

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de *Lactobacillus* sp. aislado de col fermentada, sobre el peso y los marcadores inmunológicos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Ileana Sánchez Ortiz^I, Leonardo Martín Martín^{II}, Yonarky García Varela^{II}, Zoila Abad Márquez^I, Ramón Franco Rodríguez^I, Yamilka Ramírez Núñez^I, Jesús Zamora Sánchez^I, Rosa Basulto Morales^I, Alain Moreira Rubio^I, Amílcar Arenal Cruz^{II}

^ICentro de Ingeniería Genética y Biotecnología. P.O.Box 387. CP 70100. Camagüey. Cuba.
Correo electrónico: ileana.sanchez@cigb.edu.cu. ^{II}Universidad de Camagüey «Ignacio Agramonte Loynaz».
Circunvalación Norte. Camagüey. Correo electrónico: amilcar.arenal@reduc.edu.cu

RESUMEN: El empleo de probióticos para el control de enfermedades en la acuicultura intensiva es una alternativa al uso de antibióticos. En este trabajo se aisló la cepa bacteriana IC1 a partir de una fermentación ácido láctica de col y se identificó por técnicas moleculares y convencionales como *Lactobacillus* sp. Se determinó la actividad antagónica *in vitro* de IC1 contra cepas patrones. Para la evaluación de la actividad probiótica un grupo de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* se trató cada 24 horas con $1-2 \times 10^4$ ufc/ml de IC1 y otro se mantuvo sin tratamiento. A los 25 días se cuantificaron el peso húmedo y el comportamiento de los parámetros inmunológicos (actividad de las enzimas superóxido dismutasa, fenoloxidasa y peroxidasa). El peso de los animales que se trataron con *Lactobacillus* sp. IC1 fue significativamente mayor en 1,3 veces respecto al control ($p < 0,05$). Las actividades de las enzimas fenoloxidasa y superóxido dismutasa también se incrementaron, lo que indica la estimulación del sistema inmune de las postlarvas. La cepa tiene además actividad antagonista *in vitro* contra *Vibrio harveyi* R1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25 853 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. La bacteria ácido-láctica *Lactobacillus* sp. IC1 tiene potencialidades para el empleo como probiótico en camarón.

Palabras clave: probiótico, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio harveyi*, *Lactobacillus* sp., fermentaciones vegetales, bacterias ácido-lácticas.

Effect of *Lactobacillus* sp. isolated from fermented cabbage on the weight and immunological markers of white shrimp *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT: The use of probiotics for controlling diseases in intensive aquaculture is an alternative to antibiotics. In this paper, the bacterial strain IC1 was isolated from an acid lactic fermentation of cabbage and it was identified by molecular and conventional techniques like *Lactobacillus* sp. The *in vitro* antagonistic activity against several pattern strains was determined. For probiotic activity evaluation, a group of *Litopenaeus vannamei* postlarvae was treated every 24 h with $1-2 \times 10^4$ cfu / ml of IC1 and the other remained untreated. At 25 days, the wet weight and the behaviour of the immunological parameters (superoxide dismutase, phenoloxidase and peroxidase enzyme activities) were measured. The weight of animals treated with *Lactobacillus* sp. IC1 was significantly higher in 1.3 times than the control ($P < 0.05$). Superoxide dismutase and phenoloxidase activities also increased significantly, indicating the stimulation of the immune system. The strain also had *in vitro* antagonistic activity against *Vibrio harveyi* R1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25 853 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The acid lactic bacteria *Lactobacillus* sp. IC1 has a great potential as probiotic for use in shrimp cultures.

Key words: probiotic, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio harveyi*, *Lactobacillus* sp., vegetable fermentation, acid-lactic bacteria.

INTRODUCCIÓN

El cultivo intensivo de camarones es una actividad con un alto potencial para satisfacer la creciente demanda de alimentos acuáticos(1); sin embargo, una de las principales dificultades que existe en el cultivo comercial de estos animales es la aparición de infecciones que se asocian a las deficiencias en los métodos de manejo, a la calidad de las aguas y al valor nutricional del alimento (2). Estas enfermedades infecciosas se controlaron con antibióticos por muchos años, pero el uso indiscriminado de estos compuestos provocó la aparición de cepas bacterianas multi-resistentes que pueden afectar la salud del consumidor, la disminución de la flora bacteriana que actúa como protección natural a los patógenos y la persistencia de estos agentes químicos en el ambiente (3).

