



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EFFECTO DE *Nannochloropsis oculata* Y *Bacillus licheniformis* EN
EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y SISTEMA INMUNE DE
*Litopenaeus vannamei***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN ACUACULTURA**

**PRESENTA
DARIO ISRAEL GARCÍA MEDEL**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ALFREDO ORTEGA CLEMENTE**

ENERO 2021

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ, MÉXICO





Instituto Tecnológico de Boca del Río
Subdirección Académica
División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Boca del Río, Ver **30/NOVIEMBRE/2020**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

**DARIO ISRAEL GARCIA MEDEL
PASANTE DEL PROGRAMA MAESTRÍA EN
CIENCIAS ACUACULTURA
PRESENTE**

De acuerdo con el fallo emitido por los integrantes del Comité Revisor de la TESIS PARA OBTENCIÓN DE GRADO, desarrollada por usted cuyo título es:

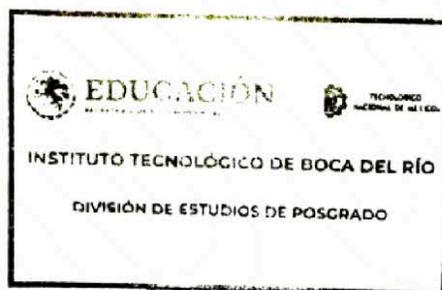
"Efecto de *Nannochloropsis oculata* y *Bacillus licheniformis* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*"

Esta División de Estudios de Posgrado e Investigación le concede **AUTORIZACIÓN** para que proceda a su impresión.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos

**M.C. ANA LETICIA PLATAS PINOS
JEFA DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

c.c.p. Coordinación del Programa MCA
c.c.p. Expediente





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Número Registro: No. AC2-15-171129

En la ciudad de Boca del Río, Ver., siendo las 10:00 horas del día 27 del mes de noviembre de 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Consejo del Posgrado de la Maestría en Ciencias en Acuicultura del ITBOCA, para examinar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de *Nannochloropsis oculata* y *Bacillus licheniformis* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*"

Que presenta el (la) alumno(a):

DARIO ISRAEL GARCIA MEDEL

Aspirante al Grado de:

Maestro en Ciencias en Acuicultura

Después de escuchar las opiniones sobre el documento escrito e intercambiar puntos de vista, los miembros de la Comisión manifestaron SU APROBACIÓN, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para su defensa ante el jurado correspondiente.

LA COMISIÓN REVISORA:

DR. LUIS ALFREDO ORTEGA

CLEMENTE

Director

DR. ANTONIO LUNA GONZÁLEZ

Co-Director

DR. CARLOS IVAN PEREZ ROSTRO

Asesor





“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

ACUERDO PARA USO DE OBRA (TESIS DE GRADO)

A QUIEN CORRESPONDA

PRESENTE

Por medio del presente escrito, Darío Israel García Medel (en lo sucesivo el AUTOR) hace constar que es titular intelectual de la obra denominada: “Efecto de *Nannochloropsis oculata* y *Bacillus licheniformis* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*”, (en lo sucesivo la OBRA) en virtud de lo cual autoriza al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Boca del Río (en lo sucesivo TECNMI/ITBOCA) para que efectúe resguardo físico y/o electrónico mediante copia digital o impresa para asegurar su disponibilidad, divulgación, comunicación pública, distribución, transmisión, reproducción, aplicación y uso de resultados así como digitalización de la misma con fines académicos y sin fines de lucro como parte del Repositorio Institucional del TECNMI/ITBOCA.

De igual manera, es deseo del AUTOR establecer que esta autorización es voluntaria y gratuita, y que de acuerdo a lo señalado en la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de Propiedad Industrial el TECNMI/ITBOCA cuenta con mi autorización para la utilización de la información antes señalada, estableciendo que se utilizará única y exclusivamente para los fines antes señalados. El AUTOR autoriza al TECNMI /ITBOCA a utilizar la obra en los términos y condiciones aquí expresados, sin que ello implique se le conceda licencia o autorización alguna o algún tipo de derecho distinto al mencionada respecto a la “propiedad intelectual” de la misma OBRA; incluyendo todo tipo de derechos patrimoniales sobre obras y creaciones protegidas por derechos de autor y demás formas de propiedad intelectual reconocida o que lleguen a reconocer las leyes correspondientes. Al reutilizar, reproducir, transmitir y/o distribuir la OBRA, se deberá reconocer y dar créditos de autoría de la obra intelectual en los términos especificados por el propio autor, y el no hacerlo implica el término de uso de esta licencia para los fines estipulados. Nada de esta licencia menoscaba o restringe los derechos patrimoniales y morales del AUTOR.

De la misma manera, se hace manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general de cualquier parte de la OBRA son responsabilidad de AUTOR, por lo que se deslinda al (TECNMI/ITBOCA) por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual, así como cualquier responsabilidad relacionada con la misma frente a terceros. Finalmente, el AUTOR manifiesta que estará depositando la versión final de su documento de Tesis, OBRA, y cuenta con los derechos morales y patrimoniales correspondientes para otorgar la presente autorización de uso.

En la ciudad de Boca del Río, del estado de Veracruz a los 28 días del mes de enero de 2021.

Atentamente,

Darío Israel García Medel

DECLARACION DE AUTENTICIDAD Y DE NO PLAGIO

Yo, Darío Israel García Medel identificado con no. control 16990169, alumno (a) del programa de la **Maestría en Ciencias en Acuicultura**, autor (a) de la Tesis titulada: “Efecto de *Nannochloropsis oculata* y *Bacillus licheniformis* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*” DECLARO QUE:

- 1.- El presente proyecto de investigación, que se desarrolla como tema de la tesis que presento para la obtención del grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS EN ACUACULTURA** es original, y es el resultado de una propuesta desarrollada de manera personal, el cual no he copiado de otro proyecto o informe de investigación, ni he utilizado ideas, fórmulas, ni citas completas derivadas de otra tesis, proyecto o informe técnico “stricto sensu”, así como ilustraciones, fotografías u otros materiales audiovisuales, obtenidos de cualquier tesis, obra, artículo, memoria, entre otros; en su versión digital o impresa.
- 2.- Declaro que el proyecto de investigación que pongo a consideración para su evaluación no ha sido presentado anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicado en sitio alguno.
- 3.- Declaro que las pruebas o experimentos derivados de esta investigación serán realizadas bajo el consentimiento de los involucrados y con fines estrictamente académicos conforme a criterios éticos de confidencialidad.

Soy consciente de que el hecho de no respetar los derechos de autor y hacer plagio, es objeto de sanciones Institucionales y/o legales por lo que asumo cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de irregularidades de la tesis, así como de los derechos sobre la obra presentada.

Asimismo, me hago responsable ante el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Boca del Río o terceros, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar por el incumplimiento de lo declarado.

De identificarse falsificación, plagio, fraude, o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, responsabilizándome por todas las cargas pecuniarias o legales que se deriven de ello sometiéndome a las normas establecidas en los Lineamientos y Disposiciones de la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México.

Boca del Río, Veracruz a 28 del mes de enero de 2021



Darío Israel García Medel

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la microalga *Nannochloropsis oculata* (NO) adicionada a diferentes concentraciones (0, 2.5, 5.0 y 7.5 g/kg) en un alimento comercial y del bacilo *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 (BL), adicionado en el agua de cultivo o en el alimento, a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 x 10⁶ UFC L⁻¹), en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (LV) retados con *Vibrio parahaemolyticus* (VP), utilizando la concentración letal media. Después de 30 días de bioensayo, los camarones alimentados con 5.0 y 7.5 g/kg NO, mostraron una tasa específica de crecimiento (6.35 y 6.34%, respectivamente) significativamente mayor ($P < 0.05$) con relación al control (5.64%). En cuanto al índice de productividad, sólo la concentración de 5.0 g/kg NO con 105.7 fue diferente ($P < 0.05$) del control (69.3). Aunque no existieron diferencias significativas entre tratamientos en la supervivencia de los camarones cuando fueron retados con VP, el tratamiento con 2.5 g/kg NO, presentó el valor más alto de supervivencia con un 25.8% y el control 12.1%. Para el caso de BL, Los resultados indican que la adición del bacilo a 3 x 10⁶ CFU/L incrementó significativamente ($P < 0.05$) la supervivencia de los camarones a hasta 53.4%. La expresión relativa de los genes de lisozima, penaeidina4, crustina y superóxido dismutasa, fueron sobre regulados en los tratamientos con bacilos en el alimento. El crecimiento se incrementó significativamente solo en el peso final en el tratamiento con bacilos en el agua a 3 x 10⁶ UFC/L. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos indican que *N. oculata* mejora el crecimiento de *L. vannamei* y la administración de *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua y en el alimento protege al camarón blanco contra *V. parahaemolyticus*, agente causal de AHPND. Por lo tanto, se concluye que *N. oculata* como *B. licheniformis* BCR 4-3 representan una buena alternativa para mejorar el crecimiento y la supervivencia, respectivamente, aumentando la productividad de los cultivos de camarón, por lo que se recomienda realizar nuevos estudios evaluando diferentes concentraciones y frecuencias de alimentación.

ABSTRACT

The effect of microalga *Nannochloropsis oculata* (NO) added to different concentrations (0, 2.5, 5.0 and 7.5 g kg⁻¹) in a commercial feed and the bacilli *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 (BL) added in the culture water or in the food, at different concentrations (1, 2 and 3 x 10⁶ CFU L⁻¹), in the growth, survival and immune response in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (LV) when challenged with a median lethal concentration of *Vibrio parahaemolyticus* (VP). After 30 days of bioassay, the shrimp fed with 5.0 and 7.5 g kg⁻¹ NO, showed a specific growth rate (6.35 and 6.34% respectively) significantly higher (P <0.05) in relation to the control (5.64%). Regarding the productivity index, only the concentration of 5.0 g kg⁻¹ NO with 105.7 was different (P <0.05) from the control (69.3). Although there were no significant differences between treatments in the survival of shrimp when challenged with VP, treatment with 2.5 g kg⁻¹ NO present the highest survival value with 25.8% and control 12.1%. In the case of BL, the results indicate that the addition of the bacillus to 3 x 10⁶ CFU L⁻¹ significantly increased (P <0.05) the survival of the shrimp to 53.4%. Relative expression of the lysozyme genes, penaeidin4, crustin, and super oxide dismutase, were upregulated in treatments with bacilli in the food. The growth was significantly increased only in the final weight in the treatment with bacilli in the water at 3 x 10⁶ CFU L⁻¹. The results obtained in the present study indicate that *N. oculata* improves the growth of *L. vannamei* and the administration of *B. licheniformis* BCR 4-3 in the culture water and in the commercial feed, protects the white shrimp against *V. parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND. Therefore, both *N. oculata* and *B. licheniformis* BCR 4-3, represent good alternatives to improve the growth and survival, respectively, increasing the productivity of shrimp cultures, so it is recommended to conduct new studies evaluating different concentrations and feeding frequencies.

DEDICATORIAS

A mis padres, por todo el cariño y enseñanzas que me brindaron durante su vida.

A mi esposa Erika, mi principal motor de vida

A mi Tío Leandro, mi primo Leandro y a mi hermano, que siempre han estado en los momentos más difíciles de mi vida para ayudarme y salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mis PADRES, por darme la vida, por todo su amor y cariño, pero sobre todo por darme, educación, valores y principios. Los amo y siempre agradecido con ellos.

A mi ESPOSA Erika, por ser mi compañera de vida, por todo el cariño y apoyo que siempre me ha dado, TE AMO.

A mi TIO Leandro, por siempre estar ahí como un segundo padre, por toda la ayuda económica que me brindó, pero sobre todo por su gran ejemplo de humildad, trabajo incansable y ayuda desinteresada.

A mi HERMANO Rodrigo (Lobillo), por todo su apoyo y porque siempre ha estado y estará para mí siendo una gran motivación de vida.

A mi PRIMO Leandro que lo quiero como un hermano, por todo el apoyo que siempre me ha brindado, su humildad y profesionalismo en la investigación son un gran ejemplo para mi vida además de ser un gran ser humano. ¡GRACIAS!

A mi DIRECTOR de Tesis, el Dr. Luis Alfredo Ortega Clemente, por haberme aceptado como estudiante, por todas sus enseñanzas, amistad y apoyo incondicional en todo momento de la tesis. ¡GRACIAS Doc!

A mi CODIRECTOR de Tesis, el Dr. Antonio Luna González, por haber aceptado, acogido y liderado el presente proyecto, su apoyo y buena disposición fueron

fundamentales para la culminación del mismo. Además, agradezco su calidad y comprensión como persona. ¡GRACIAS Doc!

A la Dra. Ruth Escamilla, al Dr. Arturo Fierro y al Dr. Genaro Diarte, por todas las enseñanzas y apoyo que me brindaron en el CIIDIR sobre todo en los aspectos de microbiología y bioquímica, además de su tiempo y amistad.

Al Dr. Píndaro Álvarez-Ruiz y a su esposa la M. en C. Carina Gámez Jimenez, por todas sus enseñanzas y apoyo brindado en las técnicas de PCR y expresión de genes, pero sobre todo por su amistad y calidez humana.

A todos mis profesores del ITBOCA, al Dr. Carlos Ivan Pérez-Rostro, la Dra. Martha Patricia Hernández-Vergara, el Dr. Alejandro Pérez-Legaspi, la Dra. Isabel García, la Dra. María del Refugio Castañeda y la Dra. Fabiola Lango, gracias por todas sus enseñanzas y apoyo durante toda la maestría.

A todos mis tíos, tías, primos y primas, que me estuvieron apoyando y mandándome siempre las mejores vibras y buenos deseos, sobre todo a mi tía Tere y mi tío Don José y a todas mis tías Medel por estar al pendiente de la familia.

A mis amigos de siempre: Guty, Luis Alfredo, Katy, Fortunato, Isabel Del Corral, Leti y Adriana.

A mis compañeros del CIIDIR-IPN, Karime, Paulina, Gaby, Gabyta, Ana Karen, Griselda, Claudia, Edén, así como a mis plebitas Deysi, Mitzy y Azucena, gracias por su tiempo, apoyo y amistad.

A todos mis amigos del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías, Leo, Juventino, América, Ruth, Erick, Sergio, Elizabeth y Mariana, gracias por amistad, apoyo y colaboración sobre todo en la fase del cultivo de *N. oculata*.

A todos mis amigos del ITBOCA, sobre todo a Julieta, Samuel y Clemente.

A todo el personal del ITBOCA que me apoyó de diversas maneras, sobre todo a la M. en C. Leticia Platas, Karina García y Andrés Cabrera.

