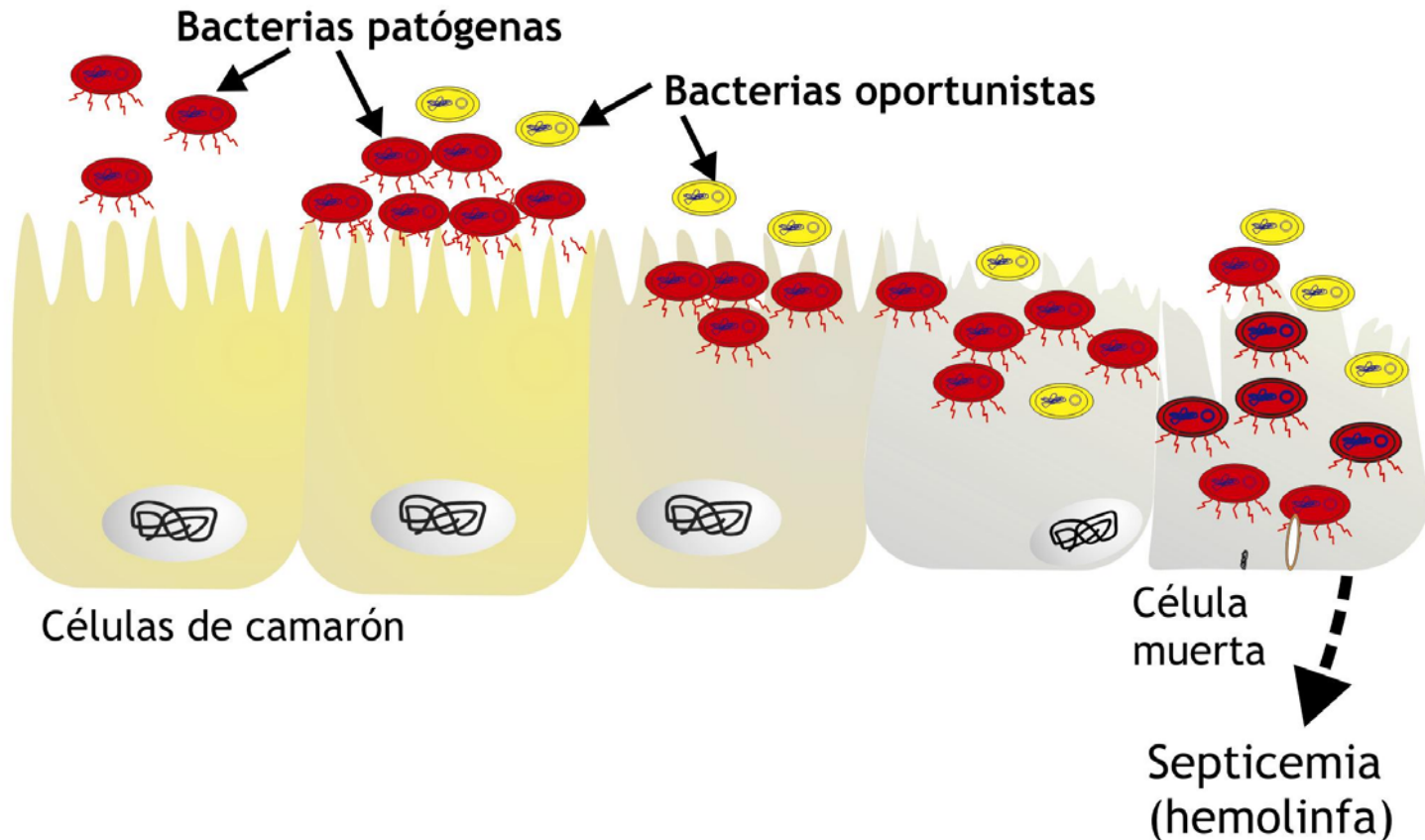
-kits de PCR

-Sondas oligonucleicas

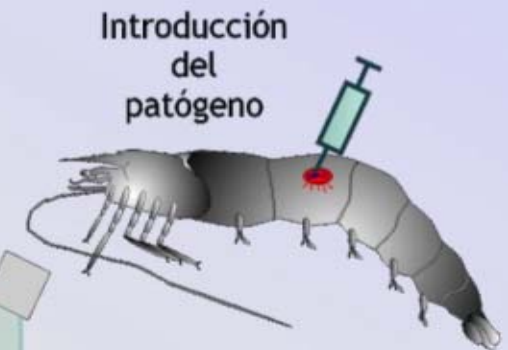
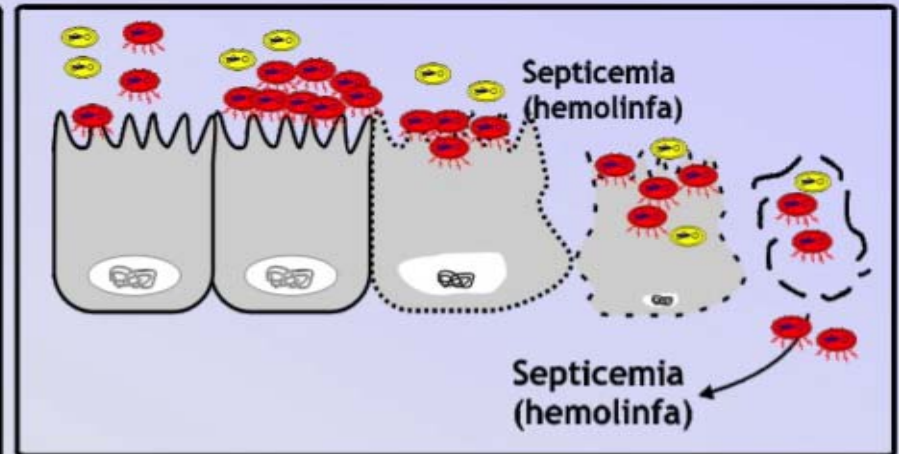
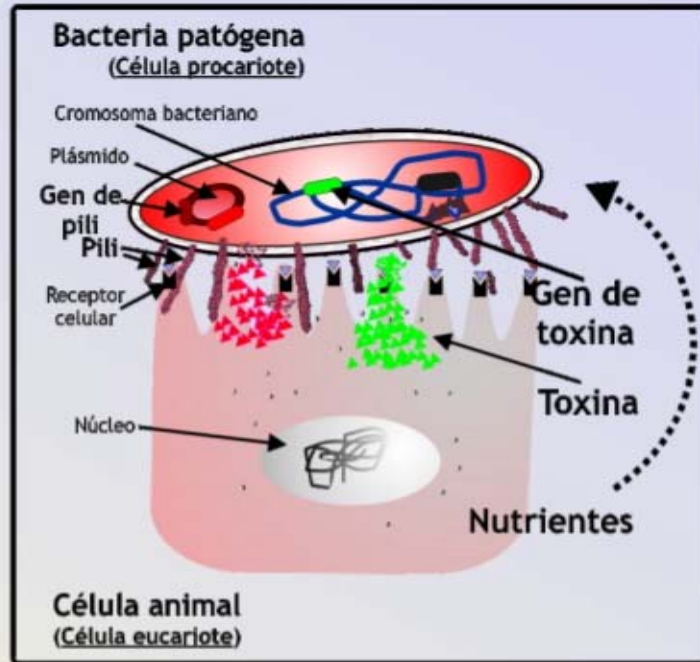
-Sistemas miniaturizados



Bacterias extracelulares

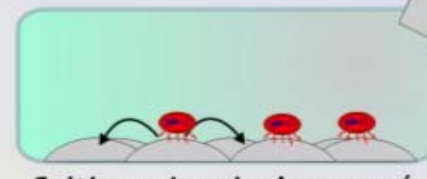


Factores tóxicos de bacterias patógenas de camarón



Línea celular de carpa

No hay efecto



Cultivo primario de camarón

Demostración de efectos patológicos

¿Cómo luchar contra bacterias patógenas?

