



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA
PROGRAMA DOCTORAL BIOCENCIAS APLICADAS**

**ESTRATEGIA DE CULTIVO BASADA EN
INMUNOMODULACIÓN UTILIZANDO PROBIÓTICOS Y
BIOPOLÍMEROS INMUNOESTIMULANTES EN CAMARONES
Penaeus vannamei PARA MITIGAR MORTALIDADES
CAUSADAS POR *Vibrio parahaemolyticus***

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de
Doctor en Biociencias Aplicadas, Mención en
Biodescubrimiento**

Presentado por:

MERY ROSARIO RAMÍREZ MUÑOZ

Guayaquil - Ecuador

2023

AGRADECIMIENTOS

La tesis doctoral descrita ha sido posible con la ayuda de grandes instituciones y personas, a quienes expreso mis sinceros agradecimientos.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), por el apoyo brindado durante el transcurso del programa doctoral y posterior al mismo.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), junto al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), y de manera especial al director, Dr. Stanislaus Sonnenholzner, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis doctoral.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por su colaboración y acogida personal en la realización del trabajo experimental.

A la directora de la tesis doctoral, Ph.D. Jenny Rodríguez, por la dirección en el desarrollo de la tesis doctoral y en la publicación de los dos artículos científicos. Admirando su gran profesionalismo, su calidad humana, amistad, disponibilidad, asesoría en el trabajo experimental y académico.

Al Codirector de tesis, Ph.D. Frank Alexis, por su gran aporte científico en el desarrollo de la tesis y su perseverancia en una investigación innovadora.

A la directora académica Ph.D. Nardy Diez por la asesoría técnico-científico en la redacción de la tesis doctoral y por impartirme sus experiencias científicas.

Al Dr. Alexis Debut, por su apoyo en el proceso de investigación, junto a M.Sc. Karla Vizueti del Laboratorio CECINAT (ESPE).

Al Dr. Marcelo Grijalva por su apoyo en la investigación, junto a M.Sc. Lizeth Salazar.

Al Dr. Efrén Santos Ordoñez, Coordinador del Programa Doctoral en Biociencias Aplicadas por su gestión en la coordinación, haciendo posible la culminación exitosa del programa.

Al personal de CENAIM y en especial a mi compañero y amigo, M.Sc. Cristóbal Domínguez, por su gran apoyo técnico-científico en el proceso de investigación.

Al Proyecto de la red CEDIA, CEPRA XII-2018. titulado "*Fibras Vegetales como Inmunoestimulantes en Acuicultura de Camarón para Prevenir las Vibriosis*" por el respaldo económico en el desarrollo de la tesis Doctoral.

DEDICATORIA

A mis hijas Marianela, Marcela e Hilda María
por su apoyo incondicional. A mi esposo Miguel
por su paciencia y comprensión. A mi madre
Blanquita por su gran amor.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

DECANO O DELEGADO

Nardy Diez PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ana Tirapé PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Marynés Montiel PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Alexis Debut PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Cesar Lodeiros PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Jenny Rodríguez PhD
DIRECTORA DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Frank Alexis PhD

CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Mery Rosario Ramírez Muñoz

GLOSARIO

Inmunomodulación	Manipulación específica del sistema inmune en la que se produce una interacción que estimula o inhibe la respuesta inmune, con el fin de restaurar el equilibrio perdido por diferentes causas.
Inmunomoduladores	Sustancias biológicas o compuestos químicos definidos, empleados con satisfacción para la prevención y el tratamiento de enfermedades virales y bacterianas.
Vibriosis	Grupo de enfermedades bacterianas, causadas por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género <i>Vibrio</i> .
Exclusión competitiva	Planteamiento que indica que dos especies de una comunidad determinada no pueden existir haciendo uso del mismo recurso, hecho que genera competencia. Como resultado una de las especies termina desplazando a la otra.
Colonización	Proceso biológico mediante el cual una especie se propaga a nuevos nichos biológicos
Melanización	Remoción de partículas extrañas mediante la encapsulación y formación de agregados nodulares con depósito de melanina. Saneamiento y cicatrización de heridas o laceraciones mediante la agregación celular y la iniciación del proceso de coagulación, la producción de especies reactivas y depósito de melanina.
Enjambre bacteriano	Es el proceso más rápido mediante el cual bacterias móviles son capaces de desplazarse y colonizar superficies.
Métodos profilácticos	Medidas para prevenir o reducir la incidencia de enfermedades en los cultivos de camarón, así como el impacto ambiental de los productos utilizados.
Histopatología	Rama de la patología que trata el diagnóstico de enfermedades a través del estudio de los tejidos.
Hibridación <i>in situ</i>	Técnica de laboratorio empleada para localizar una secuencia de ADN o ARN en una muestra histológica.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	15
MARCO TEÓRICO	15
1.1. Introducción	15
1.2. Producción acuícola de camarón	17
1.3. Enfermedades que afectan al camarón de cultivo	18
1.3.1. Vibriosis en el cultivo de camarón	18
1.3.2. Signos generales de camarones infectados por la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND.....	19
1.3.3. Histopatología de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND	20
1.4. Sistema inmune en camarones	20
1.4.1. Mecanismos humorales	21
1.4.2. Mecanismos celulares.....	22
1.4.3. Otros tejidos inmunes.....	24
1.5. Métodos profilácticos para controlar la vibriosis en el cultivo de camarón. 25	
1.6. Probióticos	26
1.6.1. Modos de acción de los probióticos	27
1.6.2. Consideraciones para la Selección y uso de probióticos en acuicultura de camarón.....	30
1.7. Inmunoestimulación e Inmunoestimulantes	31
1.8. Prebióticos	32
1.8.1. Prebióticos en la acuicultura	33
1.8.2. Beneficios de los prebióticos	33
1.9. Objetivos de investigación	35
1.9.1. Objetivo General	35
1.9.2. Objetivos Específicos.....	35
CAPITULO 2	36
METODOLOGÍA	36
2.1. Selección de organismos para los ensayos experimentales	36
2.1.1. Bacterias y condiciones de crecimiento bacteriano	37
2.1.2. Observación de fimbrias y flagelos de cepas probióticas en microscopía electrónica de barrido.....	37
2.1.3. Ensayos de formación de biopelículas de cepas probióticas	38
2.1.4. Ensayo de crecimiento en enjambre de bacterias probióticas	38

2.1.5.	Ensayos de colonización, aplicación de bacterias probióticas teñidas a post larvas de camarón	39
2.2.	Selección de fibras vegetales con cualidades inmunoestimulantes ...	39
2.2.1.	Evaluación de las fibras vegetales	39
2.2.2.	Camarones y colección de hemolinfa	40
2.2.3.	Cuantificación del anión superóxido (O ₂ ⁻)	40
2.2.4.	Cuantificación de la activación de fenol oxidasa (PO).....	41
2.2.5.	Cuantificación de proteínas plasmáticas totales.	41
2.2.6.	Evaluación <i>in vitro</i> de la posible toxicidad de las fibras vegetales .	41
2.3.	Ensayos <i>in vivo</i> . Efecto del consorcio de probióticos (Ili, P62 y P64) y las fibras inmunoestimulantes F4 y C101 sobre la supervivencia de larvas de camarón desafiadas con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
2.3.1.	Diseño experimental y tratamientos en la cría larvaria.....	42
2.3.2.	Análisis de la expresión de los genes de péptidos antimicrobianos (peneidinas, crustina y ALF) mediante RT-qPCR	43
2.3.3.	Ensayos de cuantificación relativa.....	45
2.3.4.	Análisis estadístico. Tratamiento de valores de Cq	46
2.3.5.	Análisis de expresión relativa (radio).....	47
2.3.6.	Desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y análisis de supervivencia..	47
2.4.	Efecto inmunoestimulante del consorcio probiótico (Ili, P62 y P64) y fibras vegetales F4 y C101 en camarones juveniles <i>Penaeus vannamei</i>	48
2.4.1.	Diseño experimental y tratamientos aplicados a camarones juveniles	48
2.4.2.	Análisis inmunológico realizados en camarones tratados con probióticos	48
2.4.3.	Histopatología.....	49
2.4.4.	Preparación de la sonda de peneidinas.....	49
2.4.5.	Hibridación <i>in situ</i> (HIS) para detectar la expresión de peneidina en tejidos de camarón.	50
2.4.6.	Prueba de desafío en juveniles de <i>Penaeus vannamei</i> con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	50
2.4.7.	Análisis Estadístico.....	51
CAPÍTULO 3.....		52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		52
3.1.	Caracterización de las bacterias probióticas, Ili, P62 y P64.....	52
3.1.1.	Caracterización morfológica en microscopía electrónica	52
3.1.2.	Formación de biopelículas.....	52
3.1.3.	Ensayos de motilidad de enjambre	53
3.1.4.	Ensayo <i>in vitro</i> de la colonización de bacterias probióticas de larvas de camarón <i>Penaeus vannamei</i>	54
3.2.	Selección <i>in vitro</i> de fibras vegetales mediante ensayos de activación de la fenol oxidasa PO y generación de anión superóxido O ₂ ⁻ en hemocitos de	