Finalmente agradezco al Tecnológico Nacional de México por haber apoyado este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	vii
CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Necrosis hepatopancreática aguda	3
1.2 Signología Clínica	4
1.3 Mecanismo infeccioso y patogénico del AHPND	4
1.4 Manejo de Enfermedades	5
1.5 Inmunoestimulantes	5
1.5.1 Tipos de inmunoestimulantes	6
1.6 Mecanismos de defensa y sistema inmune en crustáceos	7
1.6.1 Mecanismos humorales	7
1.6.2 Mecanismos celulares	7
1.7 β-1,3 glucanos	8
1.8 <i>Nannochloropsis oculata</i>	8
1.9 Bacilos	9
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
6. ÁREA DE ESTUDIO	16
6.1 Etapas del estudio	16
6.1.1 Producción y obtención de biomasa de <i>N. oculata</i>	16
6.1.2 Bioensayos	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16

7.1 Obtención de camarones experimentales	16
7.2 Preparación del material	16
7.2.1 Preparación del agua de cultivo	16
7.2.2 Preparación de <i>B. licheniformis</i>	17
7.2.3 Cultivo y obtención de biomasa de <i>N. oculata</i>	17
7.2.4 Preparación de las dietas con <i>N. oculata</i>	17
7.2.5 Solución con bacilos.	18
7.2.6 Preparación de las dietas con <i>B. licheniformis</i>	18
7.2.7 Preparación de inóculo de <i>V. parahaemolyticus</i>	18
7.3 Diseño experimental	19
7.3.1 Bioensayos para determinar la concentración letal media de <i>V. parahaemolyticus</i> IPNGS16 en postlarvas y juveniles de <i>L. vannamei</i>	19
7.3.2 Bioensayo 1. Efecto de <i>N. oculata</i> , adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de <i>L. vannamei</i> retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	20
7.3.3 Bioensayo 2. Efecto de bacilos inoculados en el agua en la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	22
7.3.4 Bioensayo 3. Efecto de bacilos, adicionados en alimento y agua, en el sistema inmune y la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	23
7.3.5 Bioensayo 4. Efecto de <i>B. licheniformis</i> en el crecimiento de <i>L. vannamei</i>	24
7.3.6 Bioensayo 5. Efecto de bacilos, adicionados en el agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	24
7.3.7 Expresión de genes	25
7.4 Análisis estadístico	28
8. RESULTADOS	29
8.1 Bioensayo 1. Efecto de <i>N. oculata</i>, adicionada en el alimento, en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de <i>L. vannamei</i> retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	29
8.2 Bioensayo 2. Efecto de bacilos inoculados en el agua en la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	32
8.3 Bioensayo 3. Efecto de bacilos, adicionados en alimento y agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	34
Expresión de Genes	36
8.4 Bioensayo 4. Efecto de <i>B. licheniformis</i> en el crecimiento de <i>L. vannamei</i>	37
8.5 Bioensayo 5. Efecto de bacilos, adicionados en agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con <i>V. parahaemolyticus</i>	39
9. DISCUSIÓN	41
10. CONCLUSIONES	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de <i>L. vannamei</i> 1975-2015. FAO 2016.	2
Figura 2. Signología de AHPND (Thitamadee <i>et al.</i> , 2016).....	4
Figura 3. Cantidad de vibrios en el hepatopáncreas e intestino de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>N. oculata</i> adicionada en el alimento. Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); II) control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento); III) AC + <i>N. oculata</i> (2.5 g/kg de alimento); IV) AC + <i>N. oculata</i> (5 g/kg de alimento); V) AC + <i>N. oculata</i> (7.5 g/kg de alimento). Se indica el promedio \pm EE. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).....	30
Figura 4. Curvas de supervivencia acumulada de Kaplan–Meier respecto al tiempo (0, 24, 48, 72) en <i>L. vannamei</i> después del reto con <i>V. parahaemolyticus</i> . Los camarones fueron alimentados con dietas con <i>N. oculata</i> antes y después del reto. Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); II) control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento); III) AC + <i>N. oculata</i> (2.5 g/kg de alimento); IV) AC + <i>N. oculata</i> (5 g/kg de alimento); V) AC + <i>N. oculata</i> (7.5 g/kg de alimento). CL_{50} = 180,000 UFC/mL. Se indica el promedio \pm EE.	31
Figura 5. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC); II) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); III) AC + mezcla de 6 bacilos en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 166,660 UFC/L de cada bacilo) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> (1×10^6 UFC/L) en el agua cada 3 d + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); V) AC + mezcla de 6 bacilos + <i>B. licheniformis</i> en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 142,857 UFC/L de cada bacilo) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}). CL_{50} = 62,000 UFC/mL. Se indica el promedio \pm EE. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).	32
Figura 6. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC); II) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); III) AC + mezcla de 6 bacilos en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 166,660 UFC/L de cada bacilo) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> (1×10^6 UFC/L) en el agua cada 3 d + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); V) AC + mezcla de 6 bacilos + <i>B. licheniformis</i> en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 142,857 UFC/L de cada bacilo) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}). CL_{50} = 62,000 UFC/mL.....	33
Figura 7. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y alimento y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. I) control negativo, alimento comercial (AC); II) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); III) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL_{50}); V) AC + <i>B. licheniformis</i> en el agua (1×10^6 UFC/L) y en	

el alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀). Se indica el promedio \pm EE.	34
Figura 8. Curva de Supervivencia Kaplan-Meir de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y alimento y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. I) control negativo, alimento comercial (AC); II) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); III) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); V) AC + <i>B. licheniformis</i> en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀).....	35
Figura 9. Expresión relativa de genes de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> adicionado en el alimento y en el agua cada tres días, y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> (LC ₅₀) por inmersión. I) control positivo, alimento comercial (AC); II) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> ; III) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i> ; IV) AC + <i>B. licheniformis</i> en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + <i>V. parahaemolyticus</i>	36
Figura 10. Tasa de crecimiento específico de <i>L. vannamei</i> con <i>B. licheniformis</i> adicionado en el agua del sistema de cultivo. Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC); II) <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L); III) <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (2×10^6 UFC/L); IV) <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (3×10^6 UFC/L). Se indica el promedio \pm EE.....	37
Figura 11. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. Tratamientos: I) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); II) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); III) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (2×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (3×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀). Se indica el promedio \pm EE.....	39
Figura 12. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> en el agua y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> por inmersión. Tratamientos: I) control positivo, AC + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); II) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); III) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (2×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀); IV) AC + <i>B. licheniformis</i> adicionado al agua (3×10^6 UFC/L) + <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀). Se indica el promedio \pm EE.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers específicos usados para la amplificación por RT-qPCR de genes del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	26
Tabla 2. Crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia e índice de productividad de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>N. oculata</i>	29
Tabla 3. Mortalidad, supervivencia y supervivencia en porcentaje relativo (SPR) de <i>L. vannamei</i> alimentado con <i>N. oculata</i> a diferentes concentraciones y retado con <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀) por inmersión.....	31
Tabla 4. Mortalidad, supervivencia y supervivencia en porcentaje relativo (SPR) de <i>L. vannamei</i> tratado con bacilos en el agua cada 3 días y retados con <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀) por inmersión.	33
Tabla 5. Tasa de mortalidad, supervivencia, supervivencia en porcentaje relativo de <i>L. vannamei</i> tratados con <i>B. licheniformis</i> en el agua y en el alimento cada 3 días y retados con <i>V. parahaemolyticus</i> (CL ₅₀) por inmersión.	35
Tabla 6. Crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia e índice de productividad de <i>L. vannamei</i> tratado con <i>B. licheniformis</i> a 3 concentraciones 1, 2 y 3 x 10 ⁶ UFC/L	38

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la acuicultura se ha convertido en el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento (Ottinger *et al.*, 2016) con una tasa media de crecimiento anual de 5.8% (FAO, 2018). Este crecimiento se ha logrado debido a la tecnificación e intensificación de los sistemas de producción acuícola, lo que implica que los organismos cultivados presenten condiciones de hacinamiento. Sin embargo, el incremento en las densidades de carga de los cultivos aunado a otros factores estresantes como el excesivo manejo, cambios repentinos de temperatura, la pobre calidad de agua y deficiencias nutricionales, genera situaciones que comprometen y debilitan el sistema inmune de los organismos (Harikrishnan *et al.*, 2011; Reverter *et al.*, 2014). Todas estas condiciones favorecen el brote de enfermedades por patógenos que resultan en pérdidas parciales o totales de la producción, ocasionando importantes pérdidas económicas (Pohlenz y Gatlin, 2014).

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es una de las especies acuícolas más importantes a nivel mundial por su sabor, aceptación y gran demanda en el mercado (Teng *et al.*, 2017) así como su facilidad en el cultivo por ser tolerante a diferentes temperaturas y salinidades, soportar altas densidades, rápido crecimiento, elevada productividad, bajo requerimiento proteico y adaptabilidad a diferentes sistemas de producción (Rosenberry, 2003; Kumaran *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017;). Sin embargo, a pesar de incrementar 26 veces más su producción en las últimas dos décadas (e.i. pasó de una producción de 148,807 t en 1995 a 3,881,293 t en 2015 según la FAO (2016) (Fig. 1) y generar ganancias por más de 23 mil millones de dólares, el cultivo del camarón blanco ha sido fuertemente impactado por la presencia de diversos patógenos, principalmente virus y bacterias (Wongsasak *et al.*, 2015), amenazando la sustentabilidad de la industria. Flegel (2012) estima que el 80% de las pérdidas por enfermedad ocurridas en camarones se atribuyen a estos dos grupos (e.i. 60% a virus y 20% a bacterias).

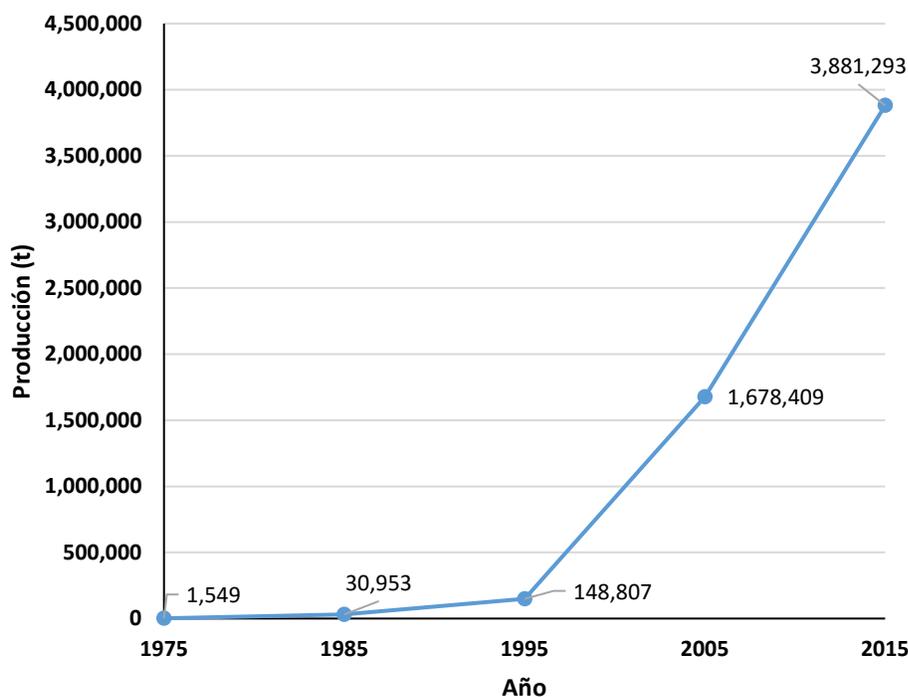


Figura 1. Producción mundial de *L. vannamei* (1975-2015). FAO, 2016.

Entre los patógenos que causan mayores pérdidas económicas al cultivo del camarón blanco podemos mencionar el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca o WSSV (e.i. White Spot Syndrome Virus, por sus siglas en inglés), virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica Hematopoyética o IHHNV (e.i. Infectious Hipodermal and Hematopoietic Necrosis Virus, por sus siglas en inglés), y Virus de la Mionecrosis Infecciosa o IMN (e.i. Infectious Myonecrosis, por sus siglas en inglés), (Karunasagar y Ababouch, 2012; Thitamadee *et al.*, 2016); y bacterias como *Hepatobacterium penaei*, que causa la enfermedad denominada Hepatopancreatitis Necrotizante o NHP (e.i. Necrotizing Hepatopancreatitis, por sus siglas en inglés) y bacterias del género *Vibrio* como *V. harveyi* (Torky *et al.*, 2016) y *V. parahaemolyticus*, la principal responsable de la enfermedad denominada Necrosis Hepatopancreática Aguda o AHPND (e.i. Acute Hepatopancreatitis Necrosis Disease, por sus siglas en inglés), mejor conocida como Síndrome de Mortalidad

Temprana o EMS (e.i. Early Mortality Syndrome, por sus siglas en inglés) (Boonchuen *et al.*, 2018).

1.1 Necrosis hepatopancreática aguda

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda se descubrió en el Sureste de China en 2009 y posteriormente fue reportada en Vietnam (2010), Malasia (2011), (Tailandia 2012), México (2013), Filipinas (2015) y Sudamérica 2016 (Lighner *et al.*, 2012; Fleger *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodríguez *et al.*, 2015). La mortalidad ocurre muy temprano, entre los 35 a 45 días después de la siembra de las postlarvas en los estanques de cultivo de camarón. Debido a esto, es que había sido nombrada en un inicio como “Síndrome de Mortalidad Temprana”, nombre que aún persiste. Sin embargo, el nombre de EMS puede genera confusión, ya que al inicio del cultivo pueden aparecer mortalidades por otras causas. De hecho, la definición de EMS no fue clara hasta 2011, donde el Dr. D.V. Lighter de la Universidad de Arizona, describió una histopatología única en camarones tomados de varios estanques de cultivo que habían reportado mortalidad temprana en China y Vietnam (Lighner *et al.*, 2012). La histopatología consistió de un masivo desprendimiento de células epiteliales tubulares hepatopancreáticas comenzando en el centro del hepatopáncreas y progresivamente hacia afuera de la región embrionaria (i.e. células E) y así fue finalmente denominada como Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome). Cabe mencionar que este desprendimiento ocurrió en la ausencia de algún patógeno asociado que pudiese ser la causa. El desprendimiento fue precedido por una carencia de diferenciación en las células tubulares epiteliales y agregación hemocítica en el hepatopáncreas antes del desprendimiento y fue seguida por una septicemia bacteriana hepatopancreática como invasión bacteriana secundaria (Thitamadee *et al.*, 2016).

1.2 Signología Clínica

Los signos clínicos de la enfermedad causada por AHPND incluyen letargia, lento crecimiento, nado errático, ataxia, anorexia, estómago e intestino medio vacío, hepatopáncreas encogido pálido a blanquecino, textura blanda y áspera de la cutícula (Lightner *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2014; Hong *et al.*, 2016; Dar *et al.*, 2019) (Fig. 2).

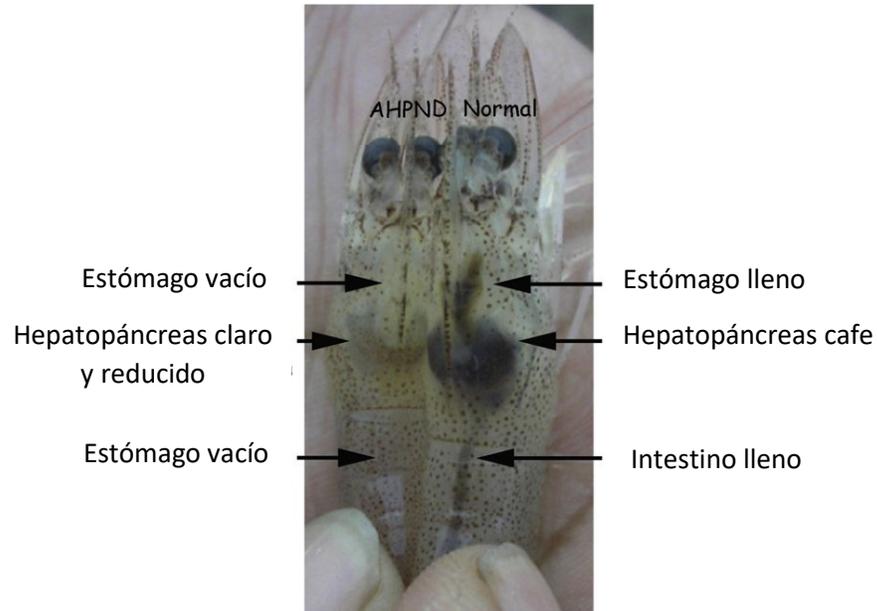


Figura 2. Signología de AHPND según Thitamadee *et al.* (2016).

1.3 Mecanismo infeccioso y patogénico del AHPND

El AHPND se origina cuando la cepa patogénica coloniza el estómago de los camarones, lugar desde el cual liberan dos toxinas con capacidad proteolítica denominadas Pir A y Pir B. Estas toxinas se acumulan y afectan el hepatopáncreas, generando desprendimientos celulares masivos y agudos, acompañados de necrosis (Lightner *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013; Pantoja y Lightner, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kumar *et al.*, 2019). En muchos casos las células desprendidas presentan núcleos cuasi normales, sin picnosis, cariólisis u otras lesiones aparentes (Varela-Mejías *et al.*, 2017).

Ambas toxinas son producidas y liberadas por bacterias que presentan el plásmido pVPA3-1, el cual contiene los genes que las codifican. Este plásmido presenta una longitud de 69 168 pares de bases y existen entre 7 a 121 copias por célula para cepas aisladas de México y Vietnam (Han *et al.*, 2015b). Las toxinas Pir A y Pir B tienen un peso molecular de 13 y 50 kDa, respectivamente (Han *et al.*, 2015b).

1.4 Manejo de Enfermedades

El tratamiento más común para controlar y erradicar patógenos como las bacterias es mediante la aplicación de agentes antimicrobianos o antibióticos. No obstante, su excesivo e inadecuado uso causa, entre otros efectos, generación y dispersión de patógenos y genes resistentes en el ambiente y en los alimentos, lo cual amenaza la seguridad alimentaria y el control de enfermedades en humanos (Pflomm, 2002; Sahul Hameed *et al.*, 2003; Cabello, 2006, Liu *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017, Gribogg *et al.*, 2020).

Debido a los daños contiguos que generan los antibióticos, en los últimos años se ha incrementado la demanda de productos orgánicos y, además, se han establecido grandes limitaciones y regulaciones para su uso, incluso a tal grado de prohibirlos en algunos países (Alderman *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015). Por esta razón, resulta fundamental encontrar alternativas orgánicas o sustentables al uso de agentes químicos que permitan controlar las enfermedades, garantizar la salud del consumidor, y mantener los ritmos de crecimiento de la acuicultura (Hoseinifar *et al.*, 2014; Santos y Ramos, 2018).