Diagnóstico: detección, identificación, caracterización
> Detectar la presencia de bacterias patógenas

¿Cuándo realizar el diagnóstico?

- A los nauplios provenientes de la naupliera
- A la postlarva proveniente del laboratorio
- En la larvicultura durante la fase de cultivo en alga, artemia, reservorio
- En la camaronera, reservorio

¿Cómo?

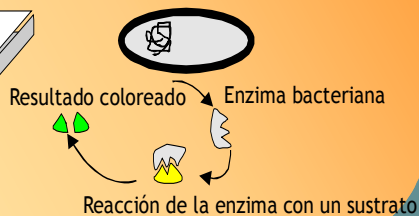
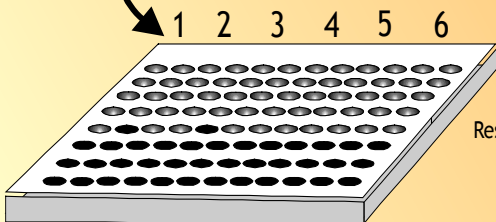
Aislamiento:

- "TCBS" medio muy selectivo
- Agar marino
- Medios con extractos de camarón

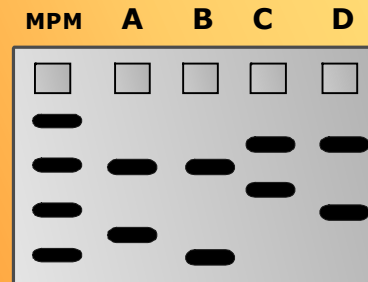
Histología:

- En especial para las Rickettsias pues éstas no se pueden cultivar
- Lesiones en los tejidos y septicemias

Identificación bioquímica:

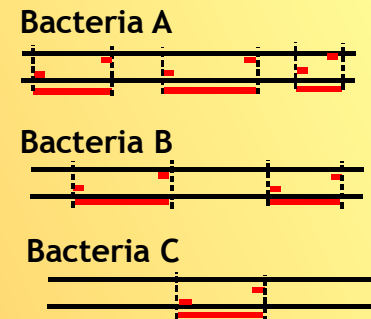


Perfil genético: (RAPD)



Gel de electroforesis

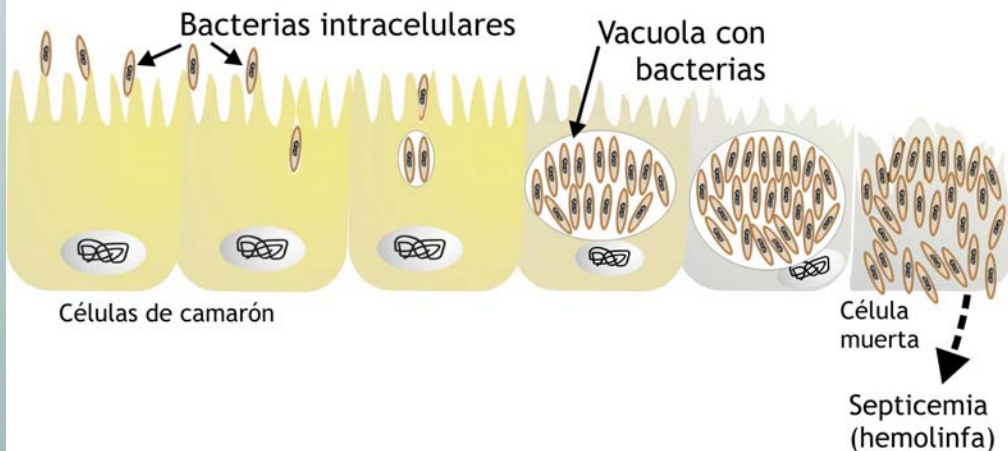
ADN bacteriano



Salud y prevención de enfermedades

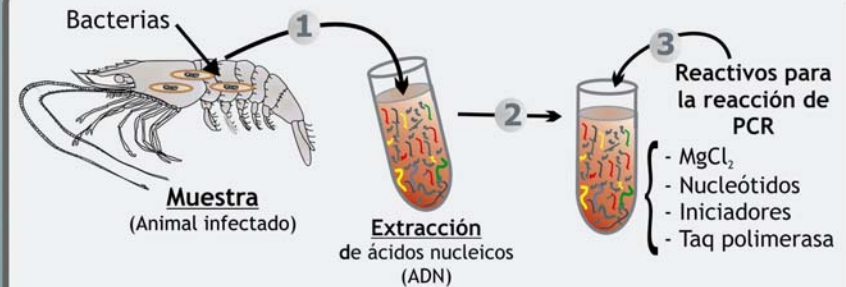


Bacterias intracelulares



Técnica de PCR

Reacción en cadena de la polimerasa
(Polymerase Chain Reaction)



4 Pasos de la reacción de PCR



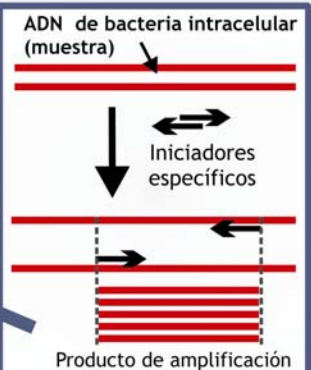
- Desnaturalización del ADN
- Hibridación de los iniciadores
- Polimerización

A partir de 1 molécula de ADN $\xrightarrow{20 \text{ ciclos}}$ 1.000.000 de copias del fragmento amplificado

