

Expresión de Peneidinas en camarones *Penaeus vannamei* tratados con probióticos

Expression of Penaeidins in shrimp Penaeus vannamei treated with probiotics

Mery Ramírez¹, Jenny Rodríguez²

¹ Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), Ecuador. <https://orcid.org/0000-0002-2717-0208>

² Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM). <https://orcid.org/0000-0002-4773-0700>

Autor de correspondencia: mramirez@upse.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.63804/CIBEN.25.icta.e3>

Resumen

Las peneidinas son péptidos antimicrobianos (AMPs), que actúan como componente esencial del sistema inmunitario de los camarones, participando en la defensa del huésped contra bacterias y virus. En este estudio se evaluó el efecto del consorcio de probióticos compuesto por *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrios hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus* ss (P64) sobre la respuesta inmunitaria y la supervivencia de camarones juveniles *Penaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* patógeno. Los camarones juveniles se cultivaron por 50 días, aplicando el consorcio de bacterias con frecuencia 2 veces/día. Posteriormente los camarones fueron desafiados con el *Vibrio Parahaemolyticus* (Pir A/Pir B) por 48 horas. La expresión de las peneidinas se realizó mediante Hibridación in situ (HIS) posterior al desafío, con respuesta de hemocitos infiltrados positivos en el tejido conectivo de distintos órganos, en particular de los apéndices bucales, estómago, órgano linfoide, y hepatopáncreas. La supervivencia de los camarones juveniles fue de 88,9%, en comparación al control de 22,1%, demostrando la influencia positiva de las bacterias probióticas. En conclusión, el consorcio de bacterias probióticas mostró un efecto protector significativo contra la vibriosis en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*, cuando fueron desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*.

Palabras clave: Camarón; Peneidinas; Probióticos; *Vibrio parahaemolyticus*.

Abstract

Penaeidins are one of the antimicrobial peptides (AMPs) that act as essential components of the shrimp immune system, playing a key role in host defense against bacteria and viruses. This

study evaluated the effect of a probiotic consortium composed of *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus* ss (P64) on the immune response and survival of juvenile *Penaeus vannamei* challenged with pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. Juvenile shrimp were cultured for 50 days, applying the bacterial consortium twice daily. Subsequently, shrimp were challenged with *Vibrio parahaemolyticus* (PirA/PirB) for 48 hours. Penaeidin expression was analyzed through in situ hybridization (ISH) after the challenge, revealing positive infiltrated hemocytes in the connective tissue of various organs, particularly in the buccal appendages, stomach, lymphoid organ, and hepatopancreas. The survival rate of juvenile shrimp was 88.9%, compared to 22.1% in the control group, demonstrating the positive influence of probiotic bacteria. In conclusion, the probiotic bacterial consortium exhibited a significant protective effect against vibriosis in *Penaeus vannamei* culture when challenged with *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: Shrimp; Penaeidins; Probiotics; *Vibrio parahaemolyticus*.

Introducción

“La aplicación del consorcio de probióticos mejora la expresión de peneidinas y la supervivencia de camarones *Penaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*”.

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*), originario de la costa del Pacífico tropical de América, se cultiva ampliamente en algunas partes del mundo y constituye una de las especies acuícolas más importantes para el consumo humano (Yue et al., 2022). Sin embargo, la producción presenta desafíos causados por patógenos bacterianos de especies de vibrio, los cuales causan enfermedades recurrentes y emergentes (Flegel, 2012; Tran et al., 2013). Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y otras especies del género *Vibrio* portadoras de la toxina pirA y pirB, como *Vibrio owensii* y *Vibrio campbellii*, son altamente virulentas para los camarones peneidos (Lai et al., 2015; Xiao et al., 2017). Estos vibrios son los agentes causantes de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) (Kumar et al., 2021) que ha causado grandes pérdidas en la supervivencia de camarones, lo que permite buscar estrategias biológicas para su control.