1.5 Inmunoestimulantes

Para evitar el uso de antibióticos, se han aplicado vacunas, sin embargo, debido a su alto costo y a la especificidad de los patógenos de las vacunas comerciales, muchos productores han empezado a examinar el uso de inmunoestimulantes a base de extractos naturales, los cuales tienen una actividad de amplio espectro y no generan efectos secundarios indeseables por lo que

representan un enfoque ambientalmente más amigable (Harikrishnan *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Dawood *et al.*, 2018). La palabra inmunoestimulante, se refiere a cualquier sustancia que se utiliza en algún organismo con el intento de mejorar la reactividad inmune y mejorar la resistencia y/o supervivencia posterior a la infección por microorganismos nocivos (Smith, 2003). Además de los inmunoestimulantes, se ha despertado un gran interés en el uso de probióticos que aceleren el crecimiento y mejoren la respuesta inmune en contra de patógenos. Los probióticos se definen como “microorganismos vivos, los cuales cuando se suministran en cantidades adecuadas confieren beneficio a la salud de su hospedero” (FAO/WHO 2001). A pesar de esta definición, los probióticos en acuicultura pueden ser preparaciones vivas o muertas, incluyendo componentes celulares/extracelulares de microorganismos, suministrados en el alimento o en el agua de cultivo, que proporciona beneficio al hospedero al mejorar su resistencia a enfermedades, crecimiento y estado de salud, inmunidad, conversión/utilización de alimento, balance microbiano y mejora de la calidad de agua (Merrifield *et al.*, 2010; Hai 2015; Wang *et al.*, 2019).

1.5.1 Tipos de inmunoestimulantes

Los principales estimulantes utilizados en acuicultura son: polisacáridos (e.g. B-glucanos, quitosan, peptidoglicanos), nutrientes (e.g. vitamina C y E), hierbas chinas (e.g. *Rheum officinale*, *Andrographis paniculata*, *Scutellaria*, *Astragalus*, *Lonicera*), péptidos antibacteriales y microorganismos (Wang *et al.*, 2017). Para entender cómo funcionan los inmunoestimulantes se debe conocer los mecanismos de defensa que intervienen en los crustáceos que a continuación se describen brevemente.

1.6 Mecanismos de defensa y sistema inmune en crustáceos

El caparazón constituye la primera barrera física que protege a los crustáceos de lesiones y ataques por microorganismos. El exoesqueleto está compuesto de carbonato de calcio, carbohidratos y proteínas, y contribuye a diferentes procesos fisiológicos asociados con la respuesta inmune (Mylonakis y Aballay, 2005). Además del caparazón, los crustáceos presentan mecanismos de defensas humorales y celulares, a través de las cuáles se desarrollan los principales procesos que integran el sistema inmune.

1.6.1 Mecanismos humorales

Los mecanismos humorales incluyen las lectinas, péptidos antimicrobianos, y enzimas lisosomales. **Las lectinas** son proteínas no enzimáticas o glicoproteínas que actúan en la opsonización, aglutinación, fagocitosis y encapsulación de patógenos. **Los péptidos antimicrobianos** son proteínas catiónicas anfipáticas de bajo peso molecular, tienen actividad de amplio espectro y presentan baja citotoxicidad a células animales. Su función es perforar las membranas celulares de las bacterias, hongos, parásitos y virus.

Las enzimas lisosomales degradan la pared celular de las bacterias Gram negativas, y modifican la conformación molecular de pared celular permitiendo así su reconocimiento por las células fagocíticas (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

1.6.2 Mecanismos celulares

Los mecanismos celulares se llevan a cabo por los hemocitos. Los hemocitos son células circulantes que se asemejan a los leucocitos en los vertebrados, debido a que su principal función es el reconocimiento y eliminación de material extraño, así como en procesos de coagulación (Vásquez *et al.*, 2009). Es importante mencionar, que, a diferencia de los vertebrados, el sistema inmune de los crustáceos carece de inmunidad adaptativa y depende exclusivamente de su

inmunidad innata, la cual se activa cuando patrones moleculares asociados a un patógeno son reconocidos por superficies solubles o celulares de proteínas receptoras.

1.6.2.1 Hemocitos

Existen 3 tipos de hemocitos: hialinocitos, granulocitos y semigranulocitos. Los hialinocitos representan del 5 al 15% de los hemocitos circulantes (CE), y su principal función está relacionada a la coagulación y fagocitosis (Zhang *et al.*, 2006). Los granulocitos representan el 10 al 20% de los CE y su actividad consiste en fagocitar y almacenar la enzima profenoloxidasa (proFO). Estas células podrían estimularse por β -1,3 glucanos, peptidoglicanos, y lipopolisacáridos para provocar exocitosis y liberar la enzima. Su función consiste en la encapsulación, iniciar la cascada proFO y fagocitosis. Finalmente, la función de los semigranulocitos, los cuales poseen receptores β -1,3 glucanos, incluye la fagocitosis, encapsulación y coagulación (Zhang *et al.*, 2006).

1.7 β -1,3 glucanos

Los β -1,3 glucanos son el mayor componente de la pared celular de bacterias y levaduras y se considera que representan el inmunoestimulante más promisorio debido su estructura química bien definida y modo de acción en el sistema inmune en teleósteos (Raa, 2000). Se han realizado diversos estudios tanto en camarones como en langostinos que indican que los glucanos son capaces de mejorar el crecimiento y la resistencia a bacterias y virus (Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Meshram *et al.*, 2014).

1.8 *Nannochloropsis oculata*

En acuicultura, se han utilizado diversos tipos de inmunoestimulantes incluyendo agentes químicos, componentes bacterianos, polisacáridos y extractos

de animales, hongos y plantas (Harikrishnan *et al.*, 2011, Vallejos-Vidal *et al.*, 2016; Dawood *et al.*, 2018; Mohan *et al.*, 2019, Amenyogbe *et al.*, 2020). *N. oculata* es una microalga que por sus características nutricionales es frecuentemente utilizada para el cultivo de *Artemia* y rotíferos que se emplean como alimento vivo de estadios larvales de peces, crustáceos y moluscos (Apt y Berens, 1999). *N. oculata*, posee una enorme cantidad de β -1,3 glucanos (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017) y de ácido ascórbico (Brown y Miller, 1992), que fortalecen el sistema inmune. Asimismo, Hafsa *et al.* (2017) encontraron que *N. oculata* posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticolinesterasas.

1.9 Bacilos

Los bacilos son bacterias Gram positivas en forma de bastón (Wang *et al.*, 2017), formadoras de endosporas que pueden sobrevivir a condiciones ambientales hostiles (Almeida *et al.*, 2018). Son las bacterias más antiguas que se conocen y están ampliamente distribuidas en el mundo natural incluyendo ambientes marinos (Liu *et al.*, 2015). El género *Bacillus* representa el grupo de especies de probióticos más empleado en la industria de la camaronicultura ya que posee la capacidad de adhesión y libera una gran cantidad de compuestos antimicrobianos y exoenzimas, mejorando así la respuesta inmune contra patógenos; promueve el crecimiento y mejora la calidad del agua de cultivo sin presentar efectos deleterios colaterales (Gomez y Shen 2008). Entre las especies de bacilos más utilizadas como probióticas en el cultivo del camarón se encuentran cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Sadat *et al.*, 2018); sin embargo, aún falta por desarrollar nuevos trabajos de investigación que utilicen diferentes cepas, ya sea solas o en conjunto y que aporten evidencias más sólidas que ayuden a comprender de mejor manera su efecto inmunoestimulante contra diversos patógenos, así como en el desarrollo y crecimiento del mismo.

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto del probiótico *B. licheniformis* BCR 4-3 y la microalga *N. oculata*, adicionados en el agua y la dieta, en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune del camarón blanco *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

2. ANTECEDENTES

Uno de los trabajos que integra el sistema inmune en crustáceos lo desarrolló Johanson y Soderhall (1989), discuten la función del sistema de la profenoloxidasa en las reacciones celulares inmunes en el cangrejo de río *Astacus astacus* y *Pacifastacus leniusculus*. Raa (2000), publicó un trabajo de revisión donde menciona que el uso de β -1,3 glucanos puede mejorar la salud, el crecimiento y el desarrollo general de diferentes grupos de animales, incluyendo camarones, peces y animales terrestres. Smith (2003), realizó una revisión de los mecanismos del sistema inmune en crustáceos, así como de los diferentes grupos de compuestos que han sido reportados como inmunoestimulantes. Dicho autor reporta las proteínas que han sido secuenciadas en diversos estudios y destaca la presencia de profenoloxidasa en el camarón tigre, *Penaeus monodon* y los β -1,3 glucanos en el cangrejo del pacífico *Pacifastacus leniusculus*.

Vaseeharan y Ramasamy (2003) cultivaron camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) inoculando en el agua 10^6 - 10^8 UFC/mL de *Bacillus subtilis* BT23. Después de 6 días de tratamiento con el bacilo, los camarones fueron retados con *Vibrio harveyi* (10^3 - 10^4 UFC/mL). Los resultados mostraron una reducción de hasta un 90% en la mortalidad acumulada en los organismos tratados con el bacilo.

Gullian *et al.* (2004) evaluaron la cepa *Bacillus* P64 en *L. vannamei* y observaron que ésta tenía efectos inhibitorios contra *V. harveyi* y una actividad inmunoestimulante dada por un incremento significativo en las células hialinas y la actividad de la fenoloxidasa respecto al grupo control.

Zokaeifar *et al.* (2014) evaluaron, durante 8 semanas, 2 cepas de *B. subtilis* (L10 y G1) en el agua del sistema de cultivo de *L. vannamei* inoculado con *V. harveyi*. La mortalidad acumulada del control fue del 80%, mientras que en los tratamientos con el bacilo fue 36.7%-50%. La expresión de 5 genes del sistema inmune (profenoloxidasa, peroxinectina, proteína de unión a lipopolisacáridos, proteína de unión a glucanos y proteasa serina) se incrementó significativamente en los tratamientos con la bacteria probiótica.

Chai *et al.* (2016) realizaron un bioensayo de 30 días con con *L. vannamei* alimentado con el probiótico *Bacillus* PC465 y retado con WSSV. Los resultados mostraron un aumento en el crecimiento, supervivencia, digestión y absorción de nutrientes. Además, los autores reportan un aumento en la estructura microbiana en el intestino y en la respuesta inmune.

Chang *et al.* (2013) evaluaron el efecto del extracto de la planta acuática *Eichhornia crassipes* sobre la respuesta inmune y la resistencia a *Lactococcus garvieae* en el langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii*. Se encontró que la tasa de supervivencia (63 y 53, respectivamente) fue significativamente más alta en los tratamientos (3 y 2 g kg⁻¹, respectivamente) que en el grupo control (23%). Meshram *et al.* (2015) investigaron el efecto de los β-glucanos suministrados en la dieta de *M. rosenbergii* contra *A. hydrophila*, los resultados indicaron que una dosis de 1.0 g kg⁻¹ podría mejorar la supervivencia y la respuesta inmune de los individuos evaluados. Recientemente, Maliwat *et al.* (2017) utilizaron la microalga *Chlorella vulgaris* en la dieta de postlarvas de *M. rosenbergii*, para evaluar su efecto en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune. Después de 50 días de experimentación, la tasa de crecimiento (1.47 y 1.34%, respectivamente) fue significativamente más alta en las postlarvas alimentadas con el 4 y 6% de la microalga y el porcentaje de mortalidad disminuyó significativamente de 53% (control) a 18% en el tratamiento con 6% de microalga, al infectarlas con *A. hydrophila*. Además, las postlarvas alimentadas con *C. vulgaris* mostraron un incremento en la actividad de profenoloxidasa y en el conteo total de hemocitos.

Medina-Félix *et al.* (2014) evaluaron la supervivencia de *L. vannamei* alimentado con dos concentraciones (1 y 2%) de la microalga *Dunaliella* sp. y retado con WSSV. Se observó una mayor supervivencia en los tratamientos (80%) con la microalga respecto al grupo control (55%).

Medina-Félix *et al.* (2017) evaluaron la supervivencia de *L. vannamei* alimentado con diferentes concentraciones (1.5, 2, 2.5 y 3%) de la microalga *Dunaliella* sp. y retado con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Se observó una mayor supervivencia (30.9%) del camarón en el tratamiento con 3% de microalga en comparación con el control positivo sin microalga (10.1%) y retado con el vibrio.

3. JUSTIFICACIÓN

La intensificación de los sistemas productivos genera situaciones de estrés en los organismos cultivados las cuales son aprovechadas por microorganismos patógenos para provocar enfermedades que causan mortalidades y ocasionan pérdidas económicas para el productor. El uso inadecuado de antibióticos para el control de estas enfermedades, genera efectos adversos al ambiente y resistencia antimicrobiana, por lo cual es necesario buscar alternativas al uso de los antibióticos como lo son los extractos microalgales, plantas y probióticos.

El presente estudio tiene como propósito evaluar el posible efecto inmunoestimulante de *N. oculata* adicionada a una dieta comercial y *B licheniformis* BCR 4-3 en el agua de cultivo en juveniles de *L. vannamei*, camarón de gran importancia comercial en México y el mundo que en los últimos años se ha mermado su producción por diversos patógenos como *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

4. HIPÓTESIS

La incorporación de *N. oculata* en un alimento comercial y *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua ayudará a mejorar el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune en *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de *N. oculata*, adicionada en un alimento comercial, y *B. licheniformis* BCR 4-3, adicionada en el agua y alimento, en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de *L. vannamei* cultivado en laboratorio y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

5.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto de *N. oculata*, adicionada en un alimento comercial, en el **crecimiento, supervivencia y respuesta inmune** de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.
- II. Evaluar el efecto de *B. licheniformis* BCR 4-3 y la mezcla de seis *Bacillus* spp., adicionada en el agua de cultivo, en la **supervivencia** de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.
- III. Evaluar el efecto de *B. licheniformis* BCR 4-3, adicionada en el agua de cultivo y en el alimento, en la **supervivencia y respuesta inmune** de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.
- IV. Evaluar el efecto de *B. licheniformis* BCR 4-3, adicionada en el agua de cultivo, en el **crecimiento y supervivencia** de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

6. ÁREA DE ESTUDIO

6.1 Etapas del estudio

El trabajo experimental se realizó en dos etapas: 1) Producción y obtención de biomasa de *N. oculata* y 2) Bioensayos.

6.1.1 Producción y obtención de biomasa de *N. oculata*

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías (LBMB) del Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz.

6.1.2 Bioensayos

Se llevaron a cabo en el Laboratorio de Acuicultura del CIDIIR-IPN en Guasave, Sinaloa.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de camarones experimentales

Los camarones experimentales se obtuvieron de laboratorios comerciales de postlarvas y de la granja acuícola Cuate Machado (Guasave, Sinaloa). Los camarones fueron transportados al Laboratorio de Acuicultura del CIIDIR en recipientes de plástico con agua de los estanques de cultivo y oxigenación con piedra difusora. Los animales se aclimataron a 30‰ de salinidad, se mantuvieron a temperatura ambiente y aeración constante y se alimentaron con alimento Purina[®] (35% de proteína) a las 08 h, 13 h y 17 h. A los camarones se les hizo un análisis con la PCR de punto final para determinar si estaban libres de WSSV e IHNV.

7.2 Preparación del material

7.2.1 Preparación del agua de cultivo

Se utilizó agua hipersalina (90-100‰) previamente tratada con cloro durante un día. Después de la cloración (1.25%) se puso aire con piedras difusoras para eliminar el cloro presente por volatilización. El agua que se utilizó en los bioensayos

se conservó a 30%, la cual se preparó en una tina con agua hipersalina filtrada con una malla de algodón de 20 μm y se ajustó con agua dulce libre de cloro.

7.2.2 Preparación de *B. licheniformis* BCR 4-3

B. licheniformis BCR 4-3 (Escamilla-Montes *et al.*, 2015) se cultivó en medio tripticasa de soya caldo a 32 °C durante 48 h y luego se centrifugó a 5,000 g por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en una solución con NaCl al 3% antes de ser inoculada en el agua del cultivo de camarón de acuerdo a Escamilla-Montes *et al.* (2015). La solución bacteriana fue ajustada espectrofotométricamente a una densidad de 1 a 580 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 2[®] (Thermo Scientific).

7.2.3 Cultivo y obtención de biomasa de *N. oculata*

El cultivo de *N. oculata* para la obtención de biomasa para la formulación del alimento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Bioenergías (LBMB) del Instituto Tecnológico de Boca del Río, Veracruz.

Se obtuvieron dos sets (uno para el experimento de crecimiento y supervivencia y otro para el experimento del sistema inmune) de 500 g de concentrado de *N. oculata* (1 kg, base seca), cultivada en fotobioreactores de 180 L a 175 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 22 °C; la cosecha fue en fase estacionaria.

7.2.4 Preparación de las dietas con *N. oculata*

El alimento comercial (35% de proteína) se pulverizó en un molino (Nutribullet[®]) para agregar la microalga. Se formó una pasta con la mezcla, añadiendo agua y grenetina (por cada kilogramo de alimento preparado se utilizaron 40 g de grenetina y 410 mL de agua destilada) y se hicieron de nuevo los pellets en un molino de carne (Torrey[®] M22-R).

Los pellets se secaron en el laboratorio a temperatura ambiente con un ventilador por 24 h. Se preparó alimento para 30 d y se almacenó a -20 °C. Para el tratamiento control se sustituirá el aditivo de interés por celulosa.

7.2.5 Solución con bacilos

Se pesaron 0.8 g de Dry oil y se agregaron 5 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 20 mL. Se calentó a 40 °C y se disolvió perfectamente. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez que se enfrió la mezcla, se adicionaron 1.6 mL de *B. licheniformis* BCR 4-3, llevados a una densidad de 1 a 580 nm, y se aforó a 10 mL agregando 3.4 mL de agua destilada.