5 Observación del análisis en un gel de electroforesis

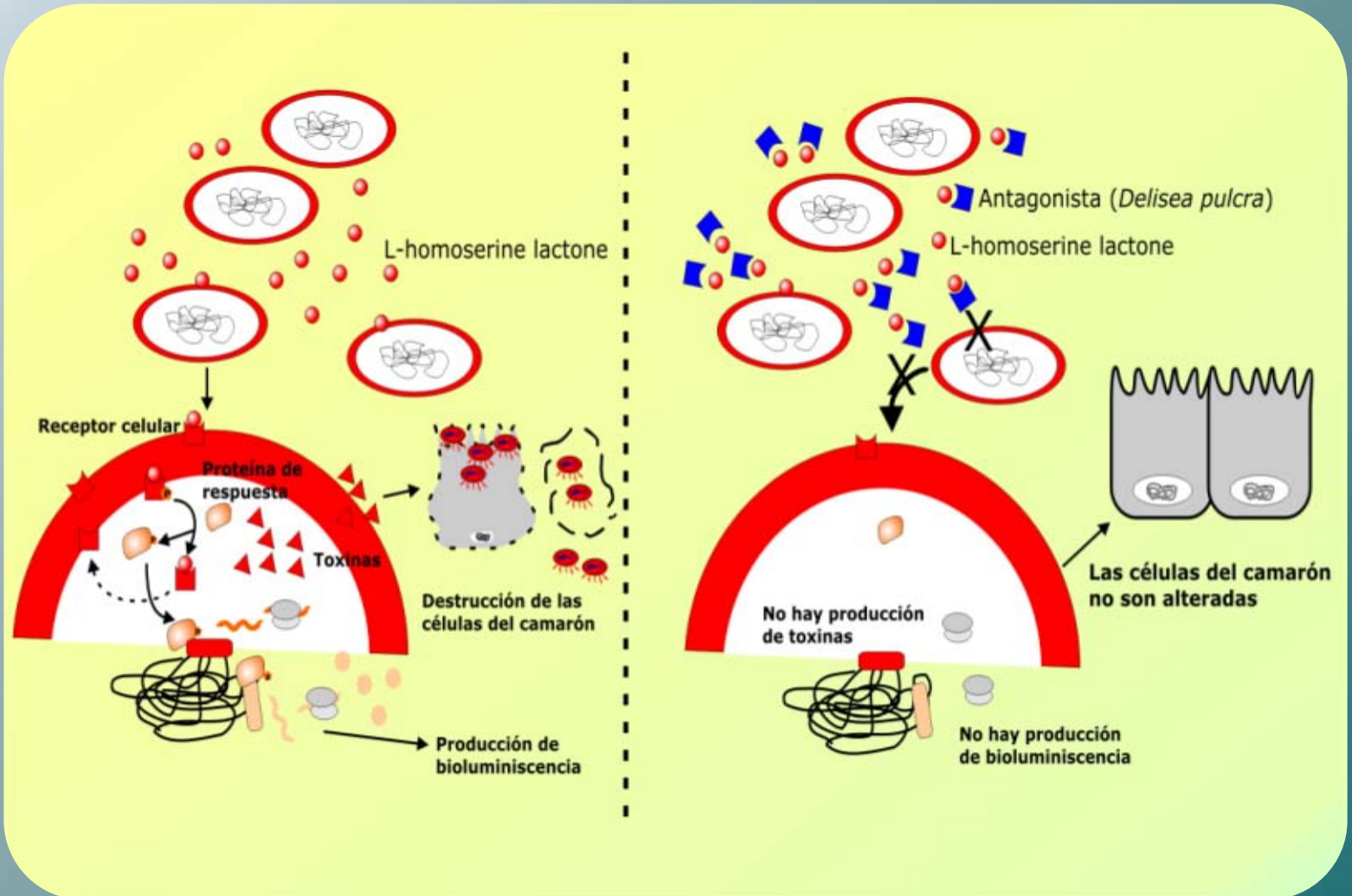


Gel de electroforesis



Salud y prevención de enfermedades

Inhibición de la luminiscencia y virulencia en *V. harveyi* por antagonistas de la señal intracelular

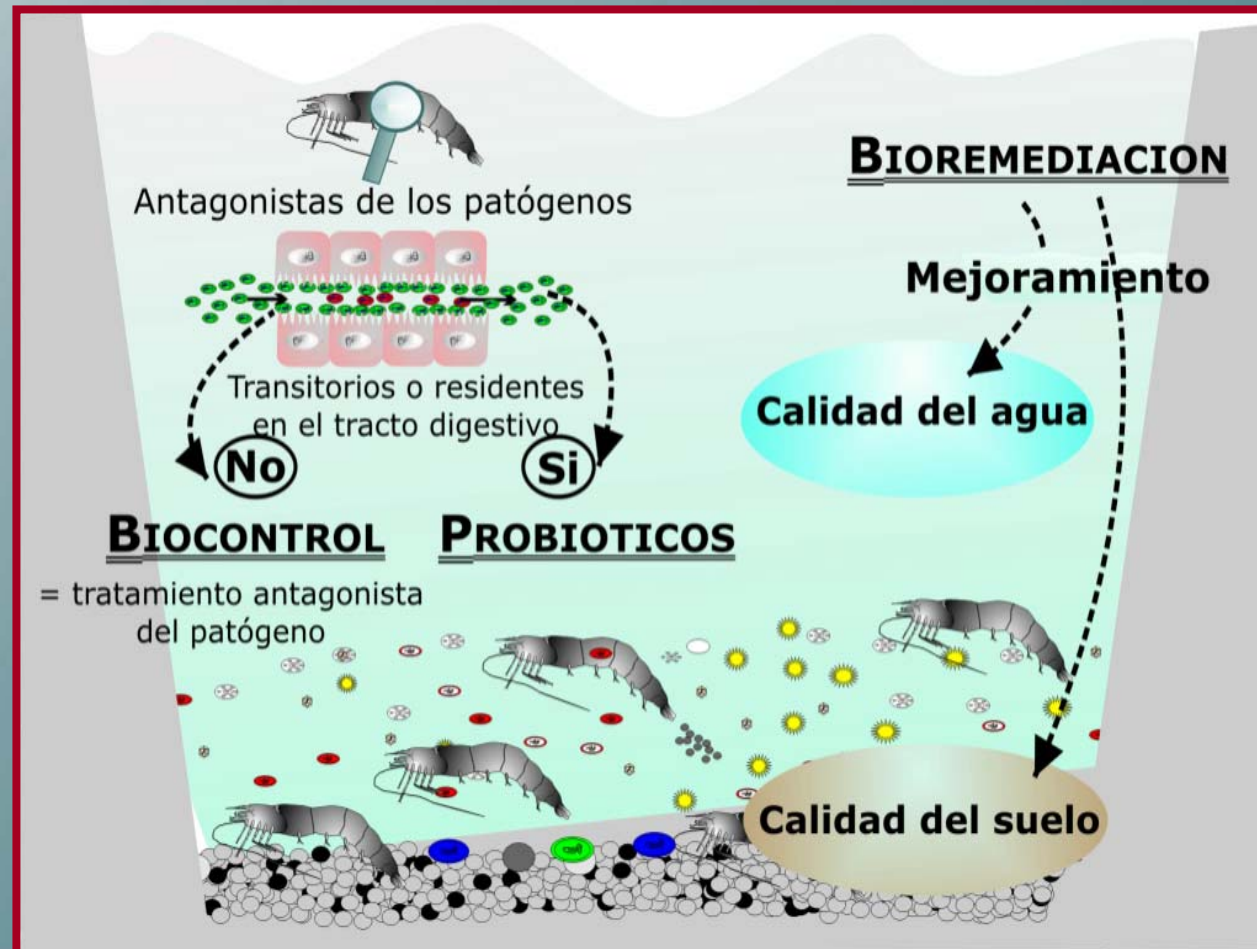


Salud y prevención de enfermedades

PROBIÓTICOS

- ❑ El uso de agentes microbianos “**probióticos**” permite:
 - complementar la alimentación mejorando la absorción de ciertos elementos no digeribles por el organismo cultivado,

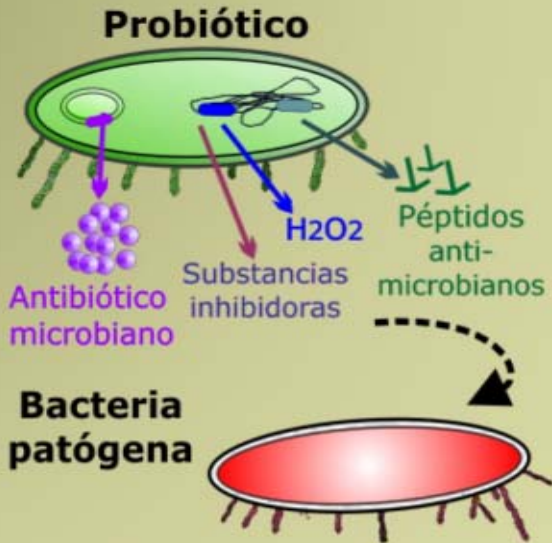
- el “**biocontrol**” por desplazamiento de microbios patógenos en los sistemas de cultivo,
- la “**bioremediación**” por descontaminación de tóxicos presentes en el agua o suelos de los sistemas de cultivo.



Salud y prevención de enfermedades

In: The use of probiotics in aquaculture.- *Aquaculture*.-180:147-165.- Gatesoupe F.-J., (1999).