camarones <i>Penaeus vannamei</i>	57
3.2.1. Selección de las fibras vegetales	57
3.2.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la toxicidad de las fibras vegetales seleccionadas en hemocitos de camarones.....	62
3.3. Ensayos <i>in vivo</i> , de larvas de camarón cultivadas con el consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4 y C101).....	62
3.3.1. Análisis de expresión de genes de péptidos antimicrobianos AMPs en larvas tratadas con probióticos y fibras vegetales	63
3.3.2. supervivencia de larvas de camarón después del desafío con <i>Vibrio</i> . <i>parahaemolyticus</i> causante de AHPND	66
3.4. Ensayo <i>in vivo</i> en camarones juveniles con el consorcio de probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101).....	67
3.4.1. Respuesta inmunoestimulante y protectora contra <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> en camarones juveniles tratados con consorcio de probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4 y C101)	67
3.4.2. Respuesta <i>in vivo</i> de la supervivencia de camarones juveniles cultivados con el consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4, C101) después de la prueba del desafío	70
3.5. Resultados de hibridación <i>in situ</i> (HIS)	71
3.6. DISCUSIÓN	81
3.6.1 Estudios de la capacidad colonizadora de los probióticos del consorcio Ili, P62 y P64 mediante ensayos <i>in vitro</i>	81
3.6.2 Evaluación de las características inmunoestimulantes de las fibras vegetales mediante ensayos <i>in vitro</i>	83
3.6.3 Ensayos <i>in vivo</i> en larvas de camarón combinando el consorcio de bacterias probióticas y fibras vegetales inmunoestimulantes	84
3.6.4 Ensayos <i>in vivo</i> en larvas de camarón combinando el consorcio de bacterias probióticas y fibras vegetales inmunoestimulantes	86
CAPÍTULO 4	91
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
4.1. Conclusiones.....	91
4.2. Recomendaciones	91
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Varias bacterias probióticas aplicadas en cultivos de camarón	28
Tabla 2. Prebióticos polisacáridos aplicados en cultivos de camarón	34
Tabla 3. Descripción de los tratamientos en larvas de camarones <i>P. vannamei</i>	42
Tabla 4. Master mix de reacción (44x) para la síntesis de ADNc.	44
Tabla 5. Iniciadores utilizados para los ensayos de RT-qPCR de AMPs.....	44
Tabla 6. Gradiente de temperatura utilizado para el ensayo de PCR convencional	45
Tabla 7. Motilidad de enjambre de las tres bacterias probióticas	54
Tabla 8. Resultados de pruebas inmunológicas de las fibras vegetales de mejor respuesta.....	59
Tabla 9. Supervivencias al final de la larvicultura, de larvas de camarón tratadas con diferentes combinaciones de fibras vegetales y probióticos.	63
Tabla 10. Modelamiento de los valores de expresión relativa de los genes crustina, ALFs y peneidina-3a ajustados a la expresión normal y estimados por máxima verosimilitud (parámetro) y la desviación estándar (DE)	65
Tabla 11. Pesos obtenidos (g) de camarones juveniles tratados con probióticos y fibras vegetales	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Penaeus vannamei</i> en diferentes estadios de salud. a) Camarón juvenil sano. b) Camarón juvenil afectado con AHPND	19
Figura 2. Hemocitos de camarón	23
Figura 3. Signos histopatológicos relacionados con infecciones bacterianas y virales en camarones.....	24
Figura 4. Enfoques para controlar la vibriosis en la acuicultura del camarón.....	26
Figura 5. Diseño de placa para los ensayos de cuantificación relativa. (Creada con BioRender.com).....	46
Figura 6. Micrografías electrónicas (SEM) de bacterias probióticas	52
Figura 7. Ensayos de biopelícula realizados con los probióticos Ili, P62 y P64.....	53
Figura 8. Ensayo de motilidad de enjambre realizado con tres bacterias probióticas <i>Vibrio diabolicus</i> (Ili), <i>Vibrio hepatarius</i> (P62) y <i>Bacillus cereus</i> (P64).....	54
Figura 9. Micrografías de epifluorescencia de larvas de camarón expuestas a probióticos teñidos con tintes fluorocromos.....	55
Figura 10. Micrografías confocales que muestran la capacidad de las cepas probióticas de adherirse a la cutícula interna y externa de <i>Penaeus vannamei</i> en la etapa PL2	55
Figura 11. Interacción entre probióticos y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de necrosis hepatopancreática aguda AHPND.	56
Figura 12. Resultados de selección de las fibras vegetales con código F mediante la prueba inmunológica de activación de la Fenol oxidasa PO. Para cada variable se reporta la media. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).....	57
Figura 13. Resultados de selección de las fibras vegetales con código C mediante la prueba inmunológica de activación de la Fenol oxidasa PO. Para cada variable se reporta la media. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).....	58
Figura 14. Resultados de generación de anión superóxido O_2^- obtenidos con las fibras vegetales de código F a cuatro concentraciones. Se grafican las medias. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)	58
Figura 15. Resultados de la prueba del cribado de las fibras vegetales con código C mediante la prueba inmunológica de generación de anión superóxido O_2^- . Para cada variable se reporta la media de cada concentración. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).....	59
Figura 16. Efecto inmunoestimulante de cinco fibras vegetales.	61
Figura 17. Efecto inmunoestimulante de cinco fibras vegetales. Ensayo de toxicidad de fibras vegetales en hemocitos de camarones juveniles.....	62
Figura 18. Intervalos de confianza de los valores de Cq del gen 40S-S24	63

Figura 19. Intervalos de confianza de los valores de Cq del gen crustina.....	64
Figura 20. Intervalos de confianza de los valores de Cq del gen ALFs.....	64
Figura 21. Intervalos de confianza de los valores de Cq del gen Peneidina – 3a	64
Figura 22. Expresión relativa de los genes de AMPs crustina, ALFs, y Pen-3a con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con probabilidad de que el valor de expresión relativa (radio) sea mayor.	66
Figura 23. Curva de mortalidad de larvas de camarones tratados con Consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4, C101) desafiadas con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (BA94C2).	66
Figura 24. Conteos totales de hemocitos (HCT) en los camarones sometidos a distintos tratamientos con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 y las fibras vegetales. Se reporta la media ± error estándar	68
Figura 25. Conteos diferenciales de hemocitos en los juveniles de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5. Se reporta la media ± error estándar.....	68
Figura 26. Generación de Anión superóxido O ₂ ⁻ en los hemocitos de los camarones tratados con consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101). Se reporta la media ± de error estándar. Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes.....	69
Figura 27. Activación de Fenol oxidasa PO en los hemocitos de los camarones tratados con consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101) reporta la media ± de error estándar	69
Figura 28. Contenido de proteínas plasmáticas en los camarones juveniles tratados con el consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibras inmunoestimulantes (F4 y C101). Se reporta la media ± error estándar. Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes (P < 0.05)	70
Figura 29. Curvas de supervivencia de camarones juveniles desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> BA94C2:.....	71
Figura 30. Control: Camarones de control no tratados, moribundo (A, B, C D) y sobrevivientes (E, F) luego del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	73
Figura 31. T1. Camarones tratados con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 probióticos antes del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (A, B, C, D, E) y sobrevivientes luego del desafío (F)	74
Figura 32. T2: Camarones tratados con el consorcio de probióticos Ili, P 62, P64 y la fibra F4, antes del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (A, B), sobrevivientes luego del desafío (C, D, E), moribundo (F)	76
Figura 33. T3: Camarones tratados con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 y la fibra C101, antes del desafío con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (A, B, C, D, E) y luego del desafío (F).....	77
Figura 34. T4: Camarones tratados con la fibra vegetal F4, antes del desafío (A, B, C), sobreviviente luego del desafío (D) y moribundo (E)	79

Figura 35. T5 Camarones tratados con la fibra vegetal C101, antes del desafío (A, B, C) y sobrevivientes luego del desafío (D, E, F) 80

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

Als: Autoinductores

AMPs (siglas en inglés): Péptidos antimicrobianos

ANOVA (siglas en inglés): Análisis de varianza

AO (siglas en inglés): Naranja de acridina

ALFs: Antilipopolisacáridos

AHPND (siglas en inglés): Enfermedad necrosis hepatopancreática aguda

ARNm: ARN mensajeros

AXOS: Arabinosilano-oligosacárido

BCA: Banco Central del Ecuador

BGBP: β -1,3-glucanos

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CNA: Cámara Nacional de Acuicultura.