La introducción del uso de bacterias benéficas para el desarrollo de vacunas, inmunoestimulantes y probióticos son algunas de las alternativas para resolver este problema(4). El empleo de probióticos en etapas de desarrollo larval y juvenil de los organismos acuáticos disminuye las tasas de mortalidad larvaria, aumenta las de crecimiento y mejora la capacidad inmunológica natural sin dejar residuos perjudiciales para la salud (2). Bacterias probióticas de los géneros *Vibrio* y *Bacillus* se han aislado con este fin del agua de cultivo de camarones y del intestino o hepatopáncreas de diferentes especies de penaeidos (5,6,7). Las especies de *Lactobacillus* sp. que se han probado son generalmente cepas provenientes de vertebrados (8), pero no existen informes de aislamientos de cepas probióticas a camarón a partir de fermentaciones ácido lácticas de vegetales.

Durante el proceso de fermentación espontáneo de vegetales en salmuera se desarrolla una amplia gama de microorganismos que forman parte de su propia microbiota y que presentan propiedades probióticas (9). En este artículo se presentan los resultados del aislamiento y selección mediante antagonismo a *Vibrio harveyi* R1 de un probiótico potencial para camarón a partir de fermentaciones ácido-lácticas de col y se muestra el efecto de esta cepa sobre el peso y los parámetros inmunológicos de los animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las larvas de *Litopenaeus vannamei* se obtuvieron en estadio PL9 (9 días después de la metamorfosis a postlarva), procedentes del centro de Desove de camarón «Yaguanabo», ubicado en Cumanayagua, Cienfuegos, Cuba.

El aislamiento *Vibrio harveyi* R1 se obtuvo del Centro de Desove de Santa Cruz del Sur, Camagüey y se identificó mediante API 20 NE (Biomériux) y por técnicas bioquímicas convencionales según el Manual de Taxonomía Sistemática de Bergey (10).

Los aislamientos antagonistas a *Vibrio harveyi* R1 se obtuvieron de fermentaciones ácido-lácticas de col en salmuera (NaCl 6%, sacarosa 1%) y con 30 días desde el inicio del proceso.

Las cepas de referencia se suministraron por el cepario del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey.

Aislamiento y selección de microorganismos antagonistas a *Vibrio harveyi* R1

Un gramo de vegetal se suspendió en 9 mL de solución salina peptonada (Peptona 1g/L, NaCl 9 g/L). A partir de la suspensión se realizaron diluciones decimales seriadas que se sembraron por duplicado mediante diseminación con espátula de Drigalsky en placas de Petri (100 mm de diámetro) que contenían 20 ml de medio de cultivo Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (11). Estos se incubaron a 30°C durante 48 h.

Para la selección, las colonias se inocularon por punción en 2 placas con medio MRS y se incubaron a 30°C durante 48 h. Una de las placas se trató durante 5 minutos con vapores de cloroformo y se adicionó sobre la superficie una mezcla de cultivo de la cepa patógena oportunista *Vibrio harveyi* R1 (10⁸ ufc/mL) con agar Nutriente según Liao y colaboradores (12). Después de 48 horas a 30°C se seleccionaron las colonias que mostraron halos de inhibición, se purificaron mediante agotamiento por estrías en medio agar MRS. Los microorganismos se conservaron por congelación a -70°C con glicerol al 20% como crioprotector (13).

El ensayo de antagonismo microbiano se repitió según Liao (12). Se utilizaron además las cepas de referencia *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterobacter aerogenes* ATCC 10043 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25 853. El ensayo se realizó por triplicado y se midieron los halos de inhibición en cada caso.

La identificación convencional se realizó según el Manual de Taxonomía Sistemática de Bergey (10). La ubicación taxonómica en el género se estableció a partir de los resultados de las tinciones de Gram y de esporas y de la determinación de la actividad de la enzima catalasa y de la relación de la cepa con el oxígeno (13). La producción de ácido a partir de diferentes azúcares y la utilización de nitratos por la cepa se detectó mediante la inoculación del juego de identificación API 20A (Biomériux).

Para la identificación molecular se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen final de 100 μL . A cada reacción se adicionaron 10 ng/ μL de ADN genómico (que se purificaron según Sambrook (14), 2,5 mM de MgCl_2 , 100 μM de cada dNTP en tampón de reacción (50 mM de KCl y 10 mM Tris-HCl pH 8,24), una unidad de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Promega) y 1 pmol/ μL de los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG'3) y 1492R (5'TACGG(ACT)TACCTTGTTACGACTT'3). El programa para la amplificación fue el siguiente: la desnaturalización fue de 95°C durante 1 minuto, la hibridación 55°C por 1 minuto y la elongación de 72°C durante 1,5 minutos y se realizaron durante 25 ciclos. La secuenciación se realizó a través del método de Sanger (Macrogen, Corea), con los mismos cebadores.