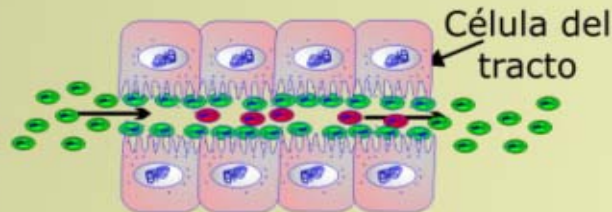
Antagonistas de los patógenos



- Competencia por nutrientes
- Inhibición del crecimiento
- Lisis y muerte de la bacteria patógena

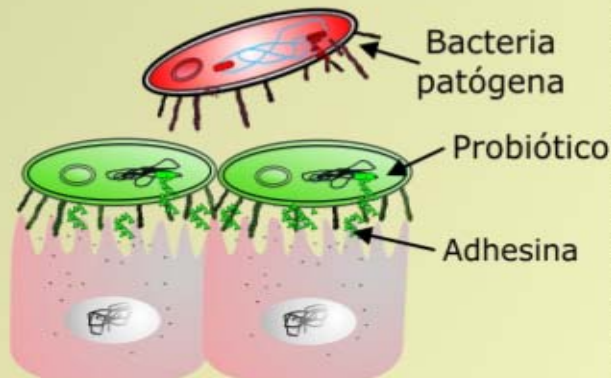
Colonización

1. Evaluación de la persistencia del probiótico en el intestino

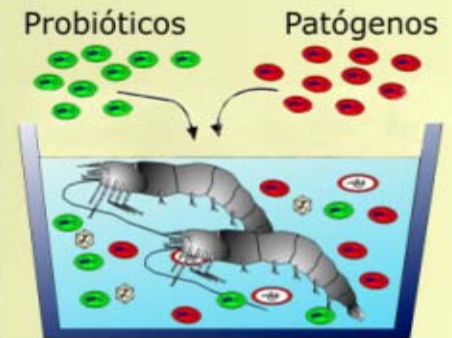


- Probióticos transitorios o residentes en el tracto digestivo
- Competencia de colonización

2. Pruebas de adhesión al mucus intestinal + pruebas *in vitro*



Incremento de la resistencia del huésped

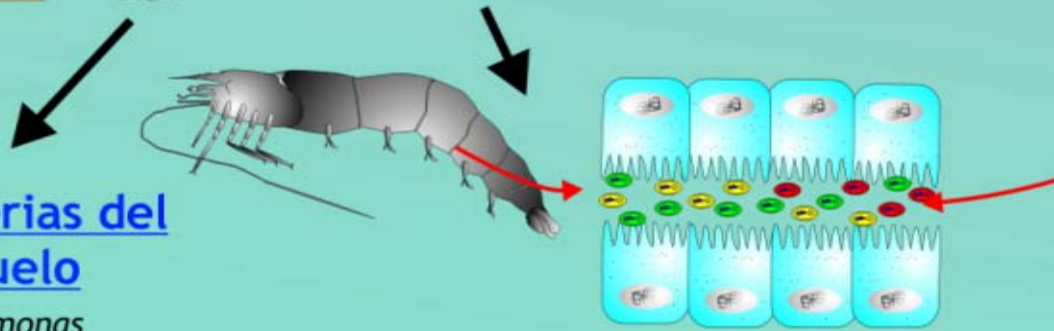
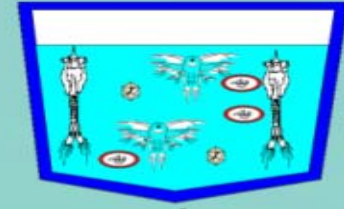
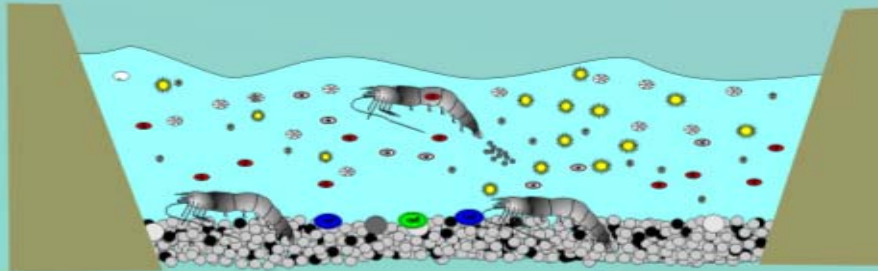


Infección experimental = Confrontación patógeno -probiótico en el huésped



Salud y prevención de enfermedades

Microorganismos útiles para la acuicultura



Bacterias del suelo

Nitrosomonas



Amoniaco monooxigenasa

Hidroxilamina oxireductasa

Nitrobacter

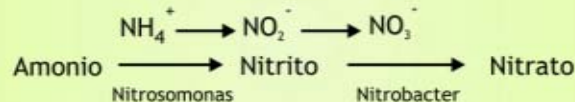


Nitrito oxidasa

Bacterias beneficiosas de la flora intestinal

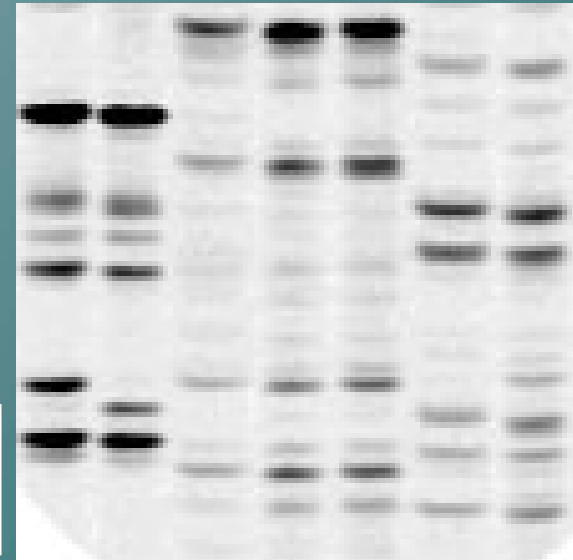
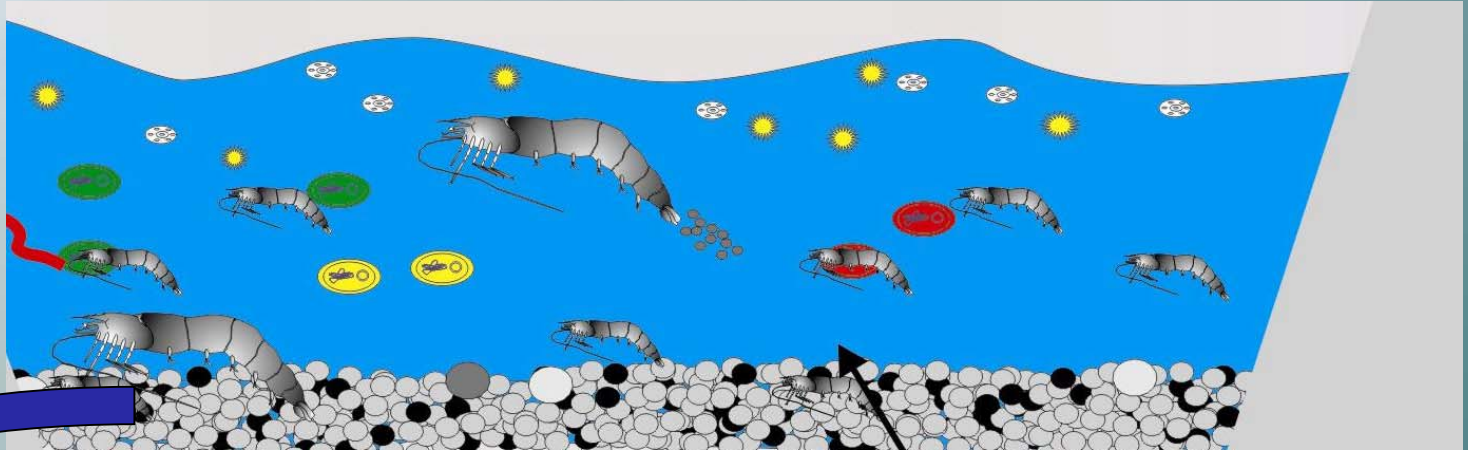
- Probióticos
- Bacterias que ayudan a la digestión del alimento

Mineralización



Salud y prevención de enfermedades

Control de calidad microbiológico del agua y de sedimentos



Salud y prevención de enfermedades



NUTRICIÓN

❑ La biotecnología permite producir a bajo costo, **elementos indispensables** para la alimentación de los organismos acuáticos, y su administración adecuada en las diferentes fases del cultivo.