La aplicación de probióticos en la acuicultura y sus grandes beneficios en la salud de los organismos es considerada uno de las estrategias más estudiadas (Hai, 2015; Knipe et al., 2021; Ramirez et al., 2022). Con el uso de probióticos, se han reportado mejoras significativas en la salud intestinal (Yarahmadi et al., 2022), procesos inmunitarios innatos de los camarones como la fagocitosis, formación de nódulos, incrementos en componentes humorales incluyendo proteínas, sistema profenoloxidasa (proPO) (Lakshmi et al., 2013; Song & Li, 2014) y generación de péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) (Balcázar & Rojas-Luna, 2007). Los AMPs son proteínas catiónicas o aniónicas que atacan microorganismos

invasores (Tassanakajon et al., 2018). Las peneidinas son unos de los péptidos antimicrobianos más abundantes y tienen afinidad por la quitina del camarón, detectándose en la cutícula luego de un desafío microbiano (Destoumieux et al., 2000; Muñoz et al., 2003). Los ARN mensajeros (ARNm) de peneidina están presentes en todos los estadios larvarios, pero varían en los niveles de traducción (Muñoz et al., 2003).

Metodología

Diseño experimental y tratamientos aplicados a camarones juveniles *Penaeus vannamei*

Los camarones juveniles de *Penaeus vannamei* ($3,17 \pm 0,39$ g) fueron aclimatados a temperatura ambiente y a salinidad de 35‰ con aireación continua en tanques de 500 L durante 48 horas. Previamente, el agua fue filtrada y tratada con UV. Luego, los camarones fueron transferidos aleatoriamente a 10 acuarios, conteniendo 40 L de agua de mar, 15 camarones/unidad experimental y cinco réplicas por tratamiento con el consorcio de probióticos y 5 réplicas de control.

Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial (5% de su biomasa) dos veces al día durante todo el bioensayo (50 días). El pienso se mezcló con el consorcio de probióticos P62 y P64 (1×10^8 UFC/mL). El probiótico Ili se añadió en el agua a una concentración de 105 UFC/mL. Para evitar la lixiviación, el pienso se revistió con aceite de pescado a razón de 30 mL/kg.

Histopatología

Se tomaron muestras de camarones antes de la prueba de desafío. Las muestras para histología se conservaron utilizando el fijador de Davidson (330 mL de alcohol etílico al 95%, 220 mL de formol al 37%, 115 mL de ácido acético y 335 mL de agua destilada). El protocolo utilizado para el análisis histológico se basó en la metodología descrita por (T.A. Bell, 1989) con ligeras modificaciones.

Se utilizó una sonda de ARN marcada con Digoxigenina con expresión positiva de peneidinas. Se hizo énfasis en las lesiones de AHPND, presencia de hemocitos infiltrantes, presencia de esferoides en órgano linfóide, tejido conectivo, glándula antenal, hepatopáncreas, intestino, tejido hematopoyético, músculo, tejido nervioso y corazón. Los grados de severidad de las lesiones se registraron según el procedimiento de Panchana et al. (comunicación personal), que da un valor numérico cualitativo de 1 a 4 según el grado de gravedad de las lesiones.

Desafío con *Vibrio Parahaemolyticus* en los camarones tratados con probióticos

A los camarones tratados durante 50 días se infectó con *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2), siguiendo la metodología descrita por (Domínguez-Borbor et al., 2019).

Se realizó una selección al azar de 5 camarones tratados de cada réplica y se colocó en acuarios de 20 Litros controlando la temperatura de 30°C, se agregó la suspensión bacteriana a una concentración de 106 UFC ml⁻¹. Se agregaron 20 mL del inóculo bacteriano a todos los acuarios. El recambio de agua (50%) se realizó 24 horas después de la infección y se determinó la supervivencia cada 2 horas durante 48 horas. Se tomaron muestras para histopatología e HIS de camarones moribundos y supervivientes.

Resultados y discusión

Supervivencia de los camarones juveniles tratados con el consorcio de probióticos

Los camarones juveniles tratados con el consorcio de probióticos Ili, P62 y P64 obtuvieron una supervivencia de 88,9% en comparación al control 22,1% sin tratamiento de probióticos (Figura 1) determinado a los 31 horas después de la infección con el *Vibrio parahaemolyticus*.