Las secuencias obtenidas a partir del producto de la PCR se compararon con las secuencias de ADN que codifican para la región 16S de ARN ribosomal disponibles en la base de datos pública NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, EEUU.) mediante el algoritmo Blastn Clustal w (15).

Determinación del efecto de la cepa sobre el camarón *Litopenaeus vannamei*

Las larvas de camarones en estadio PL9 se sembraron en tanques plásticos con un volumen de 4L de agua a una densidad de 15 animales/l. La salinidad del agua fue de 32 g/l y la temperatura de 25 \pm 1°C. Los animales se alimentaron dos veces al día con nauplios de artemia congelados (Aquatic Eco-Systems Inc.). Diariamente se intercambiaba el 25% del volumen de cada tanque para eliminar las heces y restos de alimentos. Se realizó un diseño de clasificación simple. Los animales se seleccionaron al azar y se conformaron dos grupos experimentales con cuatro réplicas cada uno. El grupo 1 se trató cada 24 horas con 1-2 $\times 10^4$ ufc/ml de la cepa IC1 que se adicionó directamente al agua de cultivo. El grupo 2 se utilizó como control negativo y no se le aplicó ningún tratamiento. A los 25 días se pesaron los animales en una balanza analítica (Sartorius) después de colocarse durante 5 minutos sobre papel de filtro. También se determinó el comportamiento de los parámetros inmunológicos (actividad peroxidasa, fenoloxidasa (PO) y superóxido dismutasa (SOD)).

Ensayos bioquímicos

Preparación de las muestras

Cada una de las larvas se maceró en 300 μL de agua bidestilada con un homogenizador (Wiggenhauser, D-130, Malasia), se centrifugaron a 10000 rpm durante

10 minutos a 25°C y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Contenido de proteínas solubles totales.

La concentración de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford (16). 10 μl de cada muestra se distribuyeron en una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (Costar®, EE.UU), se añadieron 190 μL de reactivo de Bradford y se incubó 10 minutos a 25°C en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 620 nm de longitud de onda en un Multiscan (Titertek MCC/340). El ensayo se realizó por triplicado y las concentraciones de proteínas de las muestras se calcularon a partir de una curva patrón con albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma-Aldrich Chemie) en agua bidestilada.

Actividad específica de la enzima peroxidasa

A 20 μl de las muestras depositados en placas de 96 pocillos de fondo cóncavo (NUNC™ Brand Products, Dinamarca) se les añadió 50 μl de una solución de peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (0,15 % [V/V]) y o-fenilendiamina (OPD) (0,1 % [p/v]) en tampón sustrato pH 5 (Na_2HPO_4 0,05 M; ácido cítrico 0,02 M). Las muestras se incubaron 30 minutos a 25°C y se detuvo la reacción con 50 μl de ácido sulfúrico (2,5 M). Se midió la absorbancia a 492 nm (Titertek Multiskan MCC/340). La actividad se calculó a partir de una curva patrón con un anticuerpo monoclonal (contra hormona de crecimiento de tilapia) conjugado a peroxidasa de rábano (Heber Biotec, Cuba). Como control negativo se usó una solución de OPD (0,1 % [p/v]) y H_2O_2 (0,15 % [v/v]) en tampón fosfato pH 5. Una unidad de actividad específica se definió como la formación de 1 μmol de 2,3- diaminofenacina a partir de o-fenilendiamina por minuto de reacción por mg de proteínas solubles totales.

El cálculo se realizó a través de la siguiente ecuación:

$$AE = \left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right) (1/k) (\text{Vens}/\text{Venz}) / [P]$$

Donde:

A: absorbancia

[P]: concentración de proteínas solubles

K: pendiente de la formación de 2,3- diaminofenacina

Vens: volumen de ensayo de reacción

Venz: volumen de enzima

t: tiempo de reacción

Actividad específica de la enzima fenoloxidasa

A 10 μL de cada una de las muestras depositadas en pocillos de placas de poliestireno se añadieron 10 μl de tripsina al 0,5 % [p/v] en tampón cacodilato de

sodio (cacodilato de sodio (100 mM); $MgCl_2$ (50 mM); $CaCl_2$ (5 mM). Se incubaron 10 minutos a 25°C en la oscuridad y se le adicionaron 80 μ L de tampón cacodilato de sodio con L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) al 1.5% [p/v]. La medición de la absorbancia de las muestras antes y después de la incubación se realizó a 492 nm (Multiskan Titertek MCC/340). Como control negativo se usó la solución de tampón cacodilato de sodio. La actividad específica PO se definió como la variación de 0,001 unidades de absorbancia por minuto por μ g de proteínas solubles totales (17).