- Vitaminas
- Aminoácidos
- Enzimas
- Oligoelementos
- Acidos Grasos

❑ El uso de **inmunofortificantes, inmunoestimulantes** o **inmunomoduladores**.

Salud y prevención de enfermedades

Nutrición

Aditivos
producidos por
biotecnología.

Ej.: bacterias
productoras de
enzimas.

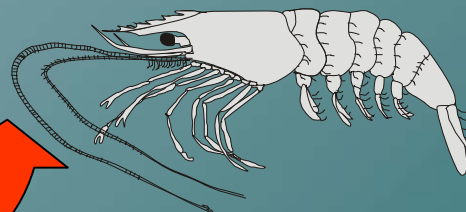


Célula bacteriana



Plásmido expresando
una secuencia de
enzima

enzima → moléculas antivirales



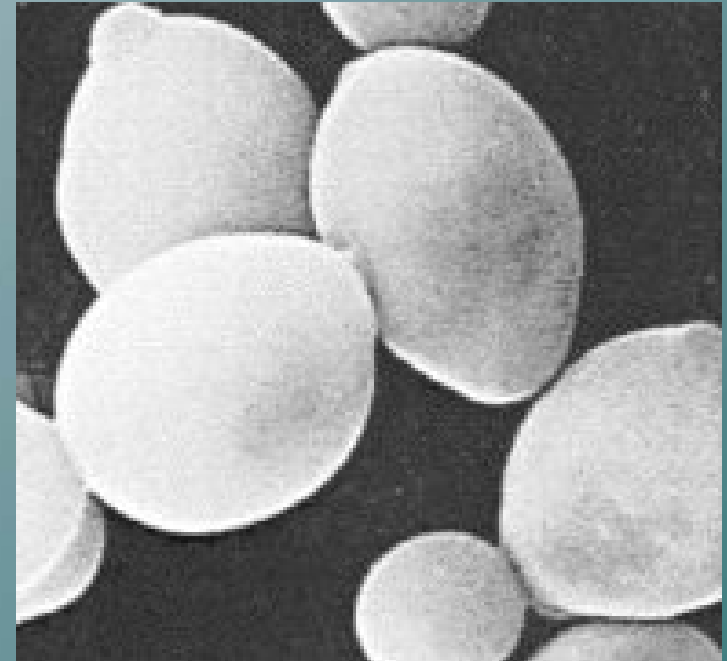
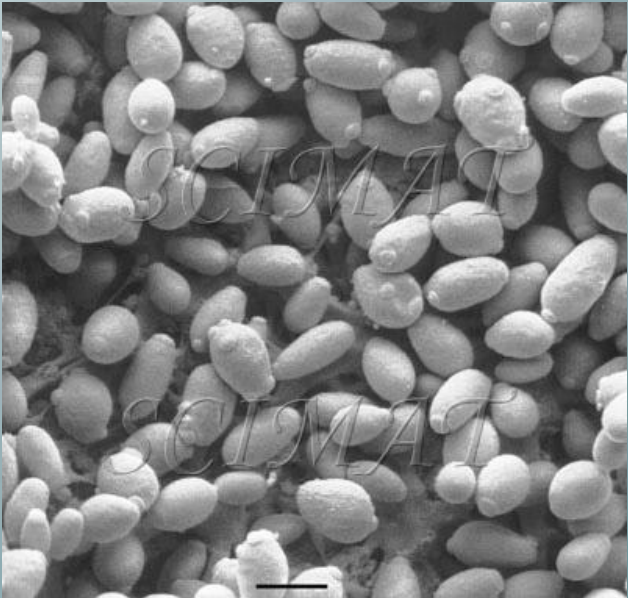
Salud y prevención de enfermedades



Las levaduras como probióticos

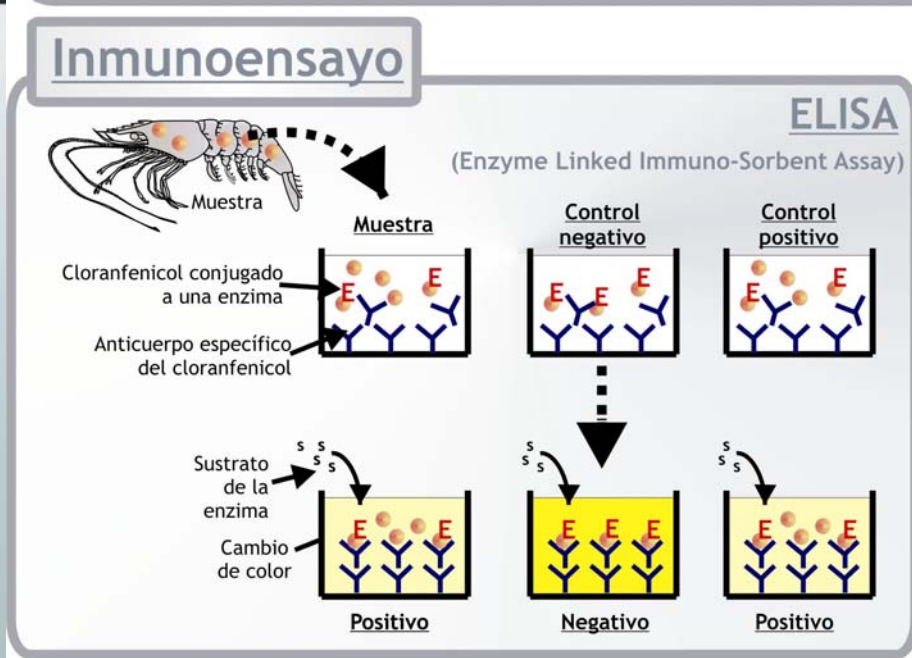
Competidores metabólicos con las bacterias

Fuentes nutritivas e inmunoestimulantes



La biotecnología (biología molecular e ingeniería genética) es indispensable para la caracterización, producción y el seguimiento de las levaduras

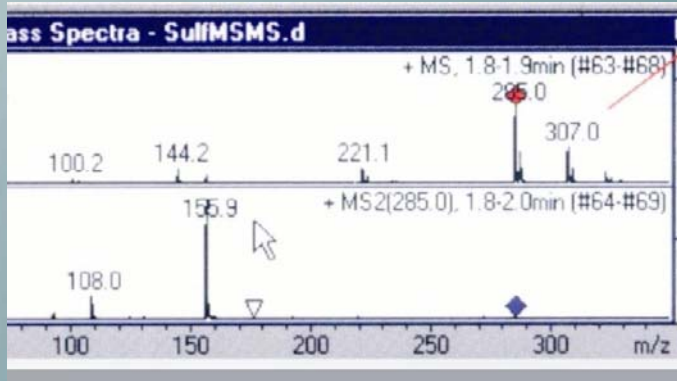
Control de calidad de productos de exportación