7.2.6 Preparación de las dietas con *B. licheniformis* BCR 4-3

Se pesaron 25 g de alimento comercial (Purina®, 35% de proteína) de 2.5mm y se trituró hasta obtener partículas de 1.5mm con la ayuda de un pistilo y mortero de porcelana. El alimento triturado se colocó sobre una bolsa de plástico y se expandió uniformemente para posteriormente adicionarle la solución de 10 mL de *B. licheniformis* (utilizando un atomizador (Trupper®) previamente preparada. Después de agregarle la solución, el alimento se dejó secar durante 1 h con un ventilador de mesa (Atvio®) y posteriormente quedó listo para su utilización.

7.2.7 Preparación de inóculo de *V. parahaemolyticus* IPNGS16

Se preparó el inóculo a partir de un cultivo de la cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (López-León *et al.*, 2016). El cultivo bacteriano se centrifugó a 3,900 x g durante 20 min y el pellet se resuspendió en solución salina (2.5% NaCl). La suspensión bacteriana se ajustó a una densidad de 1 a 580nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 2® y se infectó con ella los camarones, inoculando la bacteria en el agua con las concentraciones predeterminadas de acuerdo al conteo previo (López-León *et al.*, 2016).

7.3 Diseño experimental

7.3.1 Bioensayos para determinar la concentración letal media de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 en postlarvas y juveniles de *L. vannamei*

Antes de cada bioensayo se realizó una prueba (4 d) para determinar la concentración letal media de *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (López-León *et al.*, 2016). Se utilizaron peceras de vidrio (6 L) con 4 L de agua de mar filtrada (20 µm), a 30‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Camaronina (35% Purina®, México) ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Se colocaron 10 camarones por tina o garrafón de plástico.

Los tratamientos se hicieron por triplicado. Los camarones se retaron con la cepa *V. parahaemolyticus* IPNGS16, inoculada en el agua, a diferentes concentraciones. Tratamientos: I) Control, Camaronina. II) Camaronina + *Vibrio* (100 UFC/mL); III) Camaronina + *Vibrio* (1,000 UFC/mL); IV) Camaronina + *Vibrio* (10,000 UFC/mL); V) Camaronina + *Vibrio* (50,000 UFC/mL); VI) Camaronina + *Vibrio* (100,000 UFC/mL); VII) Camaronina + *Vibrio* (1000,000 UFC/mL). Durante cada bioensayo se registró la mortalidad y al final del mismo, la supervivencia. Se tomaron las variables fisicoquímicas del agua (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) y los organismos estuvieron sujetos a fotoperiodo natural.

Determinación de CL₅₀

A partir de los resultados de las pruebas anteriores se determinó la concentración de *Vibrio* con la cual el 50% de los organismos bajo tratamiento mueren (CL₅₀) y con la que se trabajará en la segunda parte del estudio referida a la determinación del efecto de los aditivos en la supervivencia de *L. vannamei*, infectado experimentalmente con *V. parahaemolyticus* IPNGS16.

El cálculo de la CL₅₀ se realizó mediante el análisis Probit (Finney, 1952), el cual es un tipo de regresión utilizada para variables con respuestas binomiales, siendo su principal uso la determinación de la CL₅₀. En este caso se utilizó el paquete estadístico PASW Statistics 18 para determinar la CL₅₀.

7.3.2 Bioensayo 1. Efecto de *N. oculata*, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

El bioensayo duró 39 d. Se utilizaron camarones de 178 ± 10 mg y se determinó previamente si venían infectados con WSSV o *V. parahaemolyticus* IPNGS16 desde la granja. Se utilizaron tinas de plástico (180 L) con 50 L de agua de mar filtrada (20 μ m), a 30 ‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Camaronina (35% Purina®, México), ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Para mantener la temperatura en la noche se les colocó un plástico negro y se aseguraron con una liga. Se colocaron 15 juveniles por tina. El *Vibrio* (CL₅₀= 180,000 UFC/mL) se inoculó en el agua en el día 36. La última aplicación de bacilos fue en el día 36. El bioensayo constó de 5 tratamientos por triplicado: **I)** control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **II)** control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **III)** AC + *N. oculata* (2.5 g/kg de alimento) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **IV)** AC + *N. oculata* (5 g/kg de alimento) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **V)** AC + *N. oculata* (7.5 g/kg de alimento) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀). Los animales se alimentaron con el equivalente al 10% de la biomasa de camarones y semanalmente se realizaron biometrías para ajustar la tasa de alimentación de acuerdo a las tablas de Purina. Diariamente se midieron parámetros fisicoquímicos del agua como oxígeno disuelto (YSI® Pro20), temperatura-pH (Hanna® Hi98130) y salinidad (LaMotte®). Las tinas se limpiaron por sifoneo dos veces por semana y se hizo un recambio del 15-50% del agua. Al final de cada sifoneo, se contaron los pellets no consumidos. Para determinar la cantidad de alimento no consumido, se multiplicó el número de pellets no consumidos por el peso promedio de los pellets (i.e. 0.002 g). El peso promedio de los pellets se obtuvo pesando 10 muestras de 10 pellets c/u (i.e. 100 pellets).

Parámetros de crecimiento y productividad

Al final del día 30, se determinó el peso final, la tasa de supervivencia, el peso ganado, el factor de conversión alimenticia (FCA), y la tasa crecimiento específica (TCE) conforme a Felix y Sudharsan (2004), de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Peso ganado (g/camarón) = Peso final (g) – Peso inicial (g)

Factor de conversión alimenticia (FCA) = Total de alimento suministrado (g)/Peso ganado (g).

Tasa de crecimiento específica (TCE; %/día) = $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días} \times 100$

Tasa de supervivencia (%) = (Número final/Número inicial) x 100.

Índice de productividad (IP) = Ganancia en peso (g) x Supervivencia (%) / (10 x FCA)

Análisis microbiológico (cuantificación de vibrios)

El día 35 del bioensayo, con la ayuda de una pinza, se tomó una muestra de intestino y hepatopáncreas de un individuo por tina (3 por tratamiento) y se colocaron en un Tubo Eppendorf (previamente pesado). Antes de cada muestreo la pinza se esterilizó quemándola con alcohol al 96%. A cada tubo se le añadieron 400 mL de solución salina (NaCl 2.5%) con una pipeta (Biopette®). Con ayuda de un pistilo de plástico, se maceró el intestino y hepatopáncreas y posteriormente se añadieron 600 mL de solución salina para obtener una alícuota de 1 mL.

De cada muestra se realizaron dos diluciones, 10^{-1} y 10^{-2} , las cuales se colocaron en tubos Falcón con 9 mL de solución salina (NaCl 2.5%). Se inocularon 100 μ L de cada dilución en cajas Petri con 20 mL de cultivo TCBS agar. Finalmente, las cajas Petri inoculadas se incubaron por 24 h a 30 °C.

Los organismos muertos se cuantificaron a las 24, 48 y 72 h post infección y se determinó la supervivencia final.

7.3.3 Bioensayo 2. Efecto de bacilos inoculados en el agua en la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

El bioensayo duró 17 d. Se utilizaron camarones de 207 ± 4.48 mg y se determinó previamente si venían infectados con WSSV o *V. parahaemolyticus* IPNGS16 desde la granja. Se utilizaron peceras de vidrio (6 L) con 4 L de agua de mar filtrada ($20 \mu\text{m}$), a 30 ‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Camaronina (35% Cargill®, México) ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Se colocaron 10 juveniles por pecera. El *Vibrio* ($\text{CL}_{50} = 62,000$ UFC/mL) se inoculó en el agua en el día 14. La última aplicación de bacilos fue en el día 13. El bioensayo constó de 5 tratamientos por triplicado: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **III)** AC + mezcla de 6 bacilos en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 166,660 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **IV)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua cada 3 d + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **V)** AC + mezcla de 6 bacilos + *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 142,857 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}). Los animales se alimentaron con el equivalente al 20% de la biomasa de camarones y se ajustó a la baja de acuerdo a las tablas de Purina. La determinación de parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, pH y salinidad) se determinaron diariamente. Las tinas se limpiaron por sifoneo cada 3 d y se hizo un recambio del 50% del agua. Los bacilos se aplicaron después de la limpieza y recambio de agua. En el día 13 se hizo la última limpieza, un recambio de agua del 80% y la última aplicación de bacilos. La supervivencia se determinó diariamente. La salinidad se mantuvo en 30 g/L. La temperatura en 29.75 ± 0.5 , pH 8.5 ± 0.5 y oxígeno 5.0 ± 0.5 mg/L. Los organismos muertos se cuantificaron a las 24, 48 y 72 h post infección y se determinó la supervivencia final.

7.3.4 Bioensayo 3. Efecto de bacilos, adicionados en alimento y agua, en el sistema inmune y la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

El bioensayo duró 15 d. Se utilizaron camarones de 213.4 ± 5.0 mg y se determinó previamente si venían infectados con WSSV o *V. parahaemolyticus* IPNGS16 desde la granja. Se utilizaron peceras de vidrio (6 L) con 4 L de agua de mar filtrada (20 μ m), a 30 ‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Provimi (40% Cargill®, México) ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Se colocaron 10 juveniles por pecera. El *Vibrio* ($CL_{50} = 77,000$ UFC/mL) se inoculó en el agua en el día 12. La última aplicación de bacilos fue en el día 11. El bioensayo constó de 5 tratamientos por triplicado: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **III)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **IV)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **V)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}). Los animales se alimentaron con el equivalente al 10% de la biomasa de camarones y se ajustó a la baja de acuerdo a las tablas de Purina. La determinación de parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, pH y salinidad) se determinaron diariamente. Las tinas se limpiaron por sifoneo cada 3 d y se hizo un recambio del 50 % del agua. Los bacilos se aplicaron después de la limpieza y recambio de agua. En el día 11 se hizo la última limpieza, un recambio de agua del 80% y la última aplicación de bacilos. En el día 11 también se tomaron los organismos (2 por tina, 6 por tratamiento, con excepción del control positivo) para el análisis de expresión de genes del sistema inmune. A cada organismo se le quitó el caparazón con una pinza de disección y se guardó en 1 mL de RNALater. La salinidad se mantuvo en 30 g/L. La temperatura en 29.75 ± 0.5 , pH 8.5 ± 0.5 y oxígeno 5.0 ± 0.5 mg/L. Los organismos muertos se cuantificaron a las 24, 48 y 72 h post infección y se determinó la supervivencia final.

7.3.5 Bioensayo 4. Efecto de *B. licheniformis* BCR 4-3 en el crecimiento de *L. vannamei*

El bioensayo duró 29d. Se utilizaron camarones de 120 ± 10 mg y se determinó previamente si venían infectados con WSSV o *V. parahaemolyticus* IPNGS16 desde la granja. Se utilizaron tinas de plástico (180 L) con 50 L de agua de mar filtrada (20 μ m), a 30 ‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Camaronina (35% Purina®, México), ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Para mantener la temperatura en la noche se les colocó un plástico negro y se aseguraron con una liga. Se colocaron 15 juveniles por tina. El bioensayo constó de 4 tratamiento por triplicado: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (1×10^6 UFC/L); **III)** *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (2×10^6 UFC/L); **IV)** *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (3×10^6 UFC/L). Los animales se alimentaron con el equivalente al 10% de la biomasa de camarones y se ajustó a la baja de acuerdo a las tablas de Purina. Cada semana se realizaron biometrías para ajustar la tasa de alimentación. La determinación de parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, pH y salinidad) se determinaron diariamente. Las tinas se limpiaron por sifoneo dos veces por semana y se hizo un recambio del 15-50% del agua.

7.3.6 Bioensayo 5. Efecto de bacilos, adicionados en el agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus*

El bioensayo duró 17 d. Se utilizaron camarones de 335.5 ± 7.0 mg y se determinó previamente si venían infectados con WSSV o *V. parahaemolyticus* IPNGS16 desde la granja. Se utilizaron peceras de vidrio (6 L) con 4 L de agua de mar filtrada (20 μ m), a 30 ‰ de salinidad, aeración constante y se alimentaron 2 veces al día (08:00 y 16:00 h) con Camaronina (35% Cargill®, México) ajustando la cantidad de alimento de acuerdo a la biomasa de los camarones. Se colocaron 10 juveniles por pecera. El *Vibrio* ($CL_{50} = 156,000$ UFC/mL) se inoculó en el agua en el día 14. La última aplicación de bacilos fue en el día 14. El bioensayo constó de 4

tratamientos por triplicado: **I)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **II)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **III)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (2 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **IV)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 adicionado al agua (3 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀). Los animales se alimentaron con el equivalente al 10% de la biomasa de camarones y se ajustó a la baja de acuerdo a las tablas de Purina. La determinación de parámetros fisicoquímicos (oxígeno disuelto, pH y salinidad) se determinaron diariamente. Las tinas se limpiaron por sifoneo cada 3 d y se hizo un recambio del 50 % del agua. Los bacilos se aplicaron después de la limpieza y recambio de agua. En el día 14 se hizo la última limpieza, un recambio de agua del 80% y la última aplicación de bacilos. La salinidad se mantuvo en 30 g/L. Temperatura (29.75 ± 0.5, pH 8.5 ± 0.5 y oxígeno de 5.0 ± 0.5 mg l⁻¹. Los organismos muertos se cuantificaron a las 24, 48 y 72 h post infección y se determinó la supervivencia final.

7.3.7 Expresión de genes

7.3.7.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

Los camarones en RNALater (2 por tina, 6 por tratamiento) se lavaron con solución salina (NaCl 2%) y se colocaron en tubos con Trizol[®] frío para macerarlos y extraer el ARN total conforme a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN total extraído se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro (Implen, Inc. Westlake Village, CA, USA). Posteriormente, se trató el ARN con DNasa 1 (1 U/μL, Sigma[®] Aldrich, St. Louis, MO, USA). La transcripción reversa (RT-PCR) se utilizó para sintetizar la primera cadena de ADNc usando la enzima transcriptasa reversa (Improm II, Promega[®], Madison, WI, USA) con el primer Oligo dT₂₀ a partir de 500 ng de ARN total; las condiciones para la RT-PCR fueron 42 °C por 60 min. El ADNc se suspendió en 80 μL de agua ultrapura y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Cinco microlitros de este ADNc diluido se usó como templado en las reacciones de PCR en tiempo real (qRT-PCR).

7.3.7.2 Análisis de expresión de genes relacionados con el sistema inmune mediante qPCR

La expresión de cuatro genes relacionados con el sistema inmune, superóxido dismutasa (SOD), penaeidina 4, crustina y lisozima en hemocitos, se determinó mediante PCR cuantitativo (tiempo real) usando el sistema CFX96 y el gestor de datos CFX versión 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Adicionalmente, se analizó la expresión de tres genes constitutivos usados como genes de referencia (40S-S24, β -actina y EF1 α). La expresión de los genes de interés se normalizará con respecto a la media geométrica de los genes de referencia más estables. Para seleccionar los genes de referencia con mayor estabilidad, ésta fue analizada en las muestras separadas obtenidas de hemocitos, usando los algoritmos GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) de la aplicación en línea RefFinder (<http://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/>). Las secuencias de los primers para la qPCR se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Primers específicos usados para la amplificación por RT-qPCR de genes del camarón blanco *L. vannamei*.

Gen	Secuencia del primer (5'-3')	Referencia
Genes de referencia		
40S_S24		(Álvarez-Ruíz <i>et al.</i> , datos no publicados)
Sentido	5'-CAGGCCGATCAACTGTCC-3'	
Contrasentido	5'-CAATGAGAGCTTGCCTTTCC-3'	
β -actina		(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Sentido	5'-CCACGAGACCACCTACAAC-3'	
Contrasentido	5'-AGCGAGGGCAGTGATTTC-3'	
EF1 α		(Álvarez-Ruíz <i>et al.</i> , datos no publicados)
Sentido	5'-GTTGACTTGAAGGGCAATG-3'	
Contrasentido	5'-CTTCTTGGCTTCGATTCTG-3'	

Genes del sistema inmune		
Superóxido dismutasa (SOD) Sentido Contrasentido	5'-ATCCACCACACAAAGCATCA-3' 5'-AGCTCTCGTCAATGGCTTGT-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Penaeidina 4 Sentido Contrasentido	5'-GCCCCGTTACCCAAACCATC-3' 5'-CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Crustina (CR) Sentido Contrasentido	5'-ATTCTGTGCGGCCTCTTTAC-3' 5'-ATCGGTCGTTCTTCAGATGG-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Lisozima Sentido Contrasentido	5'-GAAGCGACTACGGCAAGAAC-3' 5'-AACCGTGAGACCAGCACTCT-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2010)

Se estandarizó la cantidad de primers a utilizar para la cuantificación de la expresión relativa de cada gen. Se realizó un pool tomando 3 μ L de cada una de las muestras (un camarón) de ADNc. Posteriormente se realizaron 5 diluciones seriadas (1:5, 100 μ L de pool de ADNc/400 μ L de agua ultrapura). Se determinó la eficiencia de la reacción construyendo para cada gen de interés una curva estándar a partir de los valores de ciclo umbral (C_q) de las diluciones seriadas (triplicado) y utilizando las condiciones de amplificación que más adelante se detallan. Se realizó un análisis de regresión lineal simple, se determinó el coeficiente de correlación (R^2) y a partir de los valores de la pendiente se calculó la eficiencia de reacción para cada gen de estudio. Para valores de eficiencia menores a 90% se repitió el procedimiento de estandarización aumentando (de 0.7 a 1.0 μ L) la cantidad de primers (10 μ M c/u).