Cq: Ciclo umbral de cuantificación

CV: Coeficiente de variabilidad

DAPI: Diamidino-2-phenylindole

DE: Desviación estándar

EF1 α : Factor de elongación alfa,

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

EST (siglas en inglés): Expressed sequence tag

FAO (siglas en inglés): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FOS: Fructooligosacáridos

GOS: Galactooligosacáridos

HIS: Hibridación *in situ*

HH: Hemocitos hialinos

KDa: Kilodaltons (equivalente a 1000 daltons)

LB: Caldo Luria-Bertani

LGH (siglas en inglés): Hemocitos granulados

LPS: Lipopolisacáridos

LOS (siglas en inglés): esferoides del órgano linfoide

MOS: Manano oligosacáridos

NBT (siglas en inglés): Nitro Blue Tetrazolium

N5: Nauplio 5

LO (siglas en inglés): Órgano linfoide

PAMPs (siglas en inglés): Patrones moleculares asociados a patógenos

PL: Post larva

PMA: Miristato 13-acetato de forbol

PO (siglas en inglés): Fenol oxidasa

PRR (siglas en inglés): Proteínas de reconocimiento de patrones

QS (siglas en inglés): Quorum sensing

RT-qPCR (siglas en inglés): Cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa

SEM (siglas en inglés): Microscopía Electrónica de Barrido

SGH (siglas en inglés): Hemocitos semigranulosos

SOD: Superóxido dismutasa

TSA: Agar de soja trípico

TSB (siglas en inglés): Caldo de soja trípico

UFC mL⁻¹: Unidades formadoras de colonia por mililitro

μM: micromol (cantidad de una sustancia equivalente a una millonésima de mol) μm:

micra (unidad de longitud equivalente a la millonésima (10⁻⁶) parte del metro)TM:

Tonelada métrica (1000 kg= 2204.622 lb)

YHV (siglas en inglés): Virus de la cabeza amarilla

WSSV (siglas en inglés): Virus del síndrome de la mancha blanca

RESUMEN

Bacterias del género *Vibrio* han provocado severas enfermedades a la industria del camarón de cultivo. *Vibrio parahaemolyticus* causante de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), ha causado grandes mortalidades y pérdidas económicas a esta industria. Este *Vibrio* coloniza el estómago del camarón y genera toxinas que destruyen el hepatopáncreas. La presente tesis abordó a la AHPND combinando dos enfoques, el primero la exclusión de las superficies del camarón del vibrio patógeno, mediante probióticos con altas cualidades colonizadoras y el segundo enfoque, la inmunomodulación del camarón con fibras vegetales inmunoestimulantes. La capacidad colonizadora de los probióticos estudiados (Ili, P62 y P64) se verificaron mediante observaciones en microscopía confocal y de epifluorescencia, demostrando que estas bacterias poseen abundantes flagelos (Ili), fimbrias (P62), y una combinación de fimbrias y flagelos (P64). Estos apéndices extracelulares ayudan a explicar la capacidad de adherencia de los probióticos del consorcio, así como la capacidad de formar biopelículas y la motilidad en enjambre, los cuales son procesos fundamentales para persistir y colonizar superficies externas e internas de los camarones incluyendo el estómago y la membrana peritrófica de las larvas de camarón. Entre los probióticos Ili fue el más destacado por su gran capacidad de colonización.

De 18 fibras vegetales evaluadas *in vitro*, se seleccionaron dos, la fibra natural F4 y la fibra comercial C101 por sus cualidades inmunoestimulantes superiores a las restantes fibras y a los β -1,3-glucanos, inmunoestimulantes usados ampliamente en acuicultura. Así en la prueba de activación de la fenol oxidasa (PO) se obtuvieron valores de 698,67 mDO \pm 10,02 (fibra F4) y 586,33 mDO \pm 13,32 (fibra C101). En las tasas de generación de O₂⁻ los resultados fueron de 2,69 \pm 0,15 (fibra F4) y 1,99 \pm 0,44 (fibra C101). En los ensayos *in vivo*, los probióticos y las fibras vegetales seleccionadas fueron adicionados a la dieta basal, con excepción del probiótico Ili, el cual en la larvicultura se añadió en el agua. El diseño experimental comprendió 5 tratamientos. T1: Consorcio de probióticos (Ili, P62 y P64); T2: Consorcio de probióticos + fibra F4; T3: consorcio de probióticos + fibra C101; T4: fibra F4 y T5: fibra C101. Control: solo dieta basal, posteriormente a la aplicación de los tratamientos, los camarones fueron infectados con *V. parahaemolyticus*.

En larvicultura, los tratamientos se aplicaron durante toda la cría larvaria. Probióticos y fibras vegetales afectaron la expresión de AMPs y la supervivencia. El tratamiento T3 determinó la sobreexpresión de las peneidinas semejante al tratamiento

T1, con la mayor supervivencia (90,44%). El tratamiento T1 (solo probióticos) reguló también la sobreexpresión de ALF y un descenso en la expresión de genes de crustinas, sin embargo, la capacidad inmunoestimulante de las fibras se reveló en el incremento de la expresión de crustinas cuando estas entraron en los dos tratamientos en combinación con los probióticos (T2 y T3). Luego de la infección con *V. parahaemolyticus* el análisis de supervivencia indicó diferencias en las curvas de mortalidad y valores de supervivencia más altos ($p < 0,05$) en larvas expuestas a los tratamientos T1 (97,8%); T2 (92,2%) y T3 (89,4%). La supervivencia del tratamiento T4 (fibra vegetal F4) fue superior al 50%, en tanto la supervivencia del control se ubicó en 23,3%.

En juveniles, probióticos y fibras vegetales tuvieron un efecto positivo sobre la respuesta inmune, con incrementos en la generación del O_2^- y proteínas plasmáticas. Además, los camarones tratados, exhibieron numerosos hemocitos infiltrados en los tejidos con una alta expresión de peneidinas *in situ*. Estos camarones mostraron altas supervivencias ante el desafío con *V. parahaemolyticus*. Los camarones del tratamiento T2 tuvieron la supervivencia más alta (91,1 %), seguidos por aquellos del tratamiento T1 (88,9%), y T5 (82,2%). Los camarones del tratamiento T4 presentaron una supervivencia del 73,3%. Finalmente, el tratamiento T3 terminó con el 71,4% de supervivencia. Los resultados de los ensayos *in vivo* realizados en larvas y juveniles indican la efectividad de combinar probióticos colonizadores con fibras vegetales inmunoestimulantes, como estrategia de protección de estos invertebrados contra *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Vibrio* have caused severe diseases in the farmed shrimp industry. *Vibrio parahaemolyticus*, which causes acute hepatopancreatic necrosis (AHPND), has caused great mortality and economic losses to this industry. This *Vibrio* colonizes the stomach of the shrimp and generates toxins that destroy the hepatopancreas. This thesis addressed AHPND by combining two approaches, the first was the exclusion of pathogenic *Vibrio* from shrimp surfaces using probiotics with high colonizing qualities and the second approach was immunomodulation of shrimp with immunostimulating plant fibers. The colonizing capacity of the probiotics studied (Ili, P62 and P64) was verified through observations in confocal and epifluorescence microscopy, demonstrating that these bacteria have abundant flagella (Ili), fimbriae (P62), and a combination of fimbriae and flagella (P64). These extracellular appendages help explain the adhesion capacity of the consortium's probiotics, as well as the ability to form biofilms and swarming motility, which are fundamental processes to persist and colonize external and internal surfaces of shrimp including the stomach and peritrophic membrane of shrimp larvae. Among the probiotics Ili was the most notable for its great colonization capacity.

Of 18 plant fibers evaluated *in vitro*, two were selected, the natural fiber F4 and the commercial fiber C101 for their immunostimulant qualities superior to the remaining fibers and β -1,3-glucans, immunostimulants widely used in aquaculture. Thus, in the phenol oxidase (PO) activation test, values of $698.67 \text{ mDO} \pm 10.02$ (F4 fiber) and $586.33 \text{ mDO} \pm 13.32$ (C101 fiber) were obtained. In the O - generation rates, the results were 2.69 ± 0.15 (fiber F4) and 1.99 ± 0.44 (fiber C101). In the *in vivo* trials, probiotics and selected plant fibers were added to the basal diet, with the exception of the probiotic Ili, which in larviculture was added to the water. The experimental design included 5 treatments. T1: Probiotic consortium (Ili, P62 and P64); T2: Probiotics + fiber F4 consortium; T3: probiotic consortium + fiber C101; T4: F4 fiber and T5: C101 fiber. Control: basal diet only, after the application of the treatments, the shrimp were infected with *V. parahaemolyticus*.

In larviculture, treatments were applied throughout larval rearing. Probiotics and plant fibers affected the expression of AMPs and survival. Treatment T3 determined the overexpression of penicidins similar to the treatment T1, with the highest survival (90.44%). The T1 treatment (probiotics only) also regulated the overexpression of ALF and a decrease in the expression of crustin genes, however, the immunostimulating capacity of the fibers was revealed in the increase in the expression of crustins when they entered the two treatments. in combination with probiotics (T2 and T3). After infection with

V. parahaemolyticus, the survival analysis indicated differences in the mortality curves and higher survival values ($p < 0.05$) in larvae exposed to the T1 treatments (97.8%); T2 (92.2%) and T3 (89.4%). The survival of the T4 treatment (F4 plant fiber) was greater than 50%, while the survival of the control was 23.3%.