Detección de residuos de cloranfenicol



Detección de residuos de furazolidona

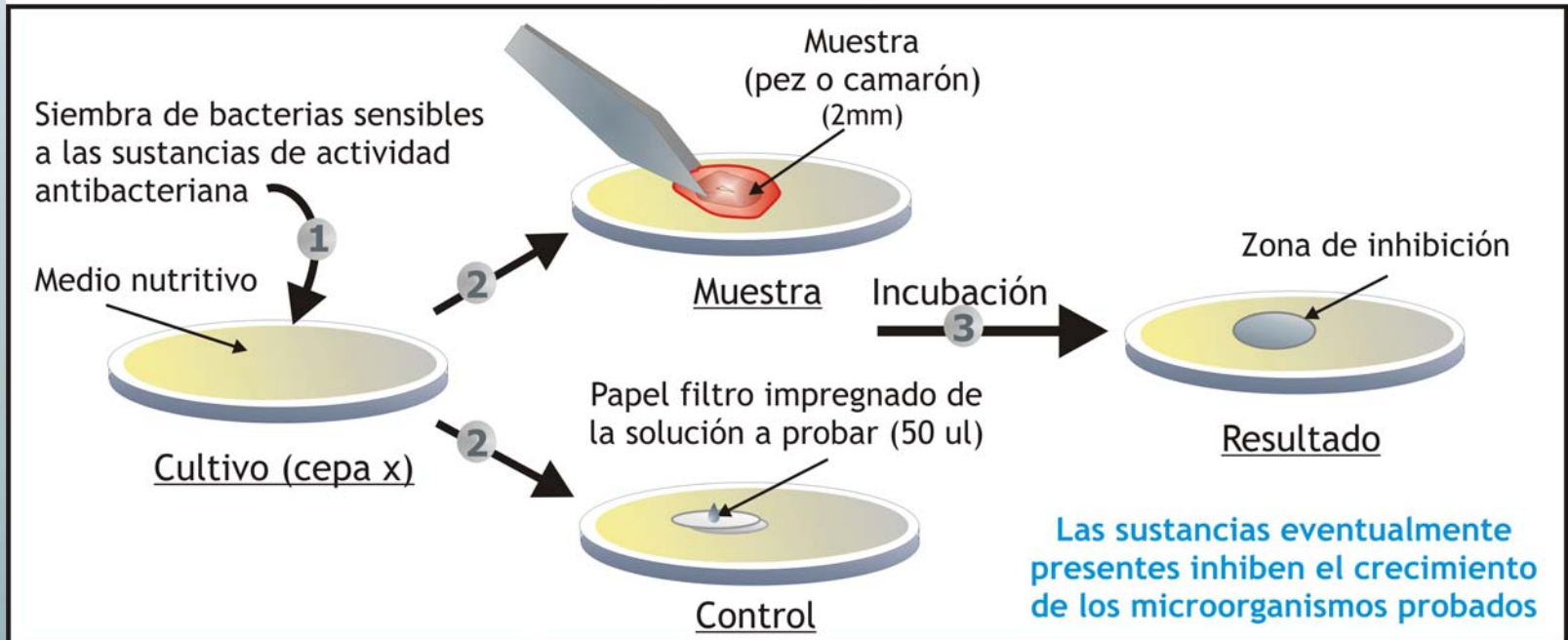


Cromatografía - Espectrometría (LC-MS)

Control de calidad de productos de exportación



DETECCION DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS Método microbiológico (4 cepas)



<i>Bacillus subtilis</i>	→	Quinolonas (Flumequina)
<i>Bacillus cereus</i>	→	Tetraciclinas (Oxitetraciclina)
<i>Escherichia coli</i>	→	Nitrofuranos (Furazolidona)
<i>Micrococcus luteus</i>	→	Sulfamidos (Sulfadiazina)

Ventajas

- Método acreditado por la Unión Europea
- Aplicable a los productos de la acuicultura
- Detecta la presencia de residuos antimicrobianos.

Desventaja

- No permite determinar la identidad de la sustancia revelada.

Control de calidad de productos de exportación



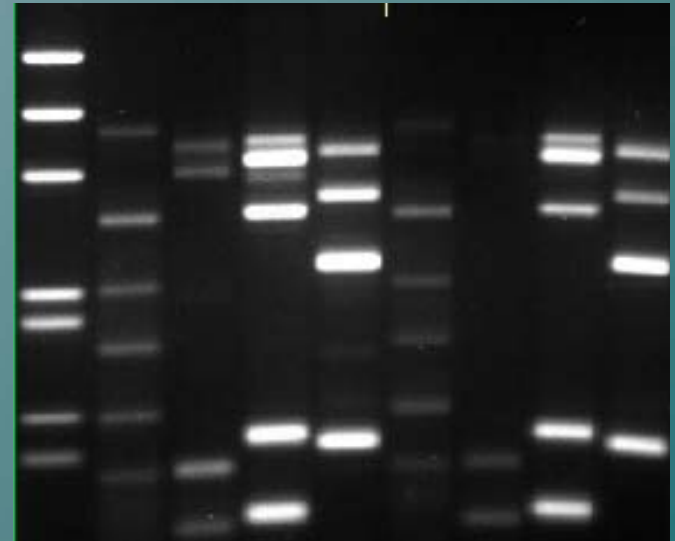
Detección de microorganismos patógenos para el consumidor: salmonelas, shigellas, vibrios, listerias, etc.



Pre-cultivo



Multiplex-PCR

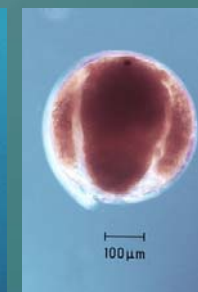
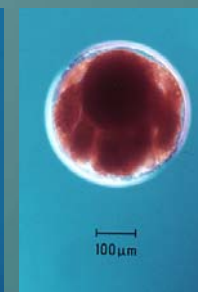
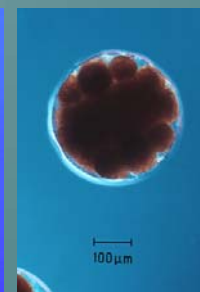
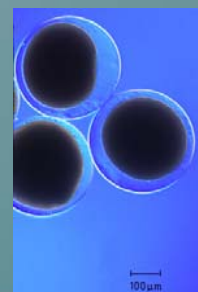
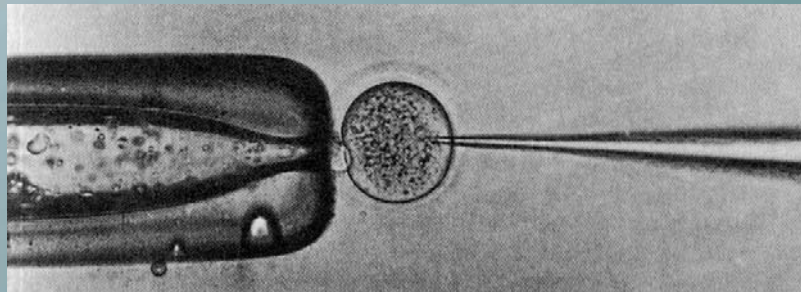
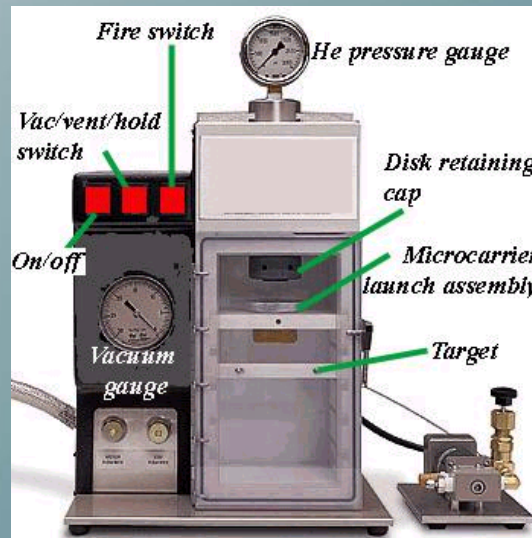


Incremento de la productividad

SELECCIÓN GENÉTICA

❑ **Selección clásica** de animales en base a caracteres fenotípicos de interés (crecimiento, resistencia a enfermedades, adaptación a condiciones ambientales, etc...), asistido por marcadores moleculares.