Para verificar la ausencia de dímeros de primers se realizó un análisis de la curva de disociación (Curva de *Melting*). Para ello se incrementó la temperatura de 65 a 95 $^{\circ}$ C, con un aumento de 0.5 $^{\circ}$ C cada 5 s.

La expresión relativa del ARNm de los camarones en los tratamientos con aditivos se determinará relativamente por el método de $\Delta\Delta Ct$ con las mejoras propuestas por (Vandesompele *et al.*, 2002; Hellemans *et al.*, 2007). Este algoritmo permite el uso de varios genes de referencia logrando una expresión génica normalizada más precisa, según la ecuación siguiente:

$$R = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{ref_0}^{\Delta Ct, ref_0}}}$$

Donde R indica la expresión génica relativa, E es la eficiencia de amplificación de cada gen, ΔCt es la diferencia entre el Ct de dos muestras, goi indica el gen de interés, y ref los genes de referencia.

7.4 Análisis estadístico

Previo a los análisis de datos, se realizaron pruebas de normalidad (Lilieford) y homoscedasticidad (Barlett). Los datos de supervivencia se transformaron a arcoseno para su análisis. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y pruebas de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software Statistica 7 (StatSoft).

8. RESULTADOS

8.1 Bioensayo 1. Efecto de *N. oculata*, adicionada en el alimento, en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de *L. vannamei* retado con *V. parahaemolyticus*

La tabla 2 resume los resultados de crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia e índice de productividad de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata*. La supervivencia fue del 100% en todos los tratamientos. En la TCE (que toma en cuenta el peso inicial y el final) del camarón alimentado con *N. oculata*, se observó un crecimiento significativamente menor en el control negativo (I) respecto a los tratamientos III ($p= 0.036$) y IV ($p= 0.039$) en donde los camarones se alimentaron con microalga. La tasa de conversión alimenticia disminuyó en el tratamiento III (5 g de microalga/kg de alimento); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). En los resultados de la TCE se observa que los tratamientos III y IV son iguales; sin embargo, en el tratamiento III se observa que el índice de productividad fue significativamente mayor ($p<0.05$) que en el resto de los tratamientos.

Tabla 2. Crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia e índice de productividad de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata*.

Parámetro	Control		N 2.5 g/kg (III)		N 5 g/kg (IV)		N 7.5 g/kg (V)	
Peso inicial (g)	0.181	± 0.01	0.176	± 0.01	0.184	± 0.01	0.168	± 0.01
Peso final (g)	0.99	± 0.15	1.02	± 0.14	1.24	± 0.09	1.12	± 0.07
Ganancia de peso (g)	11.16	± 1.95	11.66	± 1.86	14.61	± 1.23	13.17	± 0.83
TCE (%/d)	5.64b	± 0.35	5.84ab	± 0.30	6.35a	± 0.27	6.34a	± 0.21
Supervivencia (%)	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00
FCA	1.62	± 0.15	1.58	± 0.04	1.38	± 0.05	1.57	± 0.15
IP	69.3b	± 7.81	74.1b	± 13.72	105.7a	± 8.98	84.6b	± 8.96

Tratamientos: I) control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); II) AC + *N. oculata* (2.5 g/kg de alimento); III) AC + *N. oculata* (5 g/kg de alimento); IV) AC + *N. oculata* (7.5 g/kg de alimento). Se indica el promedio ± EE. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$). TCE: Tasa de crecimiento específico. FCA: Factor de conversión alimenticia. IP: Índice de productividad

Análisis de la carga de vibrios en camarón alimentado con *N. oculata*

No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre tratamientos en la concentración total de vibrios en el hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata*. Sin embargo, se observó una disminución conforme aumentó la concentración de la microalga en el alimento. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el número de colonias verdes y amarillas entre tratamientos, pero se observó que las colonias verdes tienden a disminuir y las amarillas a aumentar conforme aumenta la concentración de la microalga en el alimento (Fig. 3).

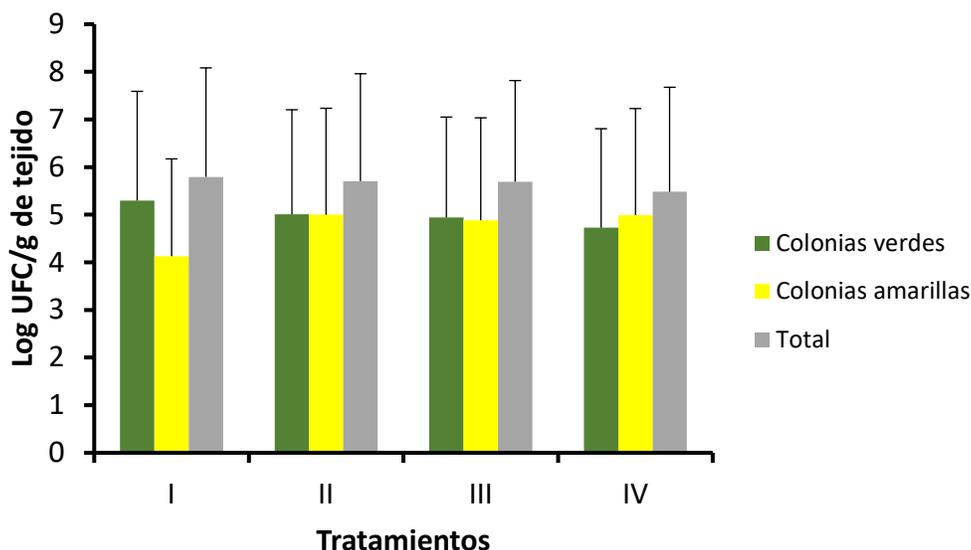


Figura 3. Cantidad de vibrios en el hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata* adicionada en el alimento. Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **II)** control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **III)** AC + *N. oculata* (2.5 g/kg de alimento); **IV)** AC + *N. oculata* (5 g/kg de alimento); **V)** AC + *N. oculata* (7.5 g/kg de alimento). Se indica el promedio \pm EE. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$).

En la figura 4 y tabla 4 se resumen los resultados de supervivencia de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata* y retado con *V. parahaemolyticus*. En el control negativo la supervivencia fue del 100% lo que indica un buen manejo del cultivo. Como era de esperarse, la supervivencia fue significativamente mayor ($p<0.05$) que el resto de los tratamientos. Respecto al control positivo, los tratamientos con la microalga no fueron significativamente diferentes. Entre los tratamientos con la microalga, el

tratamiento III con la menor concentración (2.5 g/kg de alimento) tuvo una supervivencia significativamente más alta que los tratamientos IV (5.0 g/kg de alimento, $p=0.006$) y V (7.5 g/kg de alimento, $p=0.018$).

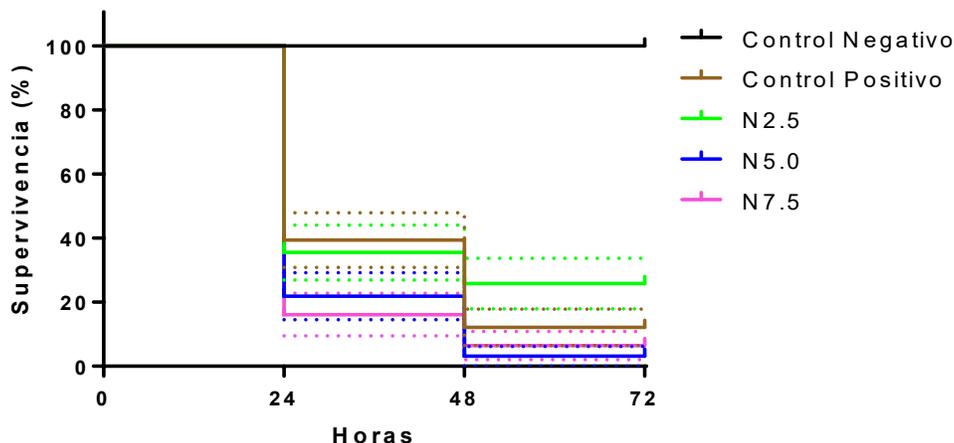


Figura 4. Curvas de supervivencia acumulada de Kaplan–Meier respecto al tiempo (0, 24, 48, 72) en *L. vannamei* después del reto con *V. parahaemolyticus*. Los camarones fueron alimentados con dietas con *N. oculata* antes y después del reto. Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **II)** control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **III)** AC + *N. oculata* (2.5 g/kg de alimento); **IV)** AC + *N. oculata* (5 g/kg de alimento); **V)** AC + *N. oculata* (7.5 g/kg de alimento). $CL_{50}=180,000$ UFC/mL. Se indica el promedio \pm EE.

Tabla 3. Mortalidad, supervivencia y supervivencia en porcentaje relativo (SPR) de *L. vannamei* alimentado con *N. oculata* a diferentes concentraciones y retado con *V. parahaemolyticus* (CL_{50}) por inmersión.

Tratamientos	Mortalidad (%)	Supervivencia (%)	SPR
II Control positivo + Vp	87.9	12.1	-
III No + Vp	74.2	25.8	15.19 \pm 6.20
IV No + Vp	96.9	3.1	-10.31 \pm 3.44
V No + Vp	93.5	6.5	-6.52 \pm 3.63

Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC) + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **II)** control positivo, AC + celulosa (7.5 g/kg de alimento); **III)** AC + *N. oculata* (2.5 g/kg de alimento); **IV)** AC + *N. oculata* (5 g/kg de alimento); **V)** AC + *N. oculata* (7.5 g/kg de alimento). $CL_{50}=180,000$ UFC/mL. SPR= Supervivencia en porcentaje relativo. No= *N. oculata*. Vp= *V. parahaemolyticus*. Se indica el promedio \pm EE.

8.2 Bioensayo 2. Efecto de bacilos inoculados en el agua en la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

Las figuras 5 y 6 y la tabla 4 resumen los resultados obtenidos en el bioensayo donde se inoculó el agua de los sistemas de cultivo de camarón blanco con el probiótico *B. licheniformis* BCR 4-3 y el patógeno *V. parahaemolyticus* IPNGS16. En el control negativo (I) se muestra una supervivencia del 100%, lo que indica un manejo adecuado del cultivo. Respecto a los tratamientos con bacilos, sólo se observó una supervivencia significativamente mayor en el tratamiento IV (*B. licheniformis*) respecto al control positivo (II, $p= 0.013$) y al tratamiento III (mezcla de 6 bacilos, $p= 0.002$).

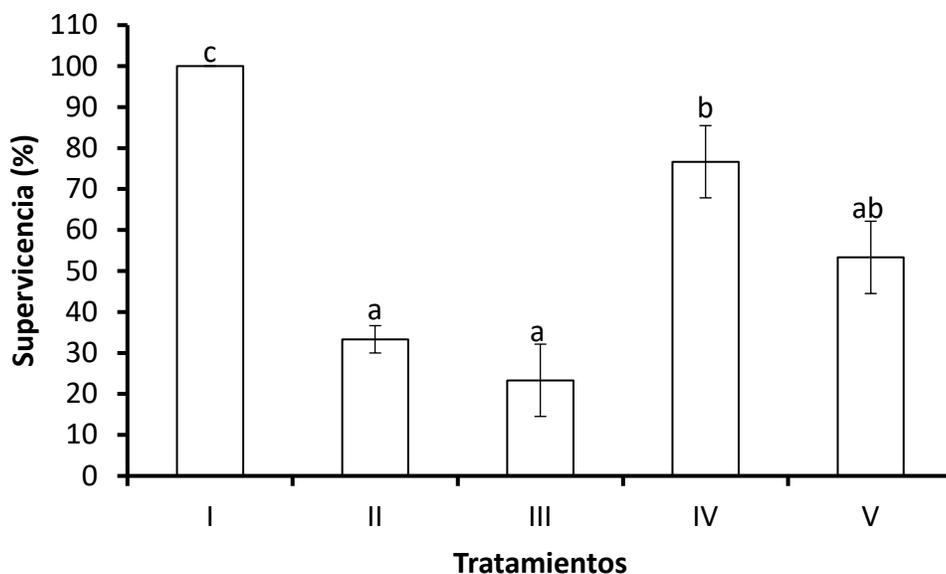


Figura 5. Supervivencia de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 por inmersión. Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **III)** AC + mezcla de 6 bacilos en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 166,660 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **IV)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 (1×10^6 UFC/L) en el agua cada 3 d + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}); **V)** AC + mezcla de 6 bacilos + *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua cada 3 d (1×10^6 UFC/L, 142,857 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}). $CL_{50}= 62,000$ UFC/mL. Se indica el promedio \pm EE. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 05$).

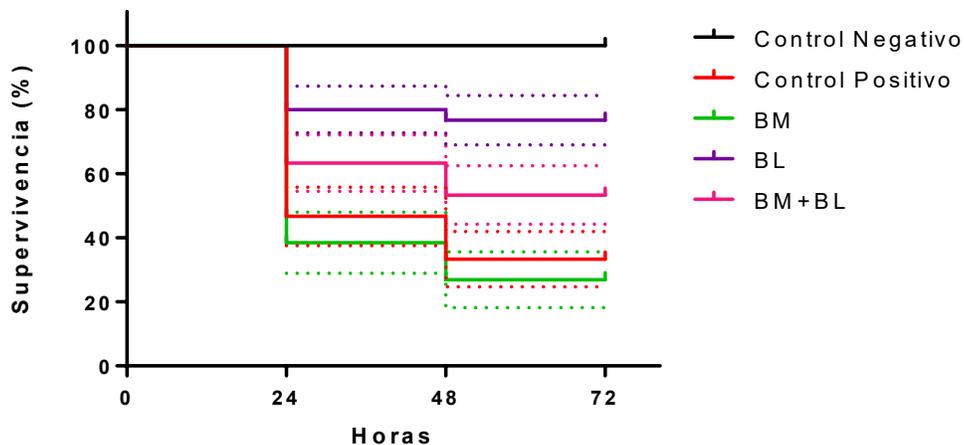


Figura 6. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 por inmersión. Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **III)** AC + mezcla de 6 bacilos en el agua cada 3 d (1 x 10⁶ UFC/L, 166,660 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **IV)** AC + *B. licheniformis* BCR 4-3 (1 x 10⁶ UFC/L) en el agua cada 3 d + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀); **V)** AC + mezcla de 6 bacilos + *B. licheniformis* BCR 4-3 en el agua cada 3 d (1 x 10⁶ UFC/L, 142,857 UFC/L de cada bacilo) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀). CL₅₀= 62,000 UFC/mL.

Tabla 4. Mortalidad, supervivencia y supervivencia en porcentaje relativo (SPR) de *L. vannamei* tratado con bacilos en el agua cada 3 días y retados con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀) por inmersión.

Tratamientos	Tasa de Mortalidad	Tasa de Supervivencia (%)	SPR
I	66.7	33.3	-
II	76.7	23.3	-15
III	23.3	76.7	65
IV	46.7	53.3	30

Tratamientos: **I)** Control Positivo, *V. parahaemolyticus* IPNGS16; **II)** mezcla de bacilos (BM, 1 x 10⁶ UFC/L, 166,660 de cada cepa) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16; **III)** *B. licheniformis* BCR 4-3 (1 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16; **IV)** BM (857,142 UFC/L) + *B. licheniformis* BCR 4-3 (142,857 UFC/L) + *V. parahaemolyticus* IPNGS16. LC₅₀= 62,000 UFC/mL. SPR= Porcentaje relativo de supervivencia.

8.3 Bioensayo 3. Efecto de bacilos, adicionados en alimento y agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16

La figura 7 resume los resultados obtenidos en el bioensayo donde se adicionó el bacilo y el vibrio en el agua y el mismo bacilo en el alimento. En el control negativo (I) se muestra una supervivencia del 100%, lo que indica un manejo adecuado del cultivo. Respecto a los tratamientos con bacilos, se observó una supervivencia mayor en un 25% en los tratamientos III (*B. licheniformis* en el agua) y V (bacilos en el agua y alimento) respecto al control positivo, aunque no fue significativa ($p > 05$). En el tratamiento IV (bacilos en el alimento), la supervivencia fue menor (8%) que el control positivo, aunque no fue significativa ($p > 05$).