In juveniles, probiotics and plant fibers had a positive effect on the immune response, with increases in the generation of O₂- and plasma proteins. Furthermore, the treated shrimp exhibited numerous hemocytes infiltrated into the tissues with a high expression of peneidins in situ. These shrimps showed high survival when challenged with *V. parahaemolyticus*. Shrimp from treatment T2 had the highest survival (91.1%), followed by those from treatment T1 (88.9%), and T5 (82.2%). The shrimp in treatment T4 had a survival of 73.3%. Finally, treatment T3 ended with 71.4% survival. The results of in vivo tests carried out on larvae and juveniles indicate the effectiveness of combining colonizing probiotics with immunostimulating plant fibers, as a strategy to protect these invertebrates against *Vibrio parahaemolyticus*, which causes AHPND.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*), originario de la costa del Pacífico tropical de América, se cultiva ampliamente en algunas partes del mundo y constituye una de las especies acuícolas más importantes para el consumo humano (Yue et al., 2022). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), entre la producción acuícola mundial de peces, incluidos crustáceos, moluscos, etc., el cultivo de camarón ha hecho la mayor contribución económica (FAO, 2021). A pesar del crecimiento exitoso de la industria camaronera, los brotes de enfermedades infecciosas ocasionadas por agentes patógenos como virus y bacterias siguen constituyendo una limitante para el desarrollo industrial del cultivo de camarón (Mohney et al., 1994; Noriega-Orozco et al., 2008; Thitamadee et al., 2016). Entre las enfermedades virales más agresivas que han atacado al camarón están la enfermedad de la mancha blanca (WSSV) (Chou Hsin-Yiu et al., 1995; T. W. Flegel, 2006; Rodríguez et al., 2003) y el síndrome de Taura (Hasson et al., 1995; Dhar & Thomas Allnutt, 2008). A diferencia de los virus, las bacterias, una vez que se establecen, pueden permanecer indefinidamente en los sistemas de cultivo por su capacidad para producir biopelículas (Thitamadee et al., 2016).

Los patógenos bacterianos más graves para los camarones peneidos son especies de vibrio, los cuales causan enfermedades recurrentes y emergentes (Flegel T, 2012; Lightner & Redman, 1998; Tran et al., 2013). Las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* y otras especies del género *Vibrio* portadoras de la toxina pirA y pirB, como *Vibrio owensii* y *Vibrio campbellii*, son altamente virulentas para los camarones peneidos (Lai et al., 2015) (Xiao et al., 2017). Estos vibrios son los agentes causantes de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) que ha causado grandes pérdidas e impactos socioeconómicos. Las pérdidas en la industria del camarón a nivel mundial por la AHPND se estiman en más de mil millones de dólares por año (Nunan et al., 2014; Sirikharin et al., 2015).

V. parahaemolyticus es un microorganismo marino que puede crecer en aguas estuarinas con tolerancia a altas temperaturas, pH y salinidades elevadas, con afinidad por el plancton marino y la quitina (Su & Liu, 2007; Wong et al., 2000). Los sistemas de cultivo de camarón se caracterizan por altas temperaturas, alta salinidad, abundante

presencia de exuvias y alta carga de materia orgánica. En estas condiciones, los vibrios prosperan, modulando el microbioma a su favor (Chen Y. et al., 2017). Por lo tanto, es una prioridad, considerar estos factores en la implementación de estrategias para el control de vibrios patógenos en sistemas de cultivo de camarón, (Flegel T.W. 2019).

Entre los aspectos que se deben considerar en los sistemas de cultivos cerrados, diseñados para prevenir la entrada de vibrios y otros patógenos potenciales, se encuentran: una adecuada nutrición con aditivos funcionales para mejorar la respuesta inmune (Rodríguez et al., 2007; Jian Zhang et al., 2012) y controles de bioseguridad (Cornelio, 2010). En cultivos semi-extensivos, que involucran piscinas de tierra en ambientes estuarinos muy cercanos al ambiente externo, la bioseguridad estricta no es aplicable y se deben considerar otras alternativas para proteger a los camarones contra las vibriosis (Cornelio, 2010).

Entre las estrategias de cultivo para promover la salud del camarón mejoran la respuesta del sistema inmune innato, se promueve evitar el uso de antibióticos debido al creciente riesgo de resistencia (Akhter et al., 2015; Ngo Van Hai, 2015). Se considera a la terapia antivirulencia como otra estrategia, la cual se basa en la interrupción de la comunicación bacteriana, conocida como quorum sensing (QS, por sus siglas en inglés) (Clatworthy et al., 2007; Defoirdt, 2018). Otra de las ventajas de interrumpir el QS es evitar la expresión de genes de virulencia, minimizando el riesgo de aparición de resistencia (Defoirdt et al., 2008; Rasko & Sperandio, 2010), debido a que la inhibición de la virulencia no implica afectar el crecimiento bacteriano (Lesic et al., 2007; Totsika, 2016).

La aplicación de probióticos en la acuicultura y sus grandes beneficios en la salud de los organismos han sido reportados en numerosos estudios (Hai N.V. 2015; Knipe et al., 2021; Ramirez et al., 2022; Wang et al., 2018; Wang & Gu, 2010). En estos trabajos varios mecanismos de acción como la inmunomodulación y exclusión competitiva se vinculan a la efectividad encontrada (Kesarcodei-Watson et al., 2008) (Gullian et al., 2004; Rodríguez et al., 2007). Además, los probióticos mejoran el crecimiento y la salud del huésped mediante el potenciamiento de la resistencia al estrés (Liu K. F. et al., 2010; Wang Y.C. et al., 2019). Ellos también, promueven una mejor utilización de nutrientes en los camarones al mejorar la digestibilidad del alimento (Hao et al., 2014; Olmos et al., 2020). Con el uso de probióticos, se han reportado mejoras significativas en procesos inmunitarios innatos de los camarones como la fagocitosis, formación de nódulos, incrementos en componentes humorales incluyendo proteínas, sistema profenoloxidasas

(proPO) (Lakshmi et al., 2013; Song & Li, 2014) y generación de péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) (Balcázar & Rojas-Luna, 2007). A pesar de la efectividad reportada de los probióticos, la aplicación de organismos vivos en sistemas de cultivo sigue enfrentando varios desafíos, debido a los procesos de preparación, diferentes espectros de bioactividad, estabilidad y éxito (aptitud) en diferentes ambientes de acuicultura. Bajo este contexto, otra estrategia prometedora es la mejora de la respuesta inmune.

La inmunoestimulación es la estrategia que busca activar el sistema inmune del camarón basándose en el uso de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o moléculas que se asemejan a estos, y su reconocimiento por receptores en el huésped (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov & Janeway, 1997). En esta categoría de moléculas inmunoestimulantes se incluyen diferentes polisacáridos como β -1,3-glucanos y peptidoglucanos (Amparyup et al., 2012). El uso sinérgico de probióticos e inmunoestimulantes, o el uso de polisacáridos como prebióticos, ayudan al establecimiento y aptitud de los probióticos (Al-Deriny et al., 2020; M. Chen et al., 2020a; Jian Zhang et al., 2012). El presente estudio busca mitigar las mortalidades en camarones *P. vannamei* provocadas por *V. parahaemolyticus*, en base a una estrategia de cultivo en la que se utilizan probióticos con fuerte capacidad colonizadora de superficies internas y externas y biopolímeros vegetales de tipo polisacárido (fibras vegetales) con fuerte capacidad inmunoestimulante.

1.2. Producción acuícola de camarón

Las industrias de camarones son fuentes primarias de proteínas para el consumo humano (Lakshmi et al., 2013). El camarón blanco, *Penaeus vannamei*, es la especie de peneido más cultivada a nivel mundial, representando el 83% de todo el cultivo de camarones peneidos (FAO, 2020). Entre los países de América se destaca la actividad camaronera de Ecuador, la cual inició en el año 1968 en la provincia de El Oro. Actualmente existen cerca de 220.000 hectáreas de estanques de producción camaronera, constituyendo el primer rubro no petrolero del país (Banco Central del Ecuador (BCE)/ Ministerio de Producción, Comercio Exterior, 2021). En el año 2022, la exportación de camarón generó 7289,3 millones de dólares correspondientes a 1068,9661 toneladas métricas (TM), según cifras de emitidas por el BCE (Ministerio de Producción Comercio Exterior, 2023). El crecimiento de la industria camaronera está acompañado de la tecnificación de procesos, mejoramiento genético, diagnóstico de

enfermedades e investigaciones en salud. Estos factores son claves para el manejo eficiente de los sistemas de cultivo y la sostenibilidad de la producción.