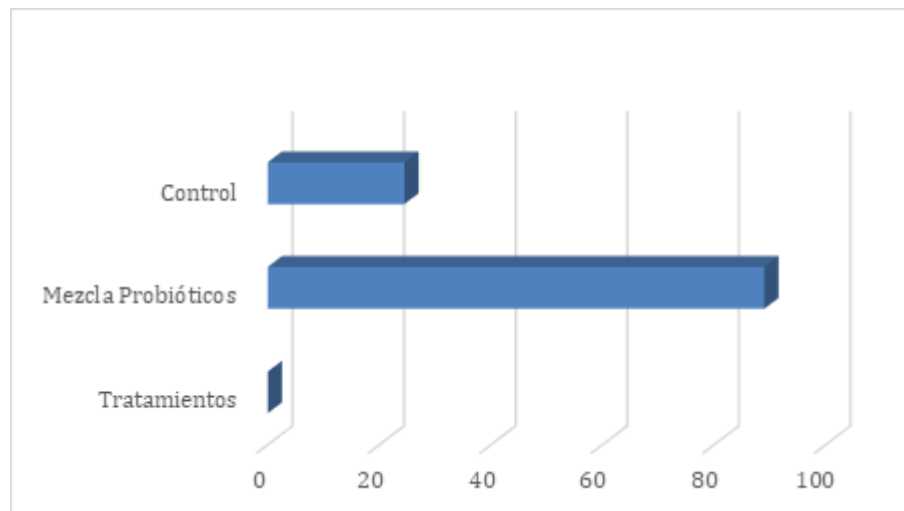


Figura 1. Supervivencia de camarones tratados con probióticos después del desafío

Estudios similares de (Gullian et al., 2004) reportó que las cepas probióticas *V. hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus*. (P64), usadas en este estudio poseen un efecto inhibitorio contra el patógeno *Vibrio harveyi*. Balcázar et al. (2007) indicaron que la administración del probiótico *Vibrio diabolicus* (conocido en ese entonces como *Vibrio alginolyticus*) mejora la tasa de conversión alimenticia, y podría reducir la tasa de enfermedad causada por vibrios.

Resultados de Hibridación in situ (HIS)

Se aplicó la técnica de HIS a los camarones juveniles de los diferentes tratamientos, con el fin de observar la expresión del AMP peneidina en los diferentes tejidos por histopatología. En términos generales, se observaron hemocitos infiltrados positivos para peneidinas en el tejido conectivo de distintos órganos, en particular de los apéndices bucales, estómago y tejido conectivo bajo el epitelio del cefalotórax.

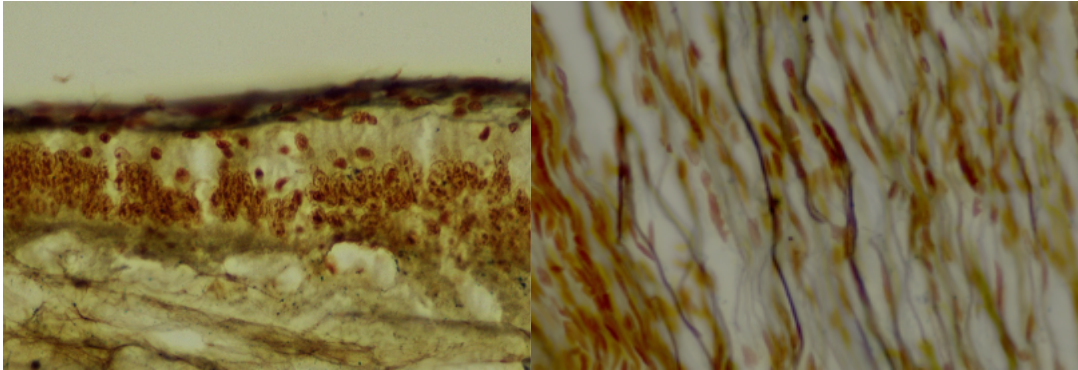


Figura 2. Cutícula y el epitelio del intestino **Figura 3.** Zona bucal

Los resultados obtenidos en los tratamientos de los camarones juveniles, se complementaron con las observaciones de signos histopatológicos y la expresión del péptido antimicrobiano peneidina in situ. La expresión de la peneidina en los diferentes órganos es semejante a lo observado por (Muñoz et al., 2002) quienes detectaron las peneidinas en los hemocitos circulantes en el sistema vascular del camarón y en diferentes órganos, también utilizando otros métodos de identificación de la expresión de peneidinas, esta ha sido identificada en diferentes tejidos del cuerpo de los camarones (Destoumieux et al., 2000). La señal de peneidina se detectó así mismo en los esferoides en el LO, los esferoides representan un mecanismo importante para secuestrar patógenos en camarones peneidos (Anggraeni & Owens, 2000; Muñoz et al., 2003).

El estudio argumenta un desarrollo teórico científico significativo contribuyendo a la comprensión de los mecanismos celulares y humorales del sistema inmune de los camarones que a través de la expresión de uno las peneidinas, categorizados como antimicrobianos claves en la respuesta de defensa contra los patógenos, pueden potenciar su respuesta inmune. Desde la perspectiva práctica la adición de probióticos en la dieta de los camarones puede potenciar la acción la defenza del sistema inmune repercutiendo en la salud y aumento de la supervivencia del cultivo. La estrategia de cultivo sigue siendo sostenible en la producción y con reducción del impacto ambiental haciendo posible ser incorporada como parte de

los protocolos de producción, considerando que la expresión de las peneidinas puede ser considerado como un biomarcador útil en el manejo de la salud de los organismos cultivados.

Conclusiones

El tratamiento de la aplicación de probióticos en el cultivo de camarones tiene un impacto significativo en la expresión de las peneidinas consideradas como uno de los péptidos antimicrobianos AMPs en el cultivo de camarón *Penaeus vannamei*. Se observó una expresión significativa en la cutícula y la boca, epitelio del intestino de los tejidos del camarón existiendo una posible relación con la supervivencia expresada en la prueba de desafío con el patógeno *V. parahaemolyticus*.

Se sugiere ampliar el presente estudio a través de la inmunomodulación y el uso de otros probióticos excluyentes de vibrios patógenos.

Validar los ensayos del tratamiento aplicado en este estudio en sistemas de cultivo de camarón (larviculturas y piscinas) a fin de incrementar la confiabilidad en la investigación que permitan fortalecer la vinculación entre la academia y la industria acuícola.

Profundizar la comprensión de los mecanismos inmunitarios del camarón a fin de seguir explorando estrategias de inmunomodulación.

Referencias bibliográficas

Anggraeni, M. S., & Owens, L. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(2), 85–92. <https://doi.org/10.3354/dao040085>

Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55(5), 409–412. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9000-0>

Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., & Bachère, E. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*, 113(3), 461–469. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.3.461>

Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C.,

Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. A. (2019). The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 508(April), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.077>

Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>

Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>

Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>

Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 324–352. <https://doi.org/10.1111/raq.12477>

Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute hepatopancreatic necrosis disease (Ahpnd): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in Shrimp aquaculture. *Toxins*, 13(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>

Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang, S. H., Yeh, M. De, Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. o., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>

Lakshmi, B., Viswanath, B., & Sai Gopal, D. V. R. (2013). Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/424123>

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Gueguen, Y., & Bachère, E. (2003). Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(4), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00102-7)

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., & Bachère, E. (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 269(11), 2678–2689. <https://doi.org/10.1046/j.1462-8651.2002.026911.x>

[org/10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x)

Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizuete, K., Sonnenholzner, S., Alexis, F., & Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus sensu stricto* (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 549(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>

Song, Y. L., & Li, C. Y. (2014). Shrimp immune system - Special focus on penaeidin. *Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.6119/JMST-013-0813-1>

Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>

Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45–55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>

Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42177>

Yarahmadi, P., Mirghaed, A. T., & Shekarabi, S. P. H. (2022). Zootechnical performance, immune response, and resistance to hypoxia stress and *Vibrio harveyi* infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed different fishmeal diets with and without addition of sodium butyrate. *Aquaculture Reports*, 26(October 2022), 101319. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101319>

Yue, S., How, H., Dong, D., Jiasong, Z., Xiaohan, Y., Xian, L., & Xiefa, S. (2022). Comparative Life Cycle Assessment of Whiteleg Shrimp (*Penaeus 2 vannamei*) Cultured in Recirculating Aquaculture Systems (RAS), 3 Biofloc Technology (BFT) and Higher-Place Ponds (HPP) Farming 4 Systems in China.