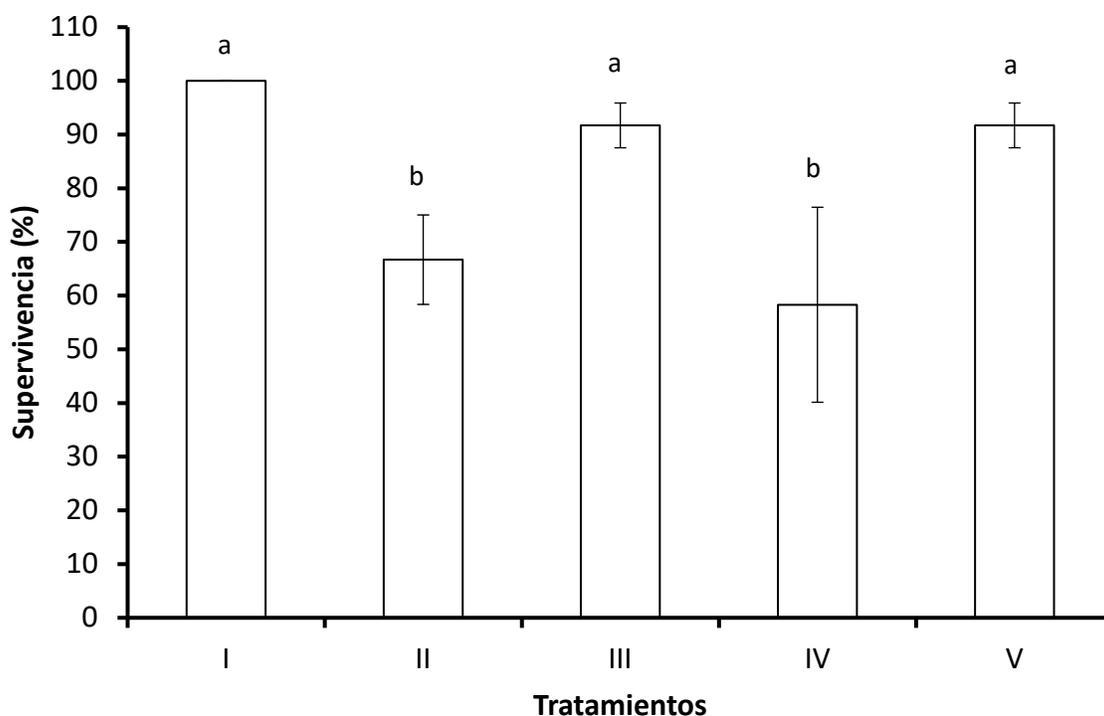


Figura 7. Supervivencia de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* en el agua y alimento y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}) por inmersión. **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus*; **III)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus*; **IV)** AC + *B. licheniformis* adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*; **V)** AC + *B. licheniformis* en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*. Se indica el promedio \pm EE.

Tabla 5. Tasa de mortalidad, supervivencia, supervivencia en porcentaje relativo de *L. vannamei* tratados con *B. licheniformis* en el agua y en el alimento cada 3 días y retados con *V. parahaemolyticus* (CL₅₀) por inmersión.

Tratamientos	Tasa de Mortalidad	Tasa de Supervivencia (%)	SPR
II	41.6	58.3	-
III	12.5	87.5	69.9
IV	41.6	58.3	-
V	12.5	87.5	69.9

Tratamientos II) Control positivo, *V. parahaemolyticus* 2; III) AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus*; IV) AC + *B. licheniformis* adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*; V) AC + *B. licheniformis* en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*. (LC₅₀= 77,000 UFC. SPR= Porcentaje relativo de supervivencia.

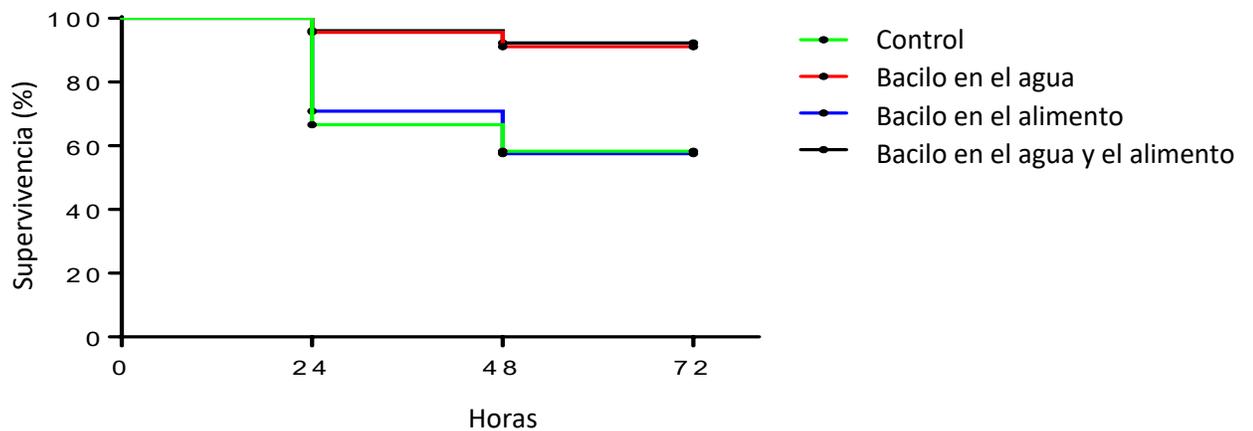


Figura 8. Curva de Supervivencia Kaplan-Meier de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* en el agua y alimento y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL₅₀) por inmersión. I) control negativo, alimento comercial (AC); II) control positivo, AC + *V. parahaemolyticus*; III) AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus*; IV) AC + *B. licheniformis* adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*; V) AC + *B. licheniformis* en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*.

Expresión de Genes

La expresión de genes de lisozima, crustina, penaeidina4, y SOD fue sobre incrementada en los tratamientos con bacilos adicionados en el alimento comparado con el tratamiento control positivo y bacilos adicionados en el agua cada tres días.

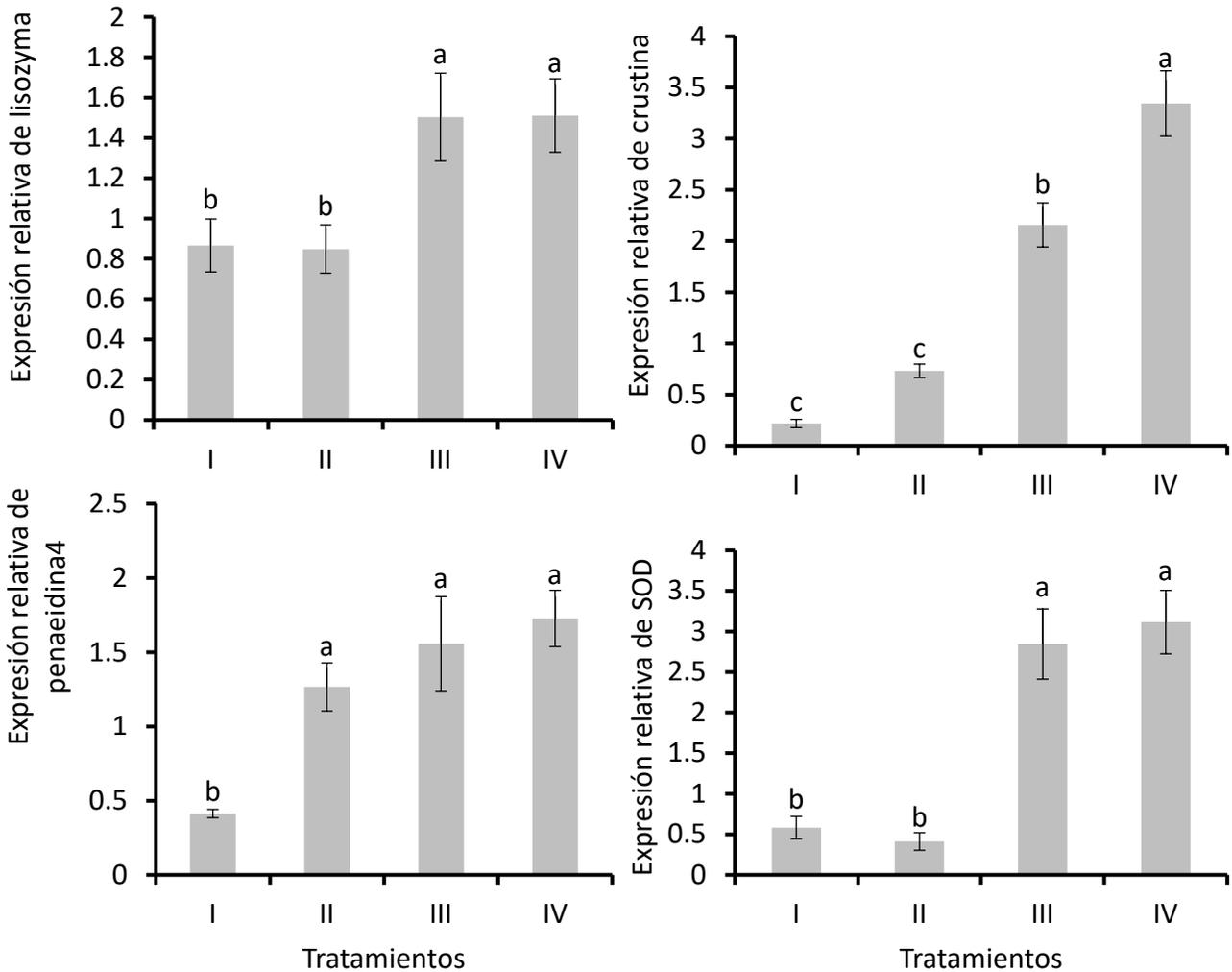


Figura 9. Expresión relativa de genes de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* adicionado en el alimento y en el agua cada tres días, y retado con *V. parahaemolyticus* IPNGS16 (CL_{50}) por inmersión. **I)** control positivo, alimento comercial (AC); **II)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus*; **III)** AC + *B. licheniformis* adicionado al alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*; **IV)** AC + *B. licheniformis* en el agua (1×10^6 UFC/L) y en el alimento (1×10^6 UFC/g) + *V. parahaemolyticus*.

8.4 Bioensayo 4. Efecto de *B. licheniformis* en el crecimiento de *L. vannamei*

No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el crecimiento entre el tratamiento control y con bacilos adicionados en el agua (Fig. 9). Solo se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) en el peso final de los individuos en el tratamiento IV (*B. licheniformis* adicionado al agua (3×10^6 UFC/L) comparado con el tratamiento control y con los tratamientos II (*B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) y III (*B. licheniformis* adicionado al agua (2×10^6 UFC/L) (Tabla 6).

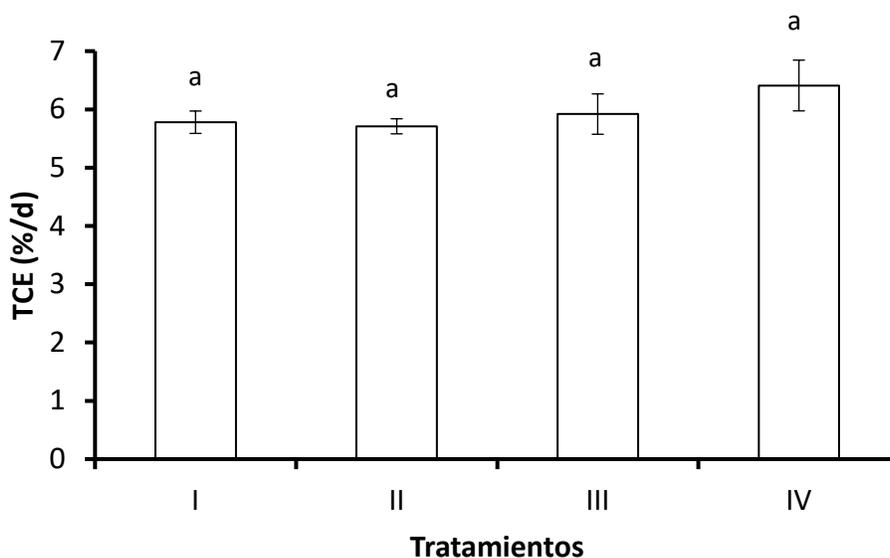


Figura 10. Tasa de crecimiento específico de *L. vannamei* con *B. licheniformis* adicionado en el agua del sistema de cultivo. Tratamientos: **I)** control negativo, alimento comercial (AC); **II)** *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L); **III)** *B. licheniformis* adicionado al agua (2×10^6 UFC/L); **IV)** *B. licheniformis* adicionado al agua (3×10^6 UFC/L). Se indica el promedio \pm EE.

Tabla 6. Crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia e índice de productividad de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* a 3 concentraciones 1, 2 y 3 x 10⁶ UFC/L.

Parámetros	Control		B1M		B2M		B3M	
Peso Inicial	0.114	± 0.001	0.130	± 0.003	0.126	± 0.011	0.115	± 0.013
Peso Final	0.58b	± 0.011	0.68ab	± 0.050	0.70ab	± 0.062	0.74a	± 0.088
Ganancia de Peso	6.97	± 0.165	7.59	± 0.684	7.95	± 1.024	8.66	± 1.396
TCE	5.69	± 0.35	5.59	± 0.27	5.88	± 0.60	6.40	± 0.73
Supervivencia	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00	100.00	± 0.00
FCA	1.44	± 0.15	1.64	± 0.04	1.53	± 0.05	1.35	± 0.15
IP	51.5	± 7.52	46.4	± 5.75	53.1	± 14.20	64.8	± 14.15

TCE: Tasa de crecimiento específico
 FCA: Factor de Conversión alimenticia
 IP: Índice de Productividad

8.5 Bioensayo 5. Efecto de bacilos, adicionados en agua, en la supervivencia del camarón blanco retado con *V. parahaemolyticus*

Se registraron las mortalidades de los camarones retados con *V. parahaemolyticus* hasta 72 horas post infección y tratados con diferentes concentraciones de *B. licheniformis* en el agua del cultivo. El tratamiento IV (i.e. 3×10^6 UFC/L de *B. licheniformis* mostró una supervivencia significativamente superior ($P < 0.05$) comparado con el grupo control Figura 11 y 12.

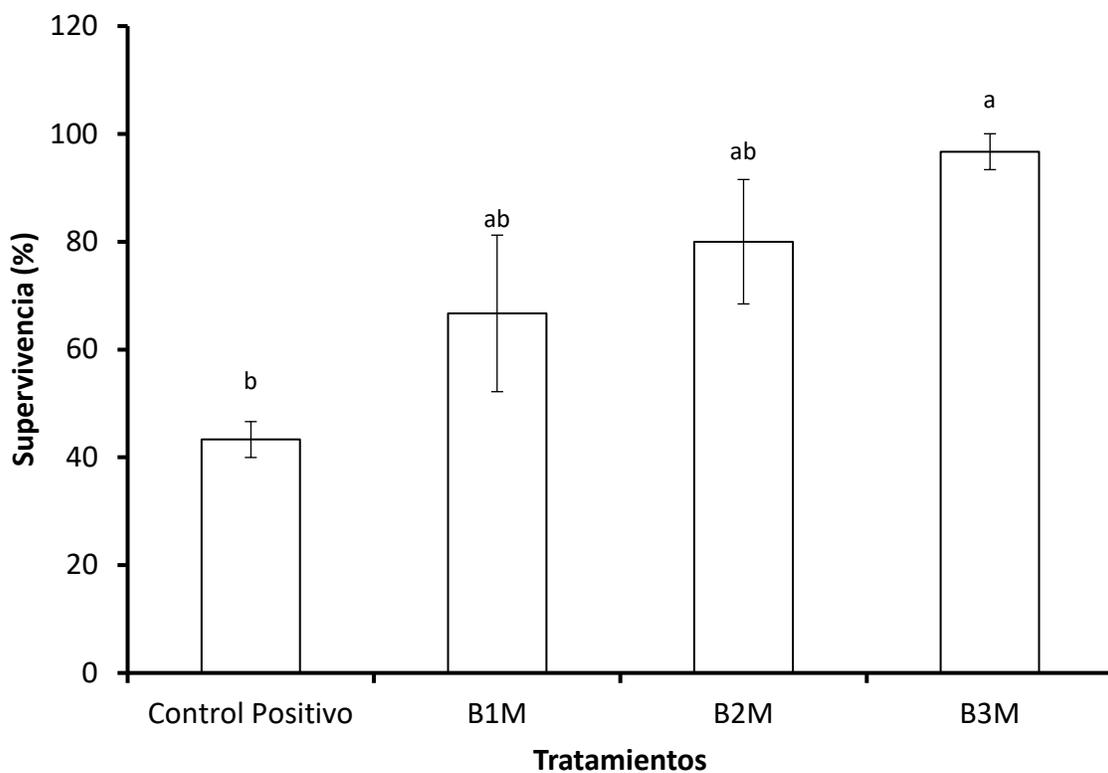


Figura 11. Supervivencia de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* en el agua y retado con *V. parahaemolyticus* por inmersión. Tratamientos: **I)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* (CL_{50}); **II)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL_{50}); **III)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (2×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL_{50}); **IV)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (3×10^6 UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL_{50}). Se indica el promedio \pm EE.