Actividad específica de la enzima superóxido-dismutasa

Se realizó según el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (22). A 10 μ l de las muestras se depositaron en cubetas de poliestireno (Kem-O-Mat® 2, Reino Unido). Se adicionaron 490 μ l de tampón fosfato (50 mM, pH 7,8) que contenía EDTA (0,1 mM), metionina (13 μ M) y riboflavina (20 μ M) y 10 μ l de nitroblue tetrazolio (NBT) (0,75 mM). Se midió la absorbancia inicial de las muestras a 560 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech). Después de 15 minutos de incubación a 25°C bajo la acción de luz fluorescente se repitió la determinación. Una unidad de actividad específica SOD se definió como la variación de 0,001 unidades de absorbancia por minuto por μ g de proteínas solubles en las postlarvas (18).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de los datos experimentales con empleo del programa GraphPad Prism versión 5.01, (19). La normalidad de los datos de peso de los animales experimentales, se comprobó a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, luego se realizó una prueba F para determinar la homogeneidad entre las varianzas. Las diferencias entre los grupos se determinaron a través de pruebas T. El mismo procedimiento se utilizó para el análisis de las actividades peroxidasa, PO y SOD.

RESULTADOS

La metodología empleada para el aislamiento de microorganismos potencialmente probióticos a camarón a partir de fermentaciones de col permitió la selección de IC1, cepa que mostró el mayor halo de inhibición (40 mm) en ensayos contra el patógeno oportunista *Vibrio harveyi* (Figura 1).

La presencia de compuestos antimicrobianos es uno de los mecanismos de acción más generalizados entre las bacterias ácido lácticas con características probióticas (9). *Lactobacillus* sp. IC1 en ensayos *in vitro* mostró halos de inhibición de crecimiento

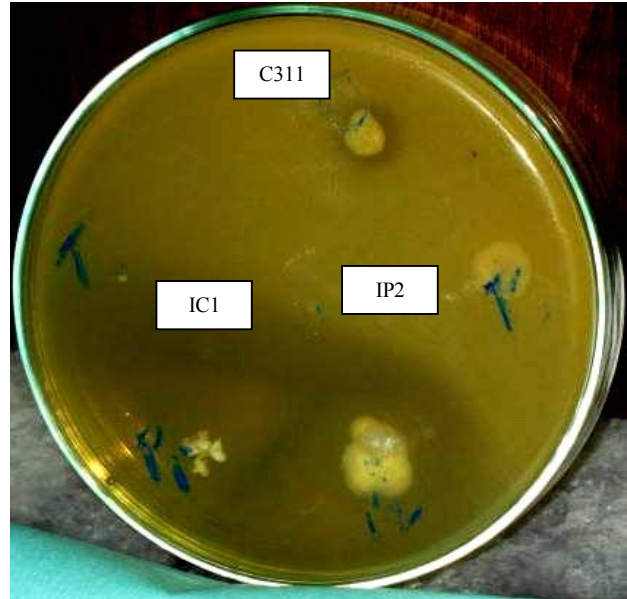


FIGURA 1. Inhibición de *V. harveyi* R1 por las cepas C31, IC1 y IP2./ *Inhibition of V. harveyi* R1 by the strain C31, IC1 and IP2.

de los microorganismos patrones *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25 853 (Tabla 1). Esto indica que la cepa produce compuestos antimicrobianos contra géneros bacterianos que se encuentran en la microbiota natural de los camarones y que en condiciones de estrés ambiental se suelen convertir en patógenos oportunistas.

TABLA 1. Resultado del ensayo de antagonismo microbiano de *Lactobacillus* sp. IC1 frente a diferentes microorganismos patrones./ *Lactobacillus* sp. IC1 microbial antagonist assay result against different pattern microorganisms.