❑ Transformación genética



SELECCIÓN GENÉTICA

Criterios de selección



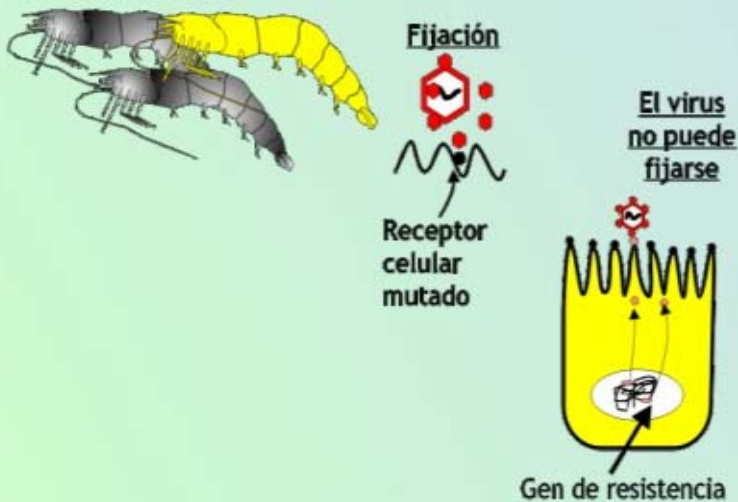
Crecimiento



Fecundidad



Sobrevivencia/resistencia (virus/bacteria)



Ecosistemas

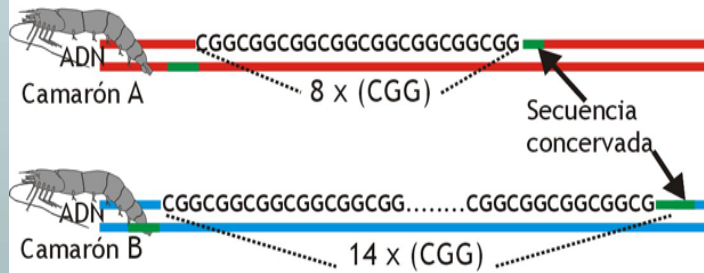


Marcadores Moleculares

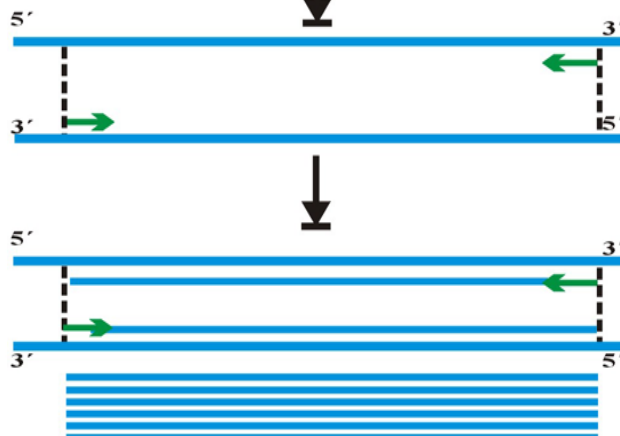
Microsatélites

Definición de "microsatélites" y formas alélicas

= Secuencias repetidas localizadas a lo largo de un genoma
Las repeticiones varían de tamaño de un sitio a otro.



Reacción de PCR



Minisatellite: Tandem repeats of sequences that vary from 14 to 100 base pairs in length.

TACGATATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGTAGGTA

TACGATATCGGACCAATCGATCGGACCAATCGTAGGTA

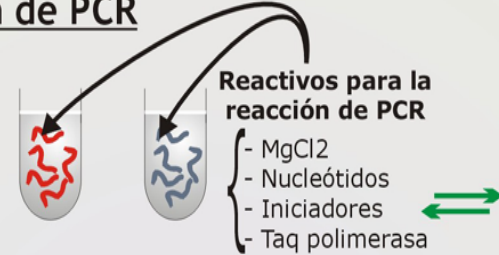
Polymorphism: variable number of repeats.

Microsatellite: Short sequence of tandem repeats, eg. CA repeats.

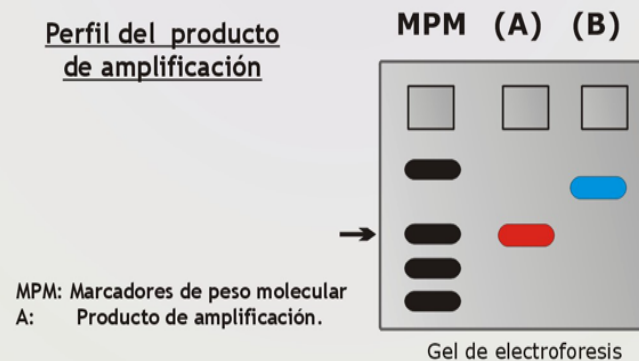
ATGCCATAGCACACACACACATTAGT

ATGCCATAGCACACACACACACATTAGT

Reacción de PCR



Perfil del producto de amplificación

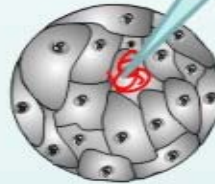


Inmunización molecular

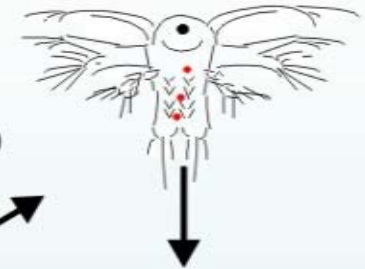


Micromanipulador

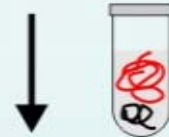
Liposomas
(Glóbulos lipídicos que facilitan la entrada del ADN en la célula)



Microinyección del ADN en el embrión (50 - 200 ug/pL)