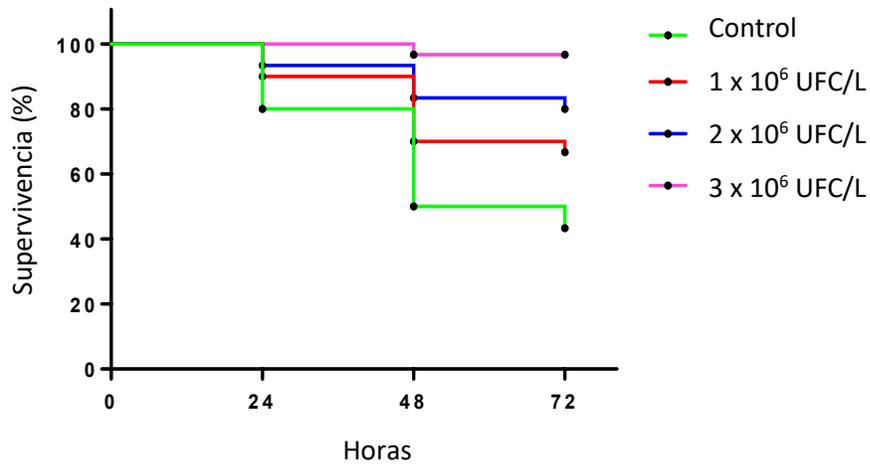


Figura 12. Curva de Supervivencia Kaplan-Meier de *L. vannamei* tratado con *B. licheniformis* en el agua y retado con *V. parahaemolyticus* por inmersión. Tratamientos: **I)** control positivo, AC + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀); **II)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (1 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀); **III)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (2 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀); **IV)** AC + *B. licheniformis* adicionado al agua (3 x 10⁶ UFC/L) + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀). Se indica el promedio ± EE.

9. DISCUSIÓN

En México, la industria del cultivo de camarón blanco (*L. vannamei*) es muy importante, principalmente en los estados del Noroeste (Nayarit, Sinaloa y Sonora). Sin embargo, las enfermedades virales y bacterianas afectan la producción ya que causan problemas en el crecimiento y mortalidades masivas (Pohlenz y Gatlin, 2014; Boonchuen *et al.*, 2018). Para el control de bacterias patógenas, como vibrios, se usan antibióticos; sin embargo, su uso inadecuado trae consigo problemas de resistencia y residuos en ecosistemas costeros y en el camarón (Pflomm, 2002; Sahul Hameed *et al.*, 2003; Cabello, 2006; Rortana *et al.*, 2018, Lei *et al.*, 2020). Por lo anterior, una alternativa viable es el uso de aditivos naturales para camarón, como las plantas y los probióticos, para mejorar el crecimiento y la resistencia a las enfermedades.

***Nannochloropsis oculata* (Bioensayo 1)**

N. oculata es una microalga rica en pigmentos, proteínas, ácidos grasos poliinsaturados (Volkman *et al.*, 1993; Lubián *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Shene *et al.*, 2016; Chaidir *et al.*, 2020) y polisacáridos que poseen propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticolinesterasas (Hafsa *et al.*, 2017), entre ellos β -1,3 glucanos (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017). Meshram *et al.* (2015) investigaron el efecto de los β -glucanos suministrados en la dieta de *M. rosenbergii* contra *A. hydrophila*, los resultados indicaron que una dosis de 1.0 g/kg podría mejorar la supervivencia y la respuesta inmune de los individuos evaluados. Medina-Félix *et al.* (2014) evaluaron la supervivencia de *L. vannamei* alimentado con dos concentraciones (1 y 2%) de la microalga *Dunaliella* sp. y retado con WSSV. Se observó una mayor supervivencia en los tratamientos (80%) con la microalga respecto al grupo control (55%). Asimismo, Medina-Félix *et al.* (2017) evaluaron la supervivencia de *L. vannamei* alimentado con diferentes concentraciones (1.5, 2, 2.5 y 3%) de la microalga *Dunaliella* sp. y retado con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Se observó una mayor supervivencia (30.9%) del camarón en el tratamiento con 3% de microalga en comparación con el control positivo sin

microalga (10.1%) y retado con el vibrio. Sharawy *et al.* (2020) evaluaron el efecto de suministrar la microalga *Tetraselmis suecica* a tres concentraciones (2.5 g/kg, 5.0 g/kg, 7.5 g/kg) en la dieta de postlarvas de *L. vannamei* durante 90 días de cultivo. Dichos autores encontraron que las tasas de supervivencia (73, 69 y 90%), el peso final (18.50, 19.73, 20.28 g), el peso ganado (18.08, 19.30 y 19.86 g) y el factor de conversión alimenticia (0.98, 1.04, 0.99) de los camarones de *L. vannamei* que se alimentaron con *T. suecica* fue significativamente superior a diferencia de la dieta control (50%, 15.66 g, 15.23 g y 1.36). Además, con respecto al total de vibrios presentes en el tracto digestivo del *L. vannamei*, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos indican que *N. oculata* mejoró significativamente ($p < 0.5$) la tasa de crecimiento específico de *L. vannamei* en los tratamientos con N5 y N7.5 g/kg y el índice de productividad (que toma en cuenta la ganancia en peso, supervivencia y el FCA) en el tratamiento con N5 g/kg, con lo cual se demuestra el alto valor nutricional que contiene *N. oculata* y que puede ser aprovechado en la dieta de postlarvas de *L. vannamei*, por lo que estos resultados se asemejan a los que se obtuvieron en los estudios previos mencionados donde se emplearon otras microalgas como *Dunaliella* sp. y *T. suecica*, y otros prebióticos como los β -1,3 glucanos, siendo éste uno de los componentes principales de *N. oculata*. En este sentido, *N. oculata* representa un buen candidato como potenciador del crecimiento. Por otro lado, a pesar de que la adición de *N. oculata* en la dieta de *L. vannamei* mejoró su crecimiento, ésta no tuvo un efecto significativo en la concentración total de vibrios en el hepatopáncreas e intestino de *L. vannamei* al finalizar los 39 días de cultivo y tampoco tuvo un efecto en la supervivencia de *L. vannamei* cuando se realizó el reto en contra de *V. parahaemolyticus*. A pesar de ello, es importante resaltar que los camarones alimentados con el tratamiento N2.5 g/kg, presentaron la supervivencia más alta con respecto de los camarones de los demás tratamientos (N5 y N7.5 g/kg). Debido a ello, se recomienda que se continúen realizando estudios de *N. oculata* adicionada a la dieta de *L. vannamei* a diferentes concentraciones de la microalga en el alimento, suministro discontinuo, duración mayor del cultivo (e.g. 60, 90 y 120 días), lo que además, podría favorecer la aparición de bacterias protectoras o benéficas que impidan el desarrollo de bacterias patógenas como *V.*

parahaemolyticus; y con diversas condiciones de cultivo (e.g. sistema, luz, medio nutritivo, aeración, etc.) de *N. oculata* y a diferentes tiempos de cosecha (exponencial vs estacionaria), con lo cual se modificará su composición nutrimental (Hu, 2004; Rasdi y Qin, 2015; Paes *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2016) y se pueden obtener o incrementar metabolitos de interés como antioxidantes, antimicrobianos, pigmentos, lípidos, carbohidratos, proteínas entre otros. Además de estos estudios, se recomienda realizar experimentos a nivel genómico para evaluar la expresión de genes relacionados con el sistema inmune y comprender a detalle si hay un efecto estimulante de *N. oculata* al ser suministrado en la dieta de *L. vannamei*.

***Bacillus licheniformis* (Bioensayo 2, 3, 4 y 5)**

En la acuicultura, los probióticos son una alternativa natural a los antibióticos y otras sustancias químicas para aumentar la producción. Entre las bacterias probióticas, las especies del género *Bacillus* han mostrado un alto potencial probiótico porque no forman esporas patógenas y pueden introducirse en los sistemas de cultivo de camarones para controlar *Vibrio* spp., promover el crecimiento y mejorar la respuesta inmune (Vaseeharan y Ramasamy, 2003; Ravi *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2010). Por lo tanto, en este estudio, determinamos los efectos de los bacilos probióticos sobre el crecimiento, la supervivencia y la respuesta inmune de *L. vannamei* desafiado con *V. parahaemolyticus*, el agente causante de AHPND.

En la industria de la acuicultura del camarón, la supervivencia es un factor principal para la evaluación de los probióticos. En el presente estudio, *B. licheniformis* BCR 4-3 aumentó claramente la supervivencia del camarón cuando se agregó al agua durante 15 días al aumentar la resistencia del camarón a la infección por *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, a la concentración utilizada, los bacilos en el alimento no mostraron los mismos resultados. Asimismo, Aderaldo-Vidal *et al.* (2018) no encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las postlarvas de *L. vannamei* alimentadas con *B. cereus* (1×10^8 UFC/g) durante 14 días y desafiadas con *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Por el contrario, Zokaeifar *et al.* (2012) encontraron que dos cepas (L10 y G1) de *B. subtilis*,

agregadas al alimento durante 8 semanas, mejoraron la resistencia a enfermedades en el camarón patiblanco desafiado con la bacteria patógena *Vibrio harveyi* ATCC 14126. En otro estudio, se encontraron resultados similares por Liu *et al.* (2010) en un bioensayo de 8 semanas donde *L. vannamei* fueron alimentados con una dieta que contenía *B. subtilis*. Los animales mostraron una mayor resistencia contra *V. harveyi*. Además, en las larvas de *Penaeus monodon*, la administración dietética de *Bacillus* sp. Mk22 durante 30 días redujo la infección del camarón por *V. parahaemolyticus* (Sekar *et al.*, 2016).

En general, nuestros resultados indican que el corto período de alimentación con bacilos y la cantidad de bacterias en el alimento deben optimizarse para proteger a los camarones contra la infección por *Vibrio*. En contraste, los efectos de los bacilos en el agua fueron similares a los reportados por Zokaeifar *et al.* (2014), donde la administración de una cepa de *B. subtilis* (1×10^8 UFC/L) en el sistema de cultivo de *L. vannamei*, durante 8 semanas, mejoró la resistencia del camarón a la vibriosis causada por *V. harveyi*. *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 muestra un gran potencial como probiótico debido a que es una bacteria gamma hemolítica y resistente a algunos antibióticos, que tiene una alta capacidad para formar biopelículas y producir péptidos antimicrobianos (liquisinas) y lactonasas que interrumpen la formación de quórum sensing de bacterias patógenas (Vinoj *et al.*, 2014; Escamilla-Montes *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Por lo tanto, creemos que estos rasgos bacterianos (es decir, la producción de péptidos antimicrobianos y la enzima lactonasa y la capacidad de formar biopelículas) pueden ayudar a los camarones a prevenir la capacidad infecciosa de *V. parahaemolyticus*. Se necesita más investigación sobre estos temas, incluido el comportamiento bacteriano en el agua y en los tejidos del camarón a través del análisis metagenómico. En consonancia con la mejora de la supervivencia observada de los camarones tratados con *B. licheniformis* BCR 4-3 tras el desafío con *V. parahemolyticus*-AHPND, este estudio investigó los efectos de este probiótico bacteriano sobre los parámetros inmunitarios de *L. vannamei*.

La respuesta inmune innata juega un papel clave contra la infección por patógenos, de ahí que los probióticos bacterianos se utilicen en el control de enfermedades al

promover funciones inmunomoduladoras en camarones (Lazado *et al.*, 2015; Ringø 2020). En particular, varias cepas de *Bacillus* spp., mejoran los parámetros inmunológicos y aumentan la resistencia del camarón contra la vibriosis (Soltani *et al.*, 2019). A este respecto, se ha encontrado que varias cepas de *B. subtilis* mejoran la respuesta inmune y mejoran la resistencia a enfermedades en camarones contra la infección por *Vibrio* spp. (Liu *et al.*, 2014; Zokaeifar *et al.*, 2014). Los efectores inmunes celulares y moleculares son cruciales para aumentar la resistencia a las enfermedades. La resistencia a enfermedades mediada por efectores moleculares en el camarón, la regulación positiva de la lisozima, los péptidos antimicrobianos y la expresión del gen superóxido dismutasa se han asociado con una estimulación adecuada del sistema inmunológico por los probióticos. La lisozima es una enzima principal con funciones inmunitarias efectoras y moduladoras en camarones contra las infecciones por *Vibrio* (Burge *et al.*, 2007), rompe los peptidoglicanos por hidrólisis de los enlaces β -1, 4-glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y el N-acetilglucosamina de la pared celular de patógenos bacterianos invasores (Jollès y Jollès, 1984). En este estudio, el gen de la lisozima se reguló significativamente en los tratamientos con bacilos añadidos al alimento. De manera similar, una regulación positiva de la expresión génica de la lisozima en postlarvas de *L. vannamei* y una reducción de *Vibrio* spp. se han reportado conteos en estanques de camarones tratados con *B. subtilis* cepa E20 (Liu *et al.*, 2010). Además, los camarones alimentados con la cepa S12 de *B. subtilis* también aumentaron la transcripción del gen de la lisozima, lo que se asoció con una mayor resistencia contra la infección por *V. harveyi* (Liu *et al.*, 2014).

Los péptidos antimicrobianos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune temprana y su mejora mediante probióticos inmunoestimuladores es un objetivo ideal contra los patógenos. Las penaeidinas son importantes moléculas efectoras inmunes en los camarones que pertenecen a una familia de péptidos antimicrobianos, que típicamente tienen dos dominios: un dominio N-terminal rico en prolina (PRD) y un dominio rico en cisteína (CRD) (De Lorgeril *et al.*, 2008). Las penaeidinas son eficaces contra bacterias y hongos Grampositivos, y han mostrado actividad antimicrobiana durante infecciones y un papel proinflamatorio durante las

lesiones del camarón (Destoumieux *et al.*, 1997; Li y Song, 2010). Entre las cuatro clases de penaeidinas, la penaeidina clase 4 es la más conservada entre las especies (Cuthbertson *et al.*, 2005). En el presente estudio, el gen penaeidin4 se incrementó significativamente en tratamientos con bacilos en agua y alimento. Sorprendentemente, los camarones (*L. vannamei*) alimentados con *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 mejoraron la resistencia a la vibriosis y aumentaron el gen de la penaeidina3 (Tepaamorndech *et al.*, 2019). Otros estudios han demostrado que la administración oral de cepas probióticas de *Bacillus* spp. en el camarón, aumentó la transcripción de penaeidinas, que se asoció con la resistencia a enfermedades (Hao *et al.*, 2014). En general, los resultados concuerdan con una regulación positiva deseable de penaeidina4 como se observa en *L. vannamei* y *Fenneropenaeus indicus* desafiados con *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, respectivamente (Wang *et al.*, 2010; Vaseeharan *et al.*, 2012).

La Crustina es un péptido antimicrobiano muy importante en los crustáceos decápodos. Este péptido muestra actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y se ha encontrado en hemocitos granulares y plasma de crustáceos (Schnapp *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 2004; Luna-González *et al.*, 2013). Además, el gen crustina está altamente regulado al alza en camarones (*L. vannamei*) desafiados con *V. parahaemolyticus* y se ha demostrado su actividad funcional clave contra AHPND (Visetnan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). En este estudio, la expresión del gen crustina se incrementó significativamente en el tratamiento con bacilos en el alimento. Asimismo, crustina en los hemocitos de *P. monodon* tenía una expresión diferencial en respuesta a levaduras y bacterias probióticas, y sus moléculas inmunoestimuladoras derivadas (Antony *et al.*, 2011). En ese trabajo, el probiótico *Bacillus* spp. (MCCB101) regularon positivamente el gen crustina y aumentaron la resistencia contra la infección por WSSV en camarones. La superóxido dismutasa elimina el radical anión superóxido producido durante la fagocitosis y el estallido respiratorio convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La SOD en hemocitos podría ser un biomarcador de la respuesta inmune en *L. vannamei* (Campa-Córdova, *et al.*, 2002). En este estudio, la SOD se incrementó significativamente en los tratamientos con bacilos en el alimento.

Sorprendentemente, Kewcharoen y Srisapoome (2019) encontraron que los camarones (*L. vannamei*) alimentados con *B. subtilis* AQAHS001 mejoraron la regulación positiva de SOD en hemocitos y hepatopáncreas contra *V. parahaemolyticus*-AHPND. Además, otros estudios han destacado la regulación positiva del gen SOD y su bioactividad en camarones (*L. vannamei*) alimentados con *Bacillus* spp. (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2019).

En el presente estudio, el crecimiento de camarón aumentó cuando se agregó *B. licheniformis* BCR 4-3 al agua de cría (3×10^6 UFC/L) después de 29 d del período experimental. Del mismo modo, Nimrat *et al.* (2012) encontraron que la suplementación de agua con especies mixtas de *Bacillus* aumentó el crecimiento del camarón (*L. vannamei*). En contraste, Kewcharoen y Srisapoome (2019) informaron que *B. subtilis* AQAHS001 agregado al agua no afectó el rendimiento de crecimiento del camarón (*L. vannamei*) después de 5 semanas de prueba experimental. En general, estos diferentes resultados merecen más investigación, aunque es bien sabido que varias especies de *Bacillus* pueden aumentar el crecimiento del camarón (Zokaeifar *et al.*, 2009; Zokaeifar *et al.*, 2012; Madani *et al.*, 2018), probablemente, mejorando la digestibilidad de los nutrientes gracias a la producción aumentada de enzimas digestivas (Hoseinifar *et al.*, 2017) y ácidos grasos de cadena corta (Pessione, 2012).