Microorganismos	Halos de inhibición (diámetro (mm) \pm DE)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+ (11 \pm 1,4)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	- (0)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	- (0)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	- (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 10043	- (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25 853	+ (13 \pm 2,8)
<i>Vibrio harveyi</i> R1	+ (40 \pm 2,0)

IC1 es una bacteria Gram positiva en forma de bacilo, con reacción catalasa negativa, que no produce endosporas, por lo que se ubicó en el género *Lactobacillus*. Sus colonias son circulares de color blanco, opacas, superficie lisa y brillante y bordes enteros. La cepa es microaerofílica, reduce el nitrato a nitrógeno gaseoso y produce ácido a partir de un gran grupo de carbohidratos (Tabla 2).

TABLA 2. Características bioquímicas de la cepa IC1 (API 20A, Biomériux)./ *Biochemical characteristics of the strain IC1 (API 20A, Biomériux).*

Prueba	Resultado
Presencia de ureasa	negativa
Acidificación de glucosa	positiva
Acidificación de lactosa	positivo
Acidificación de manitol	positivo
Acidificación de salicina	positivo
Acidificación de xilosa	positivo
Acidificación de arabinosa	positivo
Hidrólisis de proteasas	negativa
Hidrólisis de β -glucosidasa	positivo
Acidificación de glicerol	positivo
Acidificación de celebiosa	positivo
Acidificación de manosa	positivo
Acidificación de melezitosa	positivo
Acidificación de rafinosa	positivo
Acidificación de sorbitol	positivo
Acidificación de rhamosa	positivo
Acidificación de trehalosa	positivo
Reducción de nitrato	positiva

La misma se identificó como *Lactobacillus* sp. a partir de la comparación de las secuencias de ADN que codifican para la región 16S del ARN ribosomal y de los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales. La cepa IC1 mostró un 99,9 % de homología con las secuencias de las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* depositadas en las bases de datos de GeneBank. El análisis de ARN ribosomal no permitió diferenciar estas dos especies que están genotípicamente muy cercanas y tienen además alta similitud fenotípica. La diferenciación de estas dos especies podría ser posible a través del análisis de la secuencia de los genes rec (20).

La aplicación de probióticos en la acuicultura disminuye las tasas de mortalidad larvaria y aumenta las tasas de crecimiento (21). En el caso de *Lactobacillus* sp. IC1 la exposición de postlarvas de camarón a concentraciones de $1-2 \times 10^4$ ufc/ml provocó un incremen-

to significativo de 1,3 veces del peso de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* con respecto al grupo control (Figura 2).

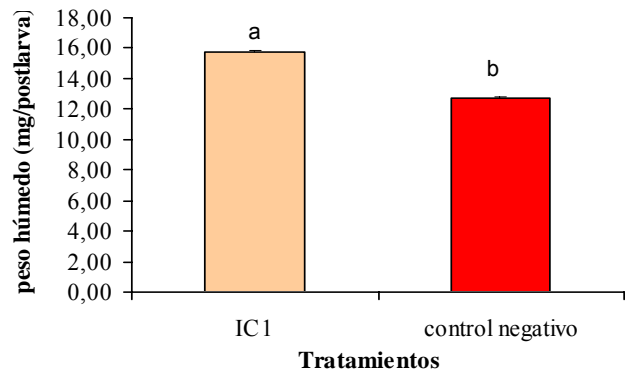


FIGURA 2. Efecto de *Lactobacillus* sp. IC1 sobre el peso de postlarvas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). (IC1) postlarvas tratadas con la cepa IC1. (Control negativo) postlarvas sin tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba T ($P < 0,05$)./ *Effect of Lactobacillus sp. IC1 on weight of white shrimp (Litopenaeus vannamei) postlarvae. (IC1) shrimp postlarvae treated with IC1 strain. (Negative control) shrimp postlarvae without treatment. Different letters represent significant differences in T test ($P < 0,05$).*

Otro mecanismo de acción encontrado entre las cepas probióticas es la modulación de la respuesta inmunológica no específica (22). Las actividades fenoloxidasas y superóxido dismutasa se incrementaron de forma significativa ($p < 0,05$), aunque la actividad peroxidasa se redujo (Figuras 3, 4 y 5).