1.3. Enfermedades que afectan al camarón de cultivo

La industria del camarón ha seguido creciendo en tecnificación e intensificación, sin embargo, la producción puede disminuir por causa de enfermedades virales y bacterianas (Zorriehzahra, 2015). En la década de 1990, se registraron las primeras epidemias masivas de enfermedades virales en camarones. Primero, la causada por el virus de la cabeza amarilla (YHV, por sus siglas en inglés) en Tailandia y luego la causada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en China y Japón. Este virus se extendió en Asia y en las Américas, llegando a Ecuador en el año 1999. El síndrome de la mancha blanca causó grandes pérdidas a Ecuador provocando una crisis en el sector acuícola (Omarza Franklin, 2000). Las enfermedades virales han causado grandes pérdidas económicas en la acuicultura de camarón. Con el aumento del calentamiento global y la intensificación de los cultivos, las enfermedades bacterianas, especialmente las vibriosis, se consolidan como amenazas importantes para el desarrollo sostenible de la industria acuícola del camarón (Lightner & Redman, 1998).

1.3.1. Vibriosis en el cultivo de camarón

Enfermedades producidas por especies del género *Vibrio* han causado pérdidas económicas significativas en la industria camaronera en todo el mundo (Kua et al., 2016; Prayitno & Latchford, 1995). Perteneciente al filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, el género *Vibrio* de la familia Vibrionaceae incluye 65 especies de bacterias heterótrofas (Thompson F. et al., 2006). *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus* se encuentran entre los patógenos más importantes para camarón (Tran et al., 2013; J. Zhou et al., 2012). Las vibriosis provocan tasas masivas de mortalidad, pudiendo llegar al 100% de la producción (Flegel T.W. 2012), causan necrosis de la cola, síndrome de la cáscara suelta, intestino blanco, hepatopancreatitis séptica, vibriosis sistémica y de heridas, causando hipoxia y muerte de los camarones, tanto en larvicultura como en engorde (T. W. Flegel, 2012).

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND, es la vibriosis más agresiva registrada, detectada en China en 2009 y en países del sudeste asiático (Zorriehzahra, 2015). En 2013, se observó en México (Soto-Rodríguez et al., 2015) se extendió a América del Sur (Restrepo et al., 2018; Saavedra-Olivos et al., 2018). El agente causante de la AHPND fue identificado como una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013). Iniciando el descubrimiento que los vibrios que

originan esta enfermedad son portadores de las toxinas PirA y PirB. Dichas toxinas se detectaron en otras especies de vibrios del clado *V. harveyi*, (Xiao et al., 2017), *V. owensii* (L. Liu et al., 2018), *V. campbelli* (Wangman et al., 2018), también en un *Vibrio* que no pertenece a este clado, *V. punensis* (Restrepo et al., 2018).

Los vibrios causantes de la AHPND inician su ataque colonizando el estómago de los camarones infectados, originando disbiosis (Lai et al., 2015) (Chen et al., 2017; Hossain et al., 2021) generando toxinas que posteriormente provocan daño celular hepatopancreático (Tran et al., 2013). Finalmente se produce la septicemia hepatopancreática (Nunan et al., 2014; Thitamadee et al., 2016). Los camarones infectados con la AHPND muestran necrosis severa en el hepatopáncreas con desprendimiento masivo de las células epiteliales y pérdida total de la estructura tisular. El hepatopáncreas se observa atrofiado, pálido, y con presencia de necrosis epitelial intestinal e infiltración masiva de hemocitos (Joshi et al., 2014). *Vibrio parahaemolyticus* portadoras de genes de las toxinas PirA y PirB disminuye la diversidad bacteriana, incrementando la aptitud de los vibrios para proliferar en los ambientes de cultivo (Restrepo et al., 2021). Esta enfermedad debilitó al sector camaronero durante casi una década (Tran et al., 2013; Joshi et al., 2014; Peña-navarro et al., 2020).

1.3.2. Signos generales de camarones infectados por necrosis hepatopancreática aguda AHPND

Los camarones moribundos afectadas con AHPND presentan cromatóforos ligeramente expandidos, letargo, natación errática e intestino vacío. Presentan el hepatopáncreas decolorado y de consistencia acuosa, también se ha podido observar que el intestino está carente de alimento (Soto-Rodriguez et al., 2015). En la **Figura 1** se observan dos camarones *Penaeus vannamei*. El primero muestra las características del estado sano del hepatopáncreas con color característico y el intestino lleno, el segundo, afectado por AHPND, con un hepatopáncreas decolorado y el intestino vacío.



Figura 1. *Penaeus vannamei* en diferentes estadios de salud. a) Camarón juvenil sano. b) Camarón juvenil afectado con la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND.

1.3.3. Histopatología de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda AHPND

Histopatológicamente se pueden distinguir tres fases secuenciales de la AHPND, las cuales son aguda, intermedia y terminal (Nunan et al., 2014; Soto-Rodriguez et al., 2015). En cada fase se presentan alteraciones de funcionalidad y desprendimiento celular del epitelio de los túbulos hepatopancreáticos y zonas distales (Cornelio, 2010). Además, ocurre una degeneración de la membrana basal del epitelio llegando a la fase terminal con infiltración inflamatoria hemocítica del espacio intertubular y de la submucosa del intestino del camarón. El hepatopáncreas se vuelve necrótico.

1.4. Sistema inmune en camarones

Los camarones, como todos los crustáceos, poseen un sistema inmune que los protege eficazmente de microorganismos dañinos (Young Lee & Soüderhaäll, 2002). En los camarones peneidos se distinguen dos líneas de defensa inmune. La primera línea es una barrera física formada por la cutícula que está compuesta principalmente por quitina y depósitos minerales (Rowley, 2016). En las superficies internas, el contacto con el medio externo es muy limitado debido a la presencia de cutícula en el estómago cardiaco (Hackman, 1987), la membrana peritrófica que recubre el epitelio del intestino medio e intestino posterior (Wang & Granado, 1997) y el cedazo gástrico que limita el paso hacia el hepatopáncreas a partículas menores a 1 μm .

La segunda línea de defensa es el sistema inmune innato. Dicho sistema está basado en efectores humorales y celulares, siendo los hemocitos los principales efectores de la inmunidad, los cuales actúan en conjunto para eliminar microorganismos infecciosos (Bachère, 2003). En los camarones y otros artrópodos se ha descrito, además, la inmunidad innata con especificidad o cebado inmune. Ésta se basa en la molécula de adhesión celular del síndrome de Down (Dscam), (Ng et al., 2014), una proteína de reconocimiento hiper variable sintetizada por empalme alternativo. Dscam puede estar involucrada tanto en la inmunidad innata general como en la respuesta inmune específica a patógenos (Ng et al., 2014). Las células del camarón pueden reconocer de forma innata a los microbios invasores mediante proteínas de reconocimiento de patrones (PRR), que actúan como receptores de PAMPs (Cerenius et al., 2008). Las células inmunes innatas responden rápidamente a este reconocimiento a través de cascadas de señalización intracelular que conducen a la activación de la inmunidad celular y humoral (Tassanakajon et al., 2013).

1.4.1. Mecanismos humorales

Los efectores humorales involucran la síntesis y secreción de proteínas inmunes desde los hemocitos hasta el sistema circulatorio y/o hemocele (Tassanakajon et al., 2018) y la liberación de las enzimas de la cascada proPO que conduce a la generación de metabolitos oxidativos y el depósito de melanina (Hernández-López et al., 1996). Los patógenos son reconocidos a través de sus lipopolisacáridos (LPS), mediante las proteínas de reconocimiento de patrones, que reconocen lipopolisacáridos (LPS) y β -1,3-glucan (BGBP) (Chen Y.Y. et al., 2016; Sritunyalucksana & Soderhall, 2000; Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000), iniciándose la cadena de activación de la proPO, que culmina con la melanización de la herida o de los organismos intrusos (Cerenius & Söderhäll, 2004). Otro mecanismo de respuesta humoral constituye el sistema de coagulación, en el cual participan los hemocitos liberando transglutaminasa (Maningas et al., 2008), que reticula el factor de coagulación presente en el plasma (Ratcliffe et al., 1985).

Ante un desafío microbiano, los hemocitos, liberan, péptidos antimicrobianos (AMPs) (Muñoz et al., 2002). Los AMPs son proteínas catiónicas o aniónicas que atacan microorganismos invasores (Hancock et al., 2006; Tassanakajon et al., 2018). Los AMPs son de pequeño tamaño, de 15 a 100 aminoácidos y con estructura anfipática (Tassanakajon et al., 2011). Estas moléculas pueden difundirse rápidamente hasta el punto de infección y desestabilizar la membrana de los microorganismos, actuando como antibióticos contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Brogden, 2005), así como levaduras y hongos filamentosos (Bandeira et al., 2020). Algunos AMPs en invertebrados parecen funcionar modulando la inmunidad (Brown & Hancock, 2006; Hancock & Diamond, 2000). Los principales AMPs en camarón, están representados por tres familias de péptidos catiónicos: peneidinas, crustinas y el factor antilipopolisacáridos (ALFs) (Amparyup et al., 2008; Destoumieux et al., 1997). Los AMPs de camarón se pueden clasificar como AMPs catiónicos y aniónicos, siendo más abundantes los primeros. Solo la estilicina, un péptido derivado de la hemocianina y algunos ALF son AMPs aniónicos (Tassanakajon et al., 2018).