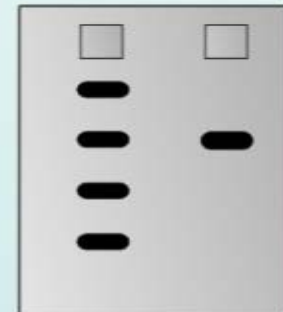


Extracción de ácidos nucleicos de camarón y de ADN microinyectado

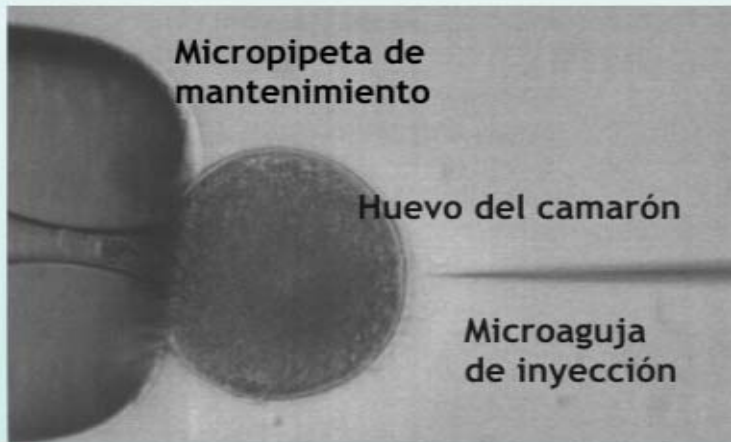


PCR

MPM Muestra



Gel de electroforesis

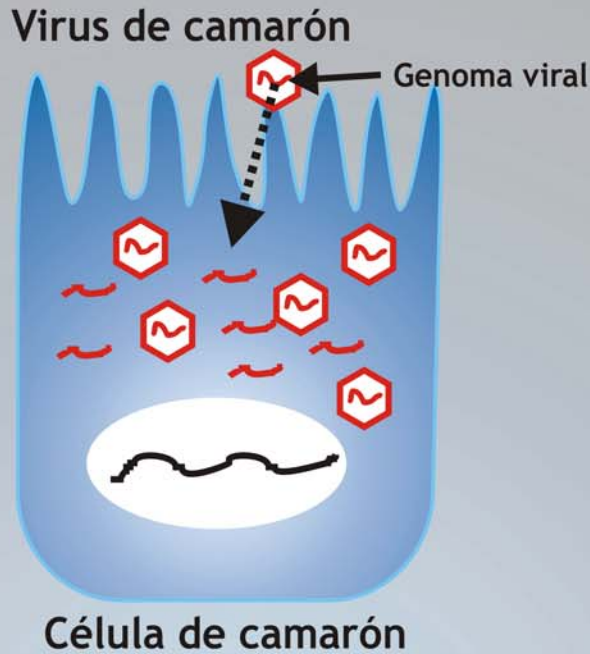


Micropipeta de mantenimiento

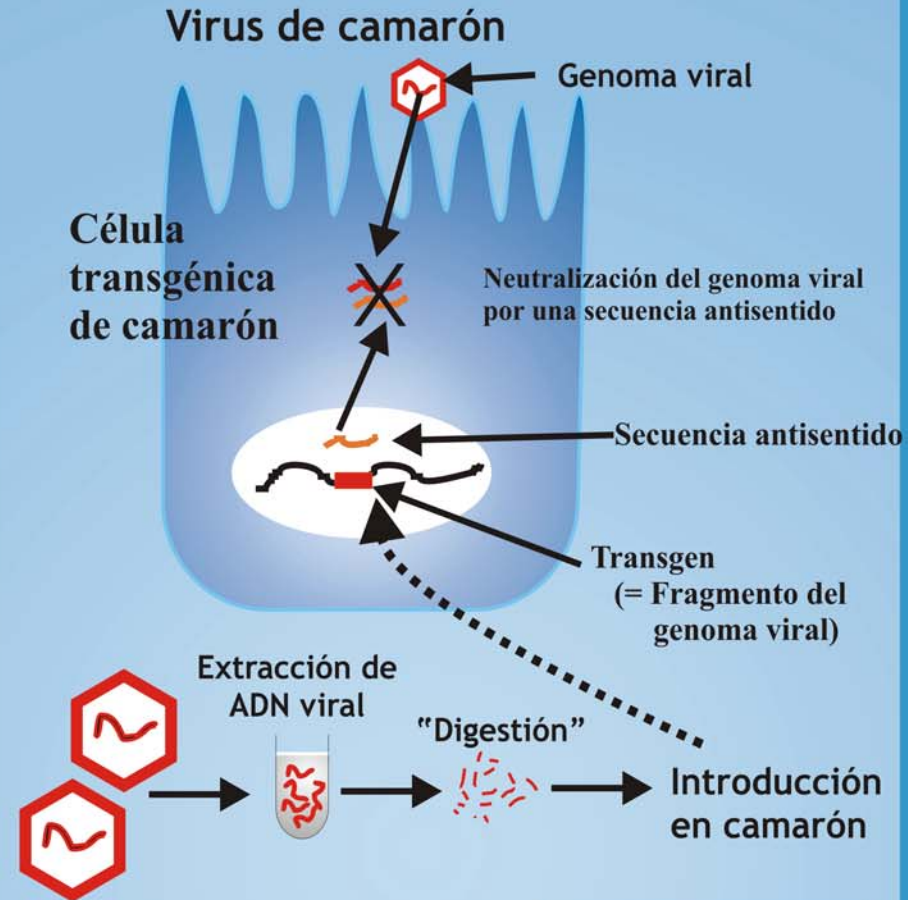
Huevo del camarón

Microaguja de inyección

Estudio de la inhibición de la replicación viral con un antisentido



- La selección genética no conduce a la mono-resistencia
- Los antibióticos no pueden ser utilizados contra virus
- La prevención es posible mediante el diagnóstico

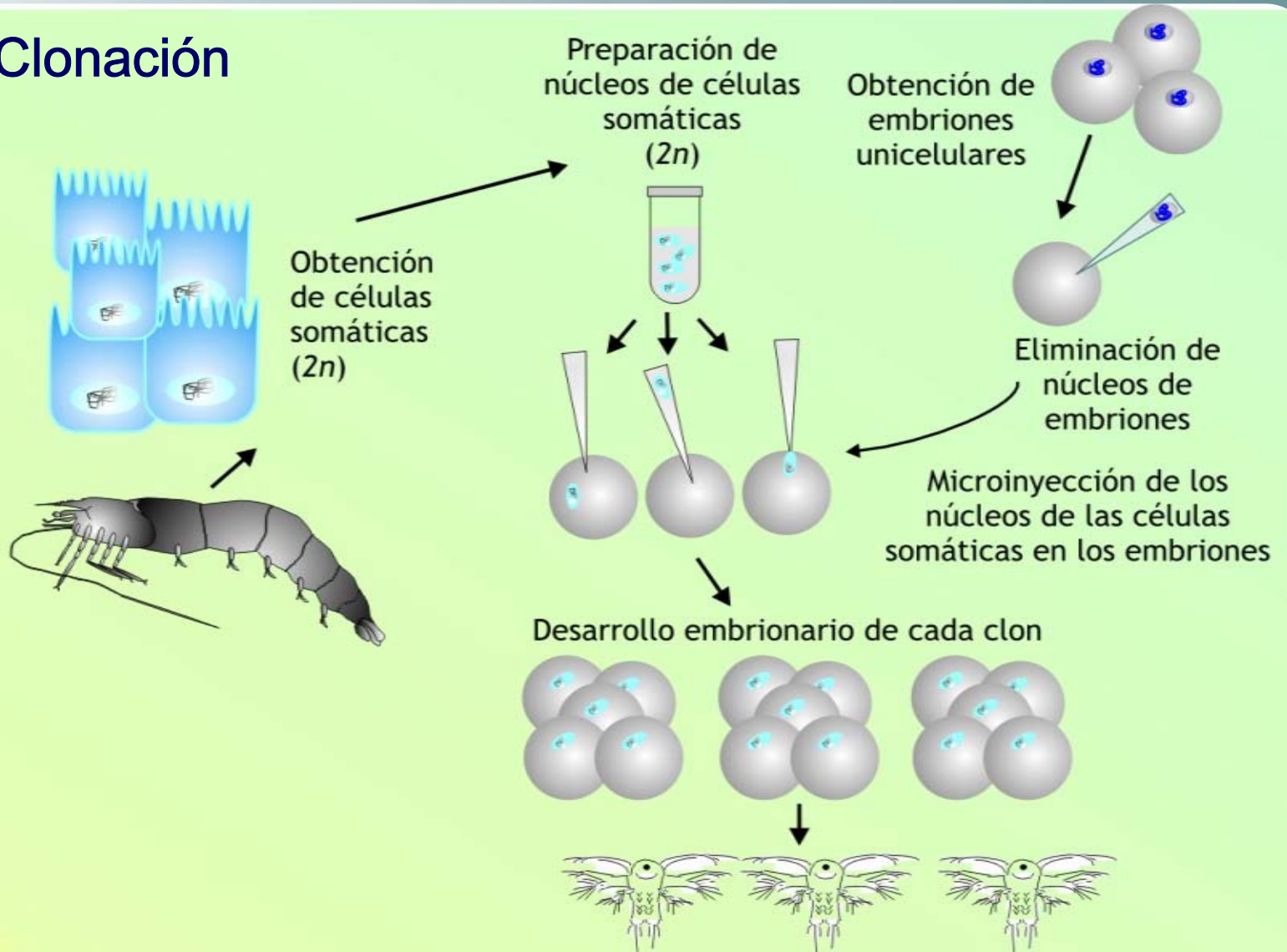


- Inmunización permanente
- Multi-resistencia

Biotechnología

- Transfección
- Expresión
- Integración

Clonación



Ciudadela Universitaria Salvador Allende, Av. Kennedy y Delta.
Facultad de Ciencias Médicas, Edificio Administrativo, 2do. Piso alto.
Tele-fax: 282665 Correo electrónico: emotte@easy.pacifictel.net



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL



GRACIAS POR SU ATENCION



Guayaquil: Cdla. Vernaza Norte Mz 10 V 34 P.O.Box: 09-02-142-A
Teléfonos: (593-4) 284066 – 289247 - (09-423695) - (09-423806) - (09-516186)
e-mail: concepto@gye.satnet.net