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que es posible encontrar bacterias antagonistas *in vitro* a patógenos de camarón en fermentaciones ácido lácticas de vegetales. Este es un proceso microbiano complejo que conduce al predominio de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la microflora del vegetal que se emplea. Según Beauchamp *et al.* (18) en las primeras fases de este proceso intervienen bacterias y en menor medida levaduras. El aislamiento de *Lactobacillus* sp. IC1 corrobora el predominio de este género en las fermentaciones ácido lácticas de col. Las BAL son consideradas microorganismos generalmente reconocidos como seguros para el uso en alimentos, lo que reduce las pruebas de inocuidad que se emplean frecuentemente como probióticos (9). En humanos favorecen la salud mediante la reducción del colesterol, el mejoramiento

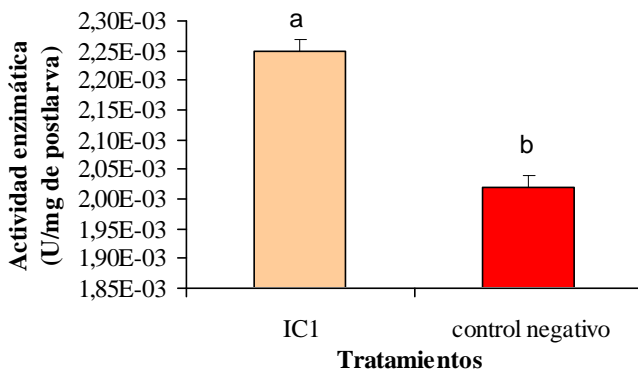


FIGURA 3. Efecto de *Lactobacillus* sp. C1 sobre la actividad de la enzima fenoloxidasa de postlarvas del camarón *L. vannamei*. (IC1) postlarvas tratadas con la cepa IC1. (Control negativo) postlarvas sin tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba T ($P < 0,05$)./ *Effect of Lactobacillus* sp. IC1 on phenoloxidase activity of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*) phenoloxidase. (IC1) postlarvae treated with IC1 strain. (Negative Control) postlarvae without treatment. Different letters represent significant differences in T test ($P < 0,05$).

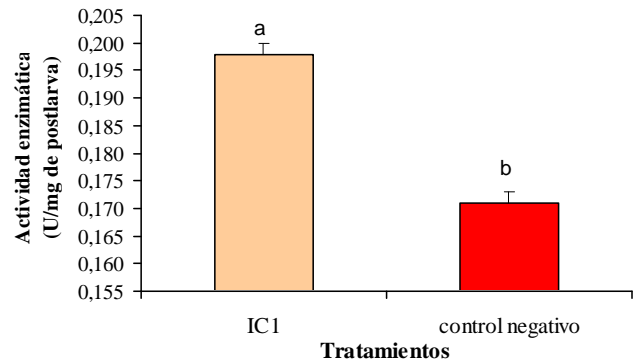


FIGURA 5. Efecto de *Lactobacillus* sp. IC1 sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa de postlarvas del camarón blanco *L. vannamei*. (IC1) postlarvas tratadas con la cepa IC1. (Control negativo) postlarvas sin tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba T ($P < 0,05$)./ *Effect of Lactobacillus* sp. IC1 on the enzymatic activity of the superoxid dismutase of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*). (IC1) postlarvae treated with IC1 strain. (Negative control) postlarvae without treatment. Different letters represent significant differences in T test ($P < 0,05$).

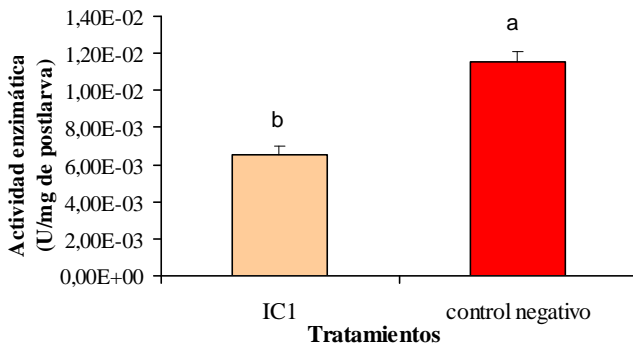


FIGURA 4. Efecto de *Lactobacillus* sp. IC1 sobre la actividad peroxidasa de postlarvas del camarón *L. vannamei*. (IC1) postlarvas tratadas con la cepa IC1. (Control negativo) postlarvas sin tratamiento. Letras diferentes representan diferencias significativas en la prueba T ($P < 0,05$)./ *Effect of Lactobacillus* sp. IC1 on peroxidase activity of white shrimp postlarvae (*Litopenaeus vannamei*). (IC1) postlarvae treated with IC1 strain. (Negative control) postlarvae without treatment. Different letters represent significant differences in T test ($P < 0,05$).

de la absorción de nutrientes y la microflora intestinal, además promueven la digestión de la lactosa, suministran algunas vitaminas, previenen algunos tipos de cáncer, infecciones virales y alergia y tienen efecto inmunomodulatorio (23).