Las peneidinas tienen afinidad por la quitina del camarón, detectándose en la cutícula luego de un desafío microbiano (Destoumieux et al., 2000; Muñoz et al., 2002). Los ARN mensajeros (ARNm) de peneidina están presentes en todos los estadios

larvarios, pero varían en los niveles de traducción (Muñoz et al., 2003). En camarones peneidos, los homólogos de crustina han sido principalmente identificados por análisis de 'expressed sequence tag' (EST) de bibliotecas de ADN complementario (ADNc) de hemocitos de *P. vannamei*, *P. setiferus* (Bartlett et al., 2002) y *P. monodon* (Antony et al., 2011; Supungul et al., 2004). Las crustinas son la familia de AMPs más grande que se ha reportado en los crustáceos (Smith & Dyrinda, 2015). En los camarones, la mayoría de las crustinas son constitutivamente expresadas en los hemocitos (Amparyup et al., 2008; Gross et al., 2001; Jiquan Zhang et al., 2007). Los ALFs son moléculas de 10 a 14 kilodaltons (kDa) y en camarón, se identificaron por primera vez en los hemocitos de *Penaeus setiferus* (Gross et al., 2001) y *Penaeus monodon* (Somboonwivat et al., 2005; Supungul et al., 2004). Los ALFs exhiben una potente concentración mínima inhibitoria (CMI) (<6,25 µM) y un espectro de actividad antimicrobiana, cubriendo un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos filamentosos e incluso virus envueltos (Carriel-Gomes et al., 2007; Yedery & Reddy, 2009).

1.4.2. Mecanismos celulares

Los componentes celulares incluyen todas aquellas reacciones mediadas directamente por hemocitos en procesos como fagocitosis (Abnave et al., 2017), coagulación y formación de nódulos (Cerenius & Söderhäll, 2011). La clasificación e identificación de los hemocitos está basada en aspectos morfológicos, antigénicos y funcionales (Cerenius & Söderhäll, 2011; Tsing et al., 1989). Existen tres tipos de hemocitos. Los hemocitos hialinos (HH por sus siglas en inglés) no poseen gránulos, se adhieren y se extienden con facilidad, además de poseer capacidad fagocítica y estar a cargo de la coagulación, liberando transglutaminasa (Hideaki et al., 1993). Los hemocitos semigranulosos (SGH por sus siglas en inglés) poseen abundantes gránulos pequeños, intervienen en la fagocitosis, encapsulación, melanización, además de sintetizar y liberar a los AMPs (Smith & Söderhäll, 1983). Los hemocitos granulosos (LGH por sus siglas en inglés) los cuales están cargados de gránulos almacenan proteínas de reconocimiento, de adhesión, enzimas reguladoras, AMPs (Destoumieux et al., 2000) y sistema proPO (Mats W. Johansson & Söderhäll, 1985), (**Figura 2**).

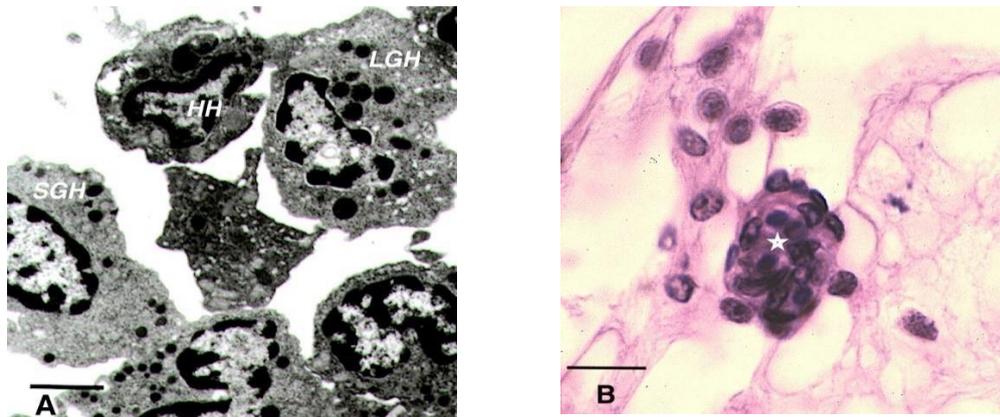


Figura 2. Hemocitos de camarón. **(A)** Hemocitos granulosos (LGH), semigranulosos (SGH) y hialinos (HH) observados por microscopio electrónico, barra = 2 mm. **(B)** Nódulo de hemocitos (estrella) en tejido conectivo de camarón, barra 12 mm. Fuente: (Ramírez et al., 2022). Uso autorizado por el editor de Bionatura.

Un número menor de hemocitos circulantes en los crustáceos se correlaciona con una resistencia reducida a los patógenos (Sarathi et al., 2007) mientras que, un incremento en el número de hemocitos aumenta la respuesta inmune durante los periodos de estrés, propiciando una mayor resistencia a las enfermedades (Campa-Córdova et al., 2002; Itami et al., 1998). Además, en los procesos de reparación de heridas en los camarones, influye la concentración de hemocitos y de peneidinas liberadas en la herida, con el fin de eliminar patógenos invasivos y mejorar la adhesión de hemocitos (Gutiérrez-Dagnino et al., 2015). El sistema circulatorio abierto de los camarones (Bayne, 1990) permite que los hemocitos se infiltren y se adhieran a muchos tejidos y órganos a través de los espacios intersticiales, sin estar limitados al sistema vascular (Reiber & McGaw, 2009).

Los nódulos hemocíticos, detectados en branquias y hepatopáncreas, están formados por numerosos hemocitos que actúan sinérgicamente para atrapar microorganismos o antígenos grandes que no pueden eliminarse mediante fagocitosis. Estos nódulos sufren la posterior activación del sistema proPO, con la consiguiente melanización y destrucción de microbios (Wang et al., 2001). Esto se ha observado en los nódulos hemocíticos formados en túbulos del hepatopáncreas de camarones infectados por vibrios (Mai et al., 2021; Soto-Rodríguez et al., 2015). Si las lesiones son muy grandes, los nódulos formarán cápsulas hemocíticas (**Figura 3A**) (Aguilar-Rendón et al., 2020). En la **Figura 3B** se observa un esferoide (estrella) en el órgano linfoide (LO, por sus siglas en inglés) de camarones infectados con WSSV. En los camarones,

las típicas reacciones de respuesta inflamatoria con infiltración de hemocitos y depósito de melanina en nódulos y capsulas son observadas durante las infecciones bacterianas (Jiravanichpaisal et al., 2006; Kumar et al., 2020).

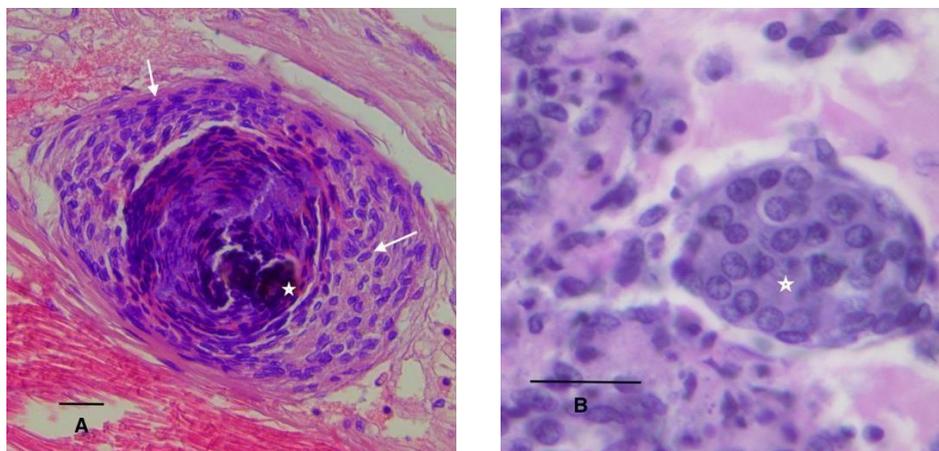


Figura 3. Signos histopatológicos relacionados con infecciones bacterianas y virales en camarones. **(A)** Nódulo hemocítico encapsulado en tejido conectivo. Obsérvese el depósito de melanina (estrella) y la infiltración masiva de hemocitos (flechas), barra = 20 mm. **(B)** esferoide (estrella) en el órgano linfoide (LO) de camarones infectados con WSSV, barra = 20 mm. Fuente: (Ramírez et al., 2022). Uso autorizado por el editor de Bionatura.