10. CONCLUSIONES

La inclusión de la microalga *N. oculata* en la dieta comercial de *L. vannamei* incrementó su crecimiento y el índice de productividad y a su vez, *B. licheniformis* BCR4-3 administrado a través de la dieta o el agua de cultivo protegió a *L. vannamei* contra AHPND y aumentó su respuesta inmunitaria. Debido a lo anterior, tanto *N. oculata* como *B. licheniformis* representan una alternativa interesante para mejorar la productividad de los cultivos de camarón y como tratamiento preventivo en contra de enfermedades bacterianas como AHPND, sin embargo, aún se necesitan realizar más investigaciones al respecto, especialmente en granjas comerciales.

11. LITERATURA CITADA

- Aderaldo-Vidal, J. M., da Cruz-Pessôa, M. N., Dos-Santos, F. L., Mendes, P. D. P., & Mendes, M. S. (2018). Probiotic potential of *Bacillus cereus* against *Vibrio* spp. in post-larvae shrimps. *Revista Caatinga*, 31(2), 495-503.
- Aguirre-Guzmán, G., Sanchez-Martinez, J. G., Campa-Cordova, A. I., Luna-Gonzalez, A., & Ascencio, F. (2009). Penaeid shrimp immune system. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39(3), 205-215.
- Alderman, D. J. & Hastings, T. S. (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science & Technology*, 33, 139-155.
- Almeida, E., Serra, C. R., Albuquerque, P., Guerreiro, I., Teles, A. O., Enes, P., & Tavares, F. (2018). Multiplex PCR identification and culture-independent quantification of *Bacillus licheniformis* by qPCR using specific DNA markers. *Food Microbiology*, 74, 1-10.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.
- Antony, S. P., Singh, I. B., Sudheer, N. S., Vrinda, S., Priyaja, P., & Philip, R. (2011). Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*, 216(1-2), 184-194.
- Apt, K. E. & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35 (2), 215-226.
- Boonchuen, P., Jaree, P., Tassanakajon, A., & Somboonwivat, K. (2018). Hemocyanin of *Litopenaeus vannamei* agglutinates *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VPAHPND) and neutralizes its toxin. *Developmental and Comparative Immunology*, 84, 371–381.
- Brown, M. R. & Miller, K. A. (1992). The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 205-215.
- Burge, E. J., Madigan, D. J., Burnett, L. E., & Burnett, K. G. (2007). Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4), 327-339.

- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, 1137-1144.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., & Ascencio, F. (2002). Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 557-565.
- Chai, P. C., Song, X. L., Chen, G. F., Xu, H., & Huang, J. (2016). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 54, 602-611.
- Chaidir, Z., Rahmi, S., Salim, M., Mardiah, E., & Pardi, H. (2020). Examination of the antibacterial and antifungal properties of fatty acids and fatty acid methyl ester obtained from *Nannochloropsis oculata*. *Rasayan Journal of Chemistry*, 13(2), 1134-1143.
- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Lo, C. F., Kou, G. H., & Liao, I. C. (1999). Effect of dietary β -1, 3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Diseases of aquatic organisms*, 36(3), 163-168.
- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., & Liao, I. C. (2003). Dietary β -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 15(4), 297-310.
- Chang, C. C., Tan, H. C. & Cheng, W. (2013). Effects of dietary administration of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) extracts on the immune responses and disease resistance of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 92-100.
- Cuthbertson, B. J., Yang, Y., Bachère, E., Büllsbach, E. E., Gross, P. S., & Aumelas, A. (2005). Solution structure of synthetic penaeidin-4 with structural and functional comparisons with penaeidin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16009-16018.
- Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.
- Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Caro, L. F. A., Kanrar, S., Adami Jr, R., & Juan, Y. S. (2019). First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 132(3), 241-247.

- De Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., ... & Bachère, E. (2008). A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Molecular Immunology*, 45(12), 3438-3445.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., & Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28398-28406.
- Escamilla-Montes, R., Luna-Gonzalez, A., del Carmen Flores-Miranda, M., Alvarez-Ruiz, P., Fierro-Coronado, J. A., Sánchez-Ortiz, A. C., & Ávila-Leal, J. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 11.
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L. & Ehrenfeld, N. (2017). β -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(1), 33-49.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. En *Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma.
- FAO. (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. *Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO*.
- FAO/WHO working group. (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Córdoba, Argentina (October 1–4, 2001)*.
- Finney, D. J., & Tattersfield, F. (1952). *Probit analysis*. Cambridge University Press; Cambridge.
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166–173.
- Gómez, R. G. D., & Shen, M. A. (2008). Influence of probiotics on the growth and digestive enzyme activity of white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Ocean University of China*, 7(2), 215-218.
- Griboff, J., Carrizo, J. C., Bonansea, R. I., Valdés, M. E., Wunderlin, D. A., & Amé, M. V. (2020). Multiantibiotic residues in commercial fish from Argentina. The presence of mixtures of antibiotics in edible fish, a challenge to health risk assessment. *Food Chemistry*, 332, 127380.

- 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.
- Hafsa, M. B., Ismail, M. B., Garrab, M., Aly, R., Gagnon, J., & Naghmouchi, K. (2017). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and anticholinesterase activities of water-soluble polysaccharides extracted from microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82(5), 509-522.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 917-935.
- Han, J. E., Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2015a). Genotyping of virulence plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* isolates causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 115(3), 245-251.
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015b). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 113(1), 33-40.
- Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liu, X. L., Lu, L., Xia, L., & Wang, G. X. (2014). Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 428, 141-149.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. & Heo, M.-S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317, 1-15.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), 1-14.
- Hong, X., Lu, L., & Xu, D. (2016). Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture international*, 24(2), 577-593.
- Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., & Esteban, M. Á. (2014). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 6, 1-14.

- Hoseinifar, S. H., Dadar, M., & Ringø, E. (2017). Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario. *Aquaculture Research*, 48(8), 3987-4000.
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 1, 83-93.
- Johansson, M. W. & Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, 5(6), 171-176.
- Jollès, P., & Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research?. *Molecular and cellular biochemistry*, 63(2), 165-189.
- Karunasagar, I., & Ababouch, L. (2012). Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. *Indian Journal of Virology*, 23(2), 141–148.
- Kewcharoen, W., & Srisapoome, P. (2019). Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & Shellfish Immunology*, 94, 175-189.
- Kumar, B. N., Murthy, H. S., Patil, P., Doddamani, P. L. & Patil, R. (2015). Enhanced immune response and resistance to white tail disease in chitin-diet fed freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Reports*, 2, 34-38.
- Kumaran, M., Anand, P. R., Kumar, J. A., Ravisankar, T., Paul, J., Vimala, D. D., & Raja, K. A. (2017). Is Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) farming in India is technically efficient? A comprehensive study. *Aquaculture*, 468, 262-270.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), 2-12.
- Lei, T., Jiang, F., He, M., Zhang, J., Zeng, H., Chen, M., ... & Ding, Y. (2020). Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of fluoroquinolone resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different types of food samples in China. *International Journal of Food Microbiology*, 317, 108461.
- Lee, M. Y., Min, B. S., Chang, C. S., & Jin, E. (2006). Isolation and characterization of a xanthophyll aberrant mutant of the green alga *Nannochloropsis oculata*. *Marine Biotechnology*, 8(3), 238-245.

- Li, C. Y., & Song, Y. L. (2010). Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced inflammatory site. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1044-1052.
- Li, E., Wang, X., Chen, K., Xu, C., Qin, J. G., & Chen, L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1), 57-75.
- Li, M., Ma, C., Li, H., Peng, J., Zeng, D., Chen, X., & Li, C. (2018). Molecular cloning, expression, promoter analysis and functional characterization of a new Crustin from *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 73, 42-49.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, 15(1), 40.
- Lightner, D. V., Redman, C. R., Pantoja, B. L., Noble, L. M., Nunan, L. T., & Tran, L. (2013). Documentation of an Emerging Disease (early mortality syndrome) in SE Asia & Mexico. *OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science & Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences*.
- Liu, K. F., Chiu, C. H., Shiu, Y. L., Cheng, W., & Liu, C. H. (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), 837-844.
- Liu, H., Li, Z., Tan, B., Lao, Y., Duan, Z., Sun, W., & Dong, X. (2014). Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 300-307.
- Liu, X. F., Li, Y., Li, J. R., Cai, L. Y., Li, X. X., Chen, J. R., & Lyu, S. X. (2015). Isolation and characterisation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(5), 795-803.
- Liu, X., Steele, J. C., & Meng, X. Z. (2017). Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. *Environmental Pollution*, 223, 161-169.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M. D. C., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the

- causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3).
- Lubián, L. M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I. E., Sobrino, C., González-del Valle, M., & Parés, G. (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 249-255.
- Luna-González, A., Moreno-Herrera, J. T., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., & Bueno-Ibarra, M. A. (2013). Immune response and gene expression of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) induced by microbial immunostimulants. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5), 898-907.
- Madani, N.S.H., Adorian, T. J., Ghafari Farsani, H., & Hoseinifar, S. H. (2018). The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture Research*, 49(5), 1926-1933.
- Maliwat, G. C., Velasquez, S., Robil, J. L., Chan, M., Traifalgar, R. F., Tayamen, M. & Ragaza, J. A. (2017). Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). *Aquaculture Research*, 48, 1666-1676.
- Medina-Félix, D., López-Elías, J. A., Martínez-Córdova, L. R., López-Torres, M. A., Hernández-López, J., Rivas-Vega, M. E., & Mendoza-Cano, F. (2014). Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. *Journal of invertebrate pathology*, 117, 9-12.
- Medina-Félix, D., Elías, J. A. L., Córdova, Á. I. C., Córdova, L. R. M., González, A. L., Jacinto, E. C., ... & Zazueta, M. G. B. (2017). Survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed on diets supplemented with *Dunaliella* sp. is improved after challenges by *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of invertebrate pathology*, 148, 118-123.
- Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøgwald, J., & Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1-2), 1-18.
- Meshram, S. J., Murthy, H. S., Ali, H., Swain, H. S. & Ballyaya, A. (2015). Effect of dietary β -glucan on immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man. 1879). *Aquaculture International*, 23, 439-447.

- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Seedeivi, P., & Rajan, D. K. (2019). Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 250-263.
- Mylonakis, E. & Aballay, A. (2005). Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infection and Immunity*, 73(7), 3833-3841.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary microbiology*, 159(3-4), 443-450.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1), 81-86.
- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: relevance, distribution, impacts and spatial assessments—a review. *Ocean & Coastal Management*, 119, 244-266.
- Paes, C. R., Faria, G. R., Tinoco, N. A., Castro, D. J., Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 275-292.
- Pantoja, C., & Lightner, D. V. (2014). EMS/AHPND descripción de la enfermedad en Asia y América. *Patología e inmunología de camarones penaeidos. Guía técnica. 2da ed. OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria)*, PAN, 172-177.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
- Pflomm, J. M. (2002). Strategies for minimizing antimicrobial resistance. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 59(3), S12-S15.
- Pohlenz, C. & Gatlin D. M. 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431, 111-117.
- Raa, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. En L.E. Cruz -Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico*, pp. 47-56.

- Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2015). Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2221-2230.
- Ravi, A. V., Musthafa, K. S., Jegathammbal, G., Kathiresan, K., & Pandian, S. K. (2007). Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 219-223.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
- Ringø, E. (2020). Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 5(1), 1-27.
- Rortana, C., Wajjwalku, W., Boonyawiwat, V., Hrianpreecha, C., Thongratsakul, S., & Amavisit, P. (2018). Antimicrobial resistance and pirAB-like profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific white shrimp. *Agriculture and Natural Resources*, 52(4), 377-381.
- Rosenberry, B. (2003). *World shrimp farming 2003*. Shrimps news international.
- Sadat Hoseini Madani, N., Adorian, T. J., Ghafari Farsani, H., & Hoseinifar, S. H. (2018). The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture Research*.
- Sahul Hameed, A., Rahaman, K., Alagan, A. & Yoganandhan, K. (2003). Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 1/4, 39-48.
- Sánchez-Ortiz, A. C., Angulo, C., Luna-González, A., Álvarez-Ruiz, P., Mazón-Suástegui, J. M., & Campa-Córdova, Á. I. (2016). Effect of mixed-*Bacillus* spp. isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 59, 95-102.
- Santos, L., & Ramos, F. (2018). Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 135-143.
- Schnapp, D., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1996). Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-

- 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 240(3), 532-539.
- Schulze, P. S., Pereira, H. G., Santos, T. F., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., & Varela, J. C. (2016). Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, 16, 387-398.
- Sekar, A., Packyam, M., & Kim, K. (2016). Growth enhancement of shrimp and reduction of shrimp infection by *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus with dietary administration of *Bacillus* sp. Mk22. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 44(3), 261-267.
- Sharawy, Z. Z., Ashour, M., Abbas, E., Ashry, O., Helal, M., Nazmi, H., ... & El-Haroun, E. (2020). Effects of dietary marine microalgae, *Tetraselmis suecica*, on production, gene expression, protein markers and bacterial count of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 51(6), 2216-2228.
- Shen, W. Y., Fu, L. L., Li, W. F., & Zhu, Y. R. (2010). Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 41(11), 1691-1698.
- Shene, C., Chisti, Y., Vergara, D., Burgos-Díaz, C., Rubilar, M., & Bustamante, M. (2016). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis oculata*: effects of carbon dioxide and glycerol. *Journal of Biotechnology*, 239, 47-56.
- Soltani, M., Ghosh, K., Hoseinifar, S. H., Kumar, V., Lymbery, A. J., Roy, S., & Ringø, E. (2019). Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: Aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(3), 331-379.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1689-1699.
- Smith, V. J., Brown, J. H., & Hauton, C. (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*, 15(1), 71-90.
- Su, H., Liu, S., Hu, X., Xu, X., Xu, W., Xu, Y., & Cao, Y. (2017). Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp

aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms. *Science of the Total Environment*, 607, 357-366.

- Teng, T., Liang, L., Chen, K., Xi, B., Xie, J., & Xu, P. (2017). Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei*. *PloS One*, 12(10), e0186135.
- Tepaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., ... & Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 4-13.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., ... & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87.
- Torky, H. A., Abdellrazeq, G. S., Hussein, M. M., & Ghanem, N. H. (2016). Molecular Characterization of *Vibrio harveyi* in Diseased Shrimp. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 51(2).
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, 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.
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., & MacKenzie, S. (2016). The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & shellfish immunology*, 56, 34-69.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034-1.
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N., & Aranguren-Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735-745.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., Jiménez-Vega, F., & Ávila-Villa, A. (2004). Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 138(4), 415-422.

- Vaseeharan, B. A. R. P., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2), 83-87.
- Vaseeharan, B., Shanthi, S., Chen, J. C., & Espineira, M. (2012). Molecular cloning, sequence analysis and expression of Fein-Penaeidin from the haemocytes of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Results in immunology*, 2, 35-43.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., & Zenteno, E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity*, 15(3), 179-188.
- Vinoj, G., Vaseeharan, B., Thomas, S., Spiers, A. J., & Shanthi, S. (2014). Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits *Vibrio* biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonization and mortality. *Marine Biotechnology*, 16(6), 707-715.
- Visetnan, S., Supungul, P., Tassanakajon, A., Donpuksa, S., & Rimphanitchayakit, V. (2017). A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* possesses antiprotease activity against subtilisin and antimicrobial activity against AHPND-inducing *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 341-348.
- Volkman, J.K., Brown, M.R., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.: The biochemical composition of marine microalgae from the class eustigmatophyceae. *J. Phycol.* 29(1), 69–78 (1993).
- Wang, K. H. C., Tseng, C. W., Lin, H. Y., Chen, I. T., Chen, Y. H., Chen, Y. M., ... & Yang, H. L. (2010). RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(1), 49-58.
- Wang, W., Sun, J., Liu, C., & Xue, Z. (2017). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1), 1-23.
- Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., & Zhou, Z. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 734-755.
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S., & Boonanuntanasarn, S. (2015). Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture*, 436, 179-187.

- Wu, Q., Zhang, R., Peng, S., & Xu, Y. (2015). Transcriptional characteristics associated with lichenysin biosynthesis in *Bacillus licheniformis* from Chinese Maotai-flavor liquor making. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(3), 888-893.
- Xie, J. J., Liu, Q. Q., Liao, S., Fang, H. H., Yin, P., Xie, S. W., & Niu, J. (2019). Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 456-465.
- Zhang, Z. F., Shao, M. & Kang, K. H. (2006). Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 159-169.
- Zokaeifar, H., Saad, C. R. B., Daud, H. M., Harmin, S. A., & Shakibazadeh, S. (2009). Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *African Journal of Biotechnology*, 8(14).
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(4), 683-689.
- Zokaeifar, H., Babaei, N., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., & Balcazar, J. L. (2014). Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1), 68-74.