En el cultivo de camarones se informó el uso de las BAL para el control de enfermedades. Kongnum y Hongpattarakere (8), por ejemplo, controlaron una infección inducida con *Vibrio harveyi* en *Litopenaeus vannamei* con una cepa de *Lactobacillus plantarum*.

La eficacia de un probiótico seleccionado *in vitro* puede cambiar cuando se administra al hospedero debido a factores complejos como la ingestión selectiva y la muerte en el tracto gastrointestinal causada por la incapacidad del probiótico para mantener su fisiología bajo circunstancias de una mayor interacción microbiana (24). Sin embargo, el empleo del probiótico potencial *Lactobacillus* sp. IC1 mostró resultados satisfactorios *in vivo* y resultó en un incremento significativo del peso de los camarones.

Los microorganismos probióticos pueden mostrar diversos mecanismos de acción. La competencia por nutrientes, la modulación de la respuesta inmunológica no específica, la producción de compuestos antimicrobianos y la competencia por el sitio de fijación en el tracto gastrointestinal, son algunos de los que más se evidencian en experimentos *in vitro* e *in vivo* (25,26). *Lactobacillus* sp. IC1 por su parte produce un compuesto antimicrobiano de gran actividad contra *V. harveyi* R1, lo que le permite tener ventaja competitiva respecto a esta especie que se encuentra habitualmente en el tracto intestinal de los camarones.

El ácido láctico, los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las antibiocias son algunos de los compuestos que pueden ser liberados por las BAL (27). Estos compuestos inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas e inducen mayor crecimiento y eficiencia en la alimentación (8,27,28,29). Se impone la necesidad de dilucidar por cuál de estos mecanismos *Lactobacillus* sp IC1 inhibe el crecimiento de *V. harveyi* *in vitro*.

El sistema complejo antioxidante de los organismos aeróbicos previene del efecto de las especies reactivas de oxígeno y también protege a las células del estrés oxidativo (30). Las defensas antioxidantes incluyen las enzimas ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD), las cuales eliminan el anión superóxido (31). El balance oxidante/antioxidante es determinante en la función inmunológica celular. En este sentido *Lactobacillus* sp IC1 presenta otro atributo de gran interés, eleva los niveles de fenoloxidasa y superóxido dismutasa, por lo que pudiera considerarse inmunoestimulante. Estas enzimas están relacionadas con la resistencia de los animales a infecciones bacterianas y virales (32). En *L. vannamei* tratado con *Lactobacillus plantarum* aumentó significativamente la actividad fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la actividad superóxido dismutasa (SOD), así como la transcripción del mRNA de peroxinectina (PE) y profenoloxidasa (proPO), lo que sugiere que esta cepa estimula el estado antioxidante del camarón a la misma vez que aumenta la respuesta inmune.

La menor actividad de la enzima peroxidasa pudiera deberse a que hay un incremento de la actividad de la enzima catalasa por la producción de H₂O₂ por *Lactobacillus* IC1 algo característico en este género. La enzima catalasa sólo difunde desde los peroxisomas cuando los niveles de este compuesto son elevados y en estas circunstancias los niveles de la enzima peroxidasa que actúa preferentemente sobre los peróxidos orgánicos o cuando los niveles de peróxidos inorgánicos son bajos, se reduce (33). Lo anterior sugiere la necesidad de determinar el comportamiento de la enzima catalasa en las postlarvas de camarón blanco cuando se adiciona esta cepa.

Los resultados indican que *Lactobacillus* sp. IC1 podría ser utilizado para prevenir y tratar enfermedades en los sistemas acuícolas intensivos de camarón, a la vez que estimule la ceba de los animales. Esta cepa podría permitir la implementación de nuevas estrategias en el desarrollo de productos probióticos a organismos acuáticos.

CONCLUSIONES

Las fermentaciones vegetales constituyen una fuente de gran interés para el aislamiento de bacterias probióticas a camarón. *Lactobacillus* sp. IC1 aislado de una fermentación vegetal del col y seleccionado mediante antagonismo *in vitro* al patógeno oportunista de camarón *Vibrio harveyi* R1 es un probiótico potencial para *Litopenaeus vannamei*. A concentraciones celulares de 10⁴ ufc/ml, favorece el aumento de peso de los animales y estimula su sistema inmune.