1.4.3. Otros tejidos inmunes

En los peneidos, algunas de las funciones de defensa se realizan en LO, el cual participa activamente en los procesos de captura, aislamiento y eliminación de patógenos mediante fagocitosis (Duangsuwan et al., 2008; Owens et al., 1991). El LO es una estructura bilobulada, localizada en la región anteroventral del hepatopáncreas y posterior a la glándula antenal, siendo parte integral de la porción distal de la arteria subgástrica (Rusaini & Owens, 2010; T.A. Bell, 1989). El LO se considera una parte integral del sistema circulatorio de los camarones peneidos y se cree que funciona como un filtro de la hemolinfa (Anggraeni & Owens, 2000; Bell, 1989). En cortes histológicos, se aprecia como un tejido vascularizado rodeado de senos hemales. Éstos poseen una capa interna de células endoteliales, rodeadas de tejido estromático, unidos por tejido conectivo (Duangsuwan et al., 2008; Shao et al., 2004; T.A. Bell, 1989). Ante infecciones naturales o experimentales se forman esferoides del órgano Linfoide (LOS) (**Figura 3B**). Estas estructuras también se han detectado en otros tejidos conectivos y órganos del camarón y reciben el nombre de esferoides ectópicos (Andrade et al., 2008; Kenneth W. Hasson et al., 1999) .

Se ha reportado que el LO filtra partículas virales de TSV, (Kenneth W. Hasson et al., 1999). Resultados similares fueron reportados para el WSSV (Rodríguez et al., 2012). En etapas tardías de infección, las partículas virales son detectadas en los esferoides de LO, cuyas células entran en apoptosis (Kenneth W. Hasson et al., 1999; Rodríguez et al., 2012). Además, en infecciones virales se ha reportado la apoptosis en LOS, como mecanismo de control de la replicación viral (Kenneth W. Hasson et al., 1999; Rodríguez et al., 2012). Otros tejidos implicados en los mecanismos de limpieza de la hemolinfa son los fagocitos de reserva del corazón y los podocitos de las branquias y la glándula antenal (Phyllis T, 1987). La glándula antenal es un órgano excretor importante del camarón, funcionalmente muy similar al riñón en los vertebrados.

1.5. Métodos profilácticos para controlar la vibriosis en el cultivo de camarón.

La vibriosis es la principal enfermedad bacteriana causante de mortalidad de camarones cultivados (Amatul-Samahah et al., 2020; Balcázar et al., 2006). Usar antibióticos y agentes quimioterapéuticos fue la primera medida de control de las vibriosis. Sin embargo, los antibióticos han conducido al desarrollo de microorganismos resistentes que anulan la acción terapéutica (Brunton et al., 2019; Santos & Ramos, 2018). Los antibióticos pueden afectar la microbiota de los organismos de cultivo, alterando la composición de estos en lugares específicos del organismo arriesgando la salud del cultivo (Santos & Ramos, 2018; Yen et al., 2020). El uso de antibióticos también conlleva riesgos ambientales, debido a la acumulación de residuos en el medio ambiente (Cabello, 2006). Además, niveles excesivos de antibióticos pueden deteriorar las condiciones generales de los camarones (Bray et al., 2006), con el agravante de que sus trazas pueden provocar el rechazo del producto final en los mercados internacionales. Por lo tanto, la implementación de estrategias multifactoriales efectivas y amigables con el ambiente para el control de vibrios en sistemas de producción de camarones es una prioridad (Timothy W. Flegel, 2019).

Entre las diferentes estrategias disponibles, se destaca la estrategia de antivirulencia, la cual se basa en el bloqueo de la comunicación bacteriana conocida como quorum sensing (QS), a fin de inhibir la expresión de genes de virulencia (Defoirdt et al., 2011; Hentzer et al., 2003). El mecanismo del QS utiliza pequeñas moléculas de señalización química denominadas autoinductores (AIs) (Khmel et al., 2008; Nealson et al., 1970). Esta estrategia ha sido propuesta y aplicada en la acuicultura como una herramienta promisorio para el control de bacterias patógenas (Defoirdt et al., 2011). Otras alternativas para controlar las vibriosis son el manejo del microbiota, mediante

probióticos (Kumar V. et al., 2016; Lobo et al., 2014; Verschuere et al., 2000) y la inmunoestimulación (Balcázar et al., 2006; Fernandes et al., 2021) (**Figura 4**).

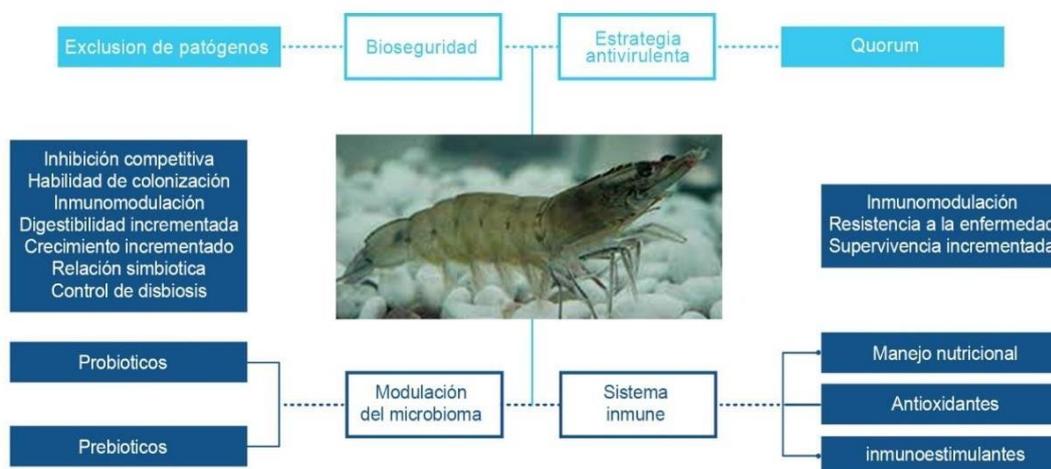


Figura 4. Enfoques para controlar la vibriosis en la acuicultura del camarón. Fuente: Ramírez et al., 2022. Uso autorizado por el editor de Bionatura.

1.6. Probióticos

En las últimas dos décadas, la práctica de utilizar probióticos en la cría de camarones ha aumentado por sus efectos positivos, convirtiéndose en una alternativa a los quimioterapéuticos (Dawood & Koshio, 2016). Los probióticos han sido aplicados en cultivos de peces e invertebrados (Einar Ringø & Gatesoupe, 1998), especialmente en América del Sur, notablemente en Ecuador, y en Asia, particularmente en China e India. Los probióticos para la acuicultura pertenecen principalmente a bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, e incluso *Vibrio*, además de levaduras (Balcázar et al., 2006; Gram et al., 1999; Toledo et al., 2018). El término probiótico fue definido por Fuller como un suplemento alimenticio microbiano vivo que mejora el equilibrio bacteriano (FULLER, 1989), beneficiando la salud del hospedero (Hill et al., 2014).

En el campo de la acuicultura, se considera al probiótico como un alimento vivo que se consume con el objetivo de proporcionar beneficios para la salud del huésped al contribuir a un mejor equilibrio microbiano dentro de la microbiota intestinal (Crittenden et al., 2005; Gram et al., 1999). Biológicamente, los probióticos son componentes activos (cultivos únicos o mixtos) de microorganismos capaces de mejorar la salud del huésped (Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006; Salminen et al., 1999).

1.6.1. Modos de acción de los probióticos

Los microorganismos probióticos viven en ecosistemas funcionales complejos, teniendo una multitud de roles y modos de acción, incluida la conversión de la dieta entrante (Kesarcodi-Watson et al., 2008). Algunos roles atribuidos a los probióticos se enlistan a continuación.

- Los probióticos tienen la capacidad de aumentar la actividad de las enzimas digestivas y mejoran el proceso digestivo (Liu C.H. et al., 2009; Suzer et al., 2008).
- Los probióticos inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (Babu et al., 2021; Farzanfar, 2006; Kongnum & Hongpattarakere, 2012) y excluyen de manera competitiva a los vibrios (Knipe et al., 2021; Newaj-Fyzul et al., 2014; Rodríguez et al., 2007),
- Los probióticos potencian mecanismos inmunes de los camarones como la fagocitosis, la formación de nódulos y la activación del sistema ProPO. También liberan varios agentes antibacterianos con propiedades bactericidas o bacteriostáticas que inhiben la colonización de patógenos en el intestino de camarones (Ben Braïek et al., 2018; S. T. Chiu et al., 2021; Šušković et al., 2010). De igual manera, pueden modular la expresión de genes inmunes y la generación de AMPs (Chomwong et al., 2018).
- Los probióticos pueden modular la microbiota intestinal (Imaizumi et al., 2021; Wei et al., 2021) durante el estrés inducido por una alta densidad de población (Chen & He, 2019).

Las bacterias del género *Bacillus* son las más utilizadas en acuicultura de camarón como probióticos, debido a que forman esporas, lo que facilita la conservación y distribución comercial. Además, este género goza de buena percepción para el consumidor por ser bacterias Gram positivas. Entre otras ventajas de los *Bacillus* están su capacidad de crecer utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Kewcharoen & Srisapoom, 2019). *Bacillus* spp pueden crecer en el medio marino y producir una variedad de compuestos bioactivos (Martínez Cruz et al., 2012; Ninawe & Selvin, 2009) que actúan sobre el crecimiento, salud y resistencia a enfermedades (Mirbakhsh et al., 2021; Shen et al., 2010), así como en la calidad del agua de cultivo (Abdollahi-Arpanahi et al., 2018; Leonel Ochoa-Solano & Olmos-Soto, 2006). Se ha reportado, además, que ciertas especies de *Bacillus* producen una amplia gama de AMPs (Abriouel et al., 2011; Yilmaz et al., 2006). La suplementación de *Bacillus* spp.,

disminuye la mortalidad en camarones expuestos a vibrios patógenos (García-Medel et al., 2020; Phung et al., 2020). Las especies más utilizadas son *Bacillus subtilis* y *Bacillus lechiformis*.

Otros probióticos utilizados exitosamente en acuicultura de camarón pertenecen a distintos géneros bacterianos, como *Vibrio* (Austin et al., 1995) o simbioses marinos como *Pseudovibrio denitrificans* (Domínguez-Borbor et al., 2019). *Vibrio diabolicus* es un probiótico muy eficaz para controlar las vibriosis que afectan a *Penaeus vannamei* en estadios larvarios (Gullian et al., 2004; Ramirez et al., 2022) y a juveniles (Restrepo et al., 2021). Al ser vibrio, esta bacteria tiene la ventaja de prosperar en las condiciones de cultivo de los sistemas acuícolas del camarón. *Vibrio diabolicus* es capaz de competir eficazmente con los vibrios patógenos (Restrepo et al., 2021), teniendo además efectos positivos sobre el sistema inmune del camarón (Fernandes et al., 2021; Gullian et al., 2004). En la **Tabla 1** se detallan algunos de los principales probióticos aplicados al cultivo de camarón.

Tabla 1. Varias bacterias probióticas aplicadas en cultivos de camarón.

Identidad del probiótico	Usado en	Método de aplicación	Efectos benéficos	Referencia
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Penaeus monodon</i>	Aditivo para piensos.	Mayor capacidad de supervivencia en el desafío contra <i>Vibrio harveyi</i> .	(Rengpipat et al., 1998)
<i>Vibrio hepatarius</i> , <i>Vibrio</i> P63, <i>Bacillus</i> P64 (<i>Bacillus cereus</i>), <i>Vibrio alginolyticus</i> (<i>Vibrio diabolicus</i>)	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo.	Pesos promedio más altos, efectos inmunoestimuladores.	(Gullian et al., 2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Actividad antimicrobiana mejorada	(Balcázar & Rojas-Luna, 2007)
<i>Lactobacillum plantarum</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Inmunidad mejorada, mayor resistencia a los vibriones	(Chiu et al., 2007)
<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Roseobacter gallaeciensis</i> , <i>Pseudomonas aestumarina</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Reducción de la enfermedad de la vibriosis	(Balcázar et al., 2007)

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Improves survival in challenge against vibrios.	(Tseng et al., 2009)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Rhodopseudomonas palustri</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo	Crecimiento y respuesta inmune mejorada.	(Yanbo Wang & Gu, 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Mejora crecimiento, aumentó la actividad de las enzimas digestivas y disminuyó la mortalidad después del desafío con <i>Vibrio.harveyi</i> .	(Zokaeifar et al., 2012)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Aditivo para piensos.	Aumento de los parámetros inmunológicos y del crecimiento.	(NavinChandran et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Alta tasa de supervivencia, respuesta inmune mejorada.	(Liu et al., 2014)
<i>Shewanella haliotis</i> , <i>Bacillus cereus</i> and <i>Aeromonas bivalvium</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Aumento de peso, mejores parámetros inmunológicos y supervivencia en desafío con <i>Vibrio harveyi</i>	(Hao et al., 2014)
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Expresión génica relacionada con la inmunidad mejorada en camarones infectados con WSSV e IHNV	(Sánchez-Ortiz et al., 2016)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Reducción de la mortalidad después del desafío con la infección por AHPND.	(Wang et al., 2018)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Crecimiento mejorado, respuesta inmune mejorada, mayor resistencia a AHPND.	(Kewcharoen & Srisapoome, 2019)
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	<i>Penaeus vannamei</i> (larva y juveniles)	Aditivo para piensos.	Aumentar la supervivencia en el desafío con <i>Vibrio campbellii</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	(Domínguez-Borbor et al., 2019)

<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus. licheniformis</i>	<i>Penaeus monodon</i>	Aditivo para piensos.	Aumento de la producción de enzimas digestivas.	(Wang et al., 2020)
<i>Bacillus</i> sp	<i>Penaeus indicus</i>	Aditivo para piensos.	Crecimiento mejorado.	(Ock Kim et al., 2020)
<i>Bacillus</i> probiotics consortium.	<i>Penaeus vannamei</i>	Adición al agua de cultivo	Aumento de los parámetros inmunológicos Mejora del crecimiento.	(Fernandes et al., 2021)

1.6.2. Consideraciones para la Selección y uso de probióticos en acuicultura de camarón

Para la selección y uso de probióticos en camarón se deben considerar varios aspectos, como la capacidad de crecer en medio marino y la capacidad de excluir a los vibrios y de competir con ellos por la colonización de los camarones y de las superficies de los sistemas de cultivo. El antagonismo bacteriano es un fenómeno común en la naturaleza; por lo tanto, las interacciones microbianas juegan un papel importante en el equilibrio entre competidores benéficos y microorganismos potencialmente patógenos (Balcázar et al., 2006). En las bacterias patógenas, la habilidad para adherirse se relaciona con la virulencia y se considera como el primer paso para una infección (Defoirdt, 2014). En este sentido, la capacidad de competir y colonizar es una de las propiedades más deseables en los probióticos. Hay varios aspectos detrás de la capacidad de competir y colonizar, siendo uno de ellos la exclusión competitiva, el cual es un fenómeno por el que la microflora establecida previene o reduce la colonización de un competidor bacteriano en la misma ubicación (Knipe et al., 2021; Moriarty, 1998).

Los probióticos deben poseer la capacidad de competencia por sitios de fijación en la mucosa y competencia por nutrientes (Moriarty, 1998). La capacidad de adherencia de los probióticos es otro de los criterios importantes para su selección y aplicación en acuicultura (Kotzamanidis et al., 2010; Lamari et al., 2014). La capacidad de colonización depende de la migración de forma coordinada a través de las superficies de organismos (Senok et al., 2005). Para estos procesos, las bacterias utilizan apéndices celulares como las fimbrias y los flagelos, los cuales son estructuras importantes para la colonización y la creación de biopelículas (Basson et al., 2008; Conrad, 2012; Schniederberend et al., 2019).

Mediante la producción de sustancias inhibitoras, los probióticos evitan la replicación del patógeno y reducen su colonización (Kumar V. et al., 2016; Moriarty, 1998). Entre los productos extracelulares que inhiben o matan bacterias potencialmente patógenas, se encuentran sustancias antimicrobianas (Ming et al., 2015; Pham et al., 2014), ácidos orgánicos (Fakruddin et al., 2017) y bacteriocinas (Iyapparaj et al., 2013), o peróxido de hidrógeno. Otro aspecto importante es la morfo fisiología del camarón. En efecto, estos invertebrados poseen una cutícula externa e interna que recubre la primera cámara del estómago (que se pierde durante la muda) y la membrana peritrófica en continuo crecimiento, cubriendo el intestino medio y el intestino posterior (Wang & Granado, 1997). Esto condiciona al uso continuo de probióticos ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo (Nimrat et al., 2011; Villamil et al., 2003).

En años recientes han surgido nuevos enfoques para la identificación y el aislamiento de nuevos probióticos. Uno de ellos es el uso de simbioses marinos. Estos simbioses están perfectamente adaptados a los ambientes marinos. *Penaeus denitrificans* es un simbiote que genera sustancias antimicrobianas, su metabolismo es muy versátil, genera inhibición competitiva contra varios vibrios patógenos de camarón e incrementa la supervivencia ante desafíos con vibrios (Domínguez-Borbor et al., 2019). Otro aspecto que está ganando relevancia es la capacidad de los probióticos de recuperar o mantener el microbiota saludable, frenando la disbiosis. El probiótico *Vibrio diabolicus* es capaz de controlar las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal, restableciendo el equilibrio microbiano (Restrepo et al., 2021).

1.7. Inmunoestimulación e Inmunoestimulantes

El sistema inmune es capaz de reconocer y reaccionar ante PAMPs a través de diferentes PRRs (Wang X. W. & Wang, 2013). Diferentes PAMPs, LPS, peptidoglicanos, y β -glucanos pueden activar el sistema inmune del camarón, actuando como inmunoestimulantes. Los inmunoestimulantes constituyen una alternativa eficaz para prevenir enfermedades en camarones. Existen varias fuentes de estas moléculas en la naturaleza, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram positivas (péptidoglicanos), hongos, levaduras y algas (β -1,3-glucanos). Los inmunoestimulantes más utilizados son los β