Lactobacillus sp. IC1 podría ser utilizado para prevenir y tratar enfermedades en los sistemas acuícolas intensivos para camarón y para acelerar la ceba de los animales. Es necesario realizar estudios para el escalado del cultivo y para el diseño de una formulación adecuada que garantice su empleo con eficiencia. Esta cepa puede permitir la implementación de nuevas estrategias en el desarrollo de productos probióticos a organismos acuáticos.

REFERENCIAS

1. Fisheries F. Aquaculture Department: The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. A report of the FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome. 2010.
2. Nimrat S, Boonthai T, Vuthiphandchai V. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. Anim. Feed Sci. Technol. 2011;169(3-4):244-258.
3. Soto-Rodríguez SA, Gomez-Gil B, Lozano R, del Rio-Rodríguez R, Diéguez AL, Romalde JL. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the «Bright-red» Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J Invertebr Pathol. 2012;109(3):307-317.
4. Hu Y-h, Deng T, Sun B-g, Sun L. Development and efficacy of an attenuated *Vibrio harveyi* vaccine candidate with cross protectivity against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 2012;32(6):1155-1161.
5. Luis-Villaseñor IE, Macías-Rodríguez ME, Gómez-Gil B, Ascencio-Valle F, Campa-Córdova ÁI. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the

- larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 2011;321(1-2):136-144.
6. Song ZF, An J, Fu GH, Yang XL. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*. 2011;319(1-2):188-193.
 7. Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;33(4):683-689.
 8. Kongnum K, Hongpattarakere T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(1):170-177.
 9. Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol*. 2013;33(1):1-10.
 10. Kandler O, Weiss N. Regular, nonsporing gram-positive rods. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 1986;2(2):1208-1234.
 11. De Man J, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Microbiol*. 1960;23(1):130-135.
 12. Liao C-H. Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. *Plant Dis*. 1989;73(3):223.
 13. Seeley HW, Vandemark P. *Microbes in Action: A Laboratory Manual of Microbiology*: WH Freeman, 1962, Reprinted Bombay DB Taraporevala; 1970.
 14. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*: CSHL press; 2001.
 15. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-4680.
 16. Bradford M A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(7):248-254.
 17. Cerenius L, Henttonen P, Lindqvist OV, Söderhäll K. The crayfish pathogen *Psorospermium haeckeli* activates the prophenoloxidase activating system of freshwater crayfish in vitro. *Aquaculture*. 1991;99(3):225-233.
 18. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971;44(1):276.
 19. Prism G. version 5.01. GraphPad Software Inc: San Diego, CA, USA. 2007.
 20. Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int J Food Microbiol*. 2010;144(2):270-279.
 21. Zhou X-X, Wang Y-B, Li W-F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. 2009;287(3-4):349-353.
 22. Tseng D-Y, Ho P-L, Huang S-Y, Cheng S-C, Shiu Y-L, Chiu C-S, et al. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol*. 2009;26(2):339-344.
 23. Kawahara T, Otani H. Stimulatory effect of lactic acid bacteria from commercially available Nozawana-zuke pickle on cytokine expression by mouse spleen cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(2):411-417.
 24. Liu K-F, Chiu C-H, Shiu Y-L, Cheng W, Liu C-H. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(5-6):837-844.
 25. Villamil L. Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón. *Bol Invest Cost*. 2009;38(2):165-167.

26. Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 2008;274(1):1-14.
27. Ma C-W, Cho Y-S, Oh K-H. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*. 2009;287(3-4):266-270.
28. Salinas I, Myklebust R, Esteban MA, Olsen RE, Meseguer J, Ringø E. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet Microbiol*. 2008;128(1-2):167-177.
29. Lee H-I, Kim MH, Kim KY, So J-S. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*. 2010;16(5):522-526.
30. Downs CA, Fauth JE, Woodley CM. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar Biotechnol*. 2001;3(4):380-397.
31. Campa-Córdova A, Hernández-Saavedra N, De Philippis R, Ascencio F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol*. 2002;12(4):353-366.
32. Martín L, Castillo NM, Arenal A, Rodríguez G, Franco R, Santiesteban D, et al. Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Aquaculture*. 2012;358-359(0):234-239.
33. Trasviña-Arenas CH, Garcia-Triana A, Peregrino-Urriarte AB, Yepiz-Plascencia G. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2013;164(1):44-52.

Recibido: 10-1-2012.

Aceptado: 7-6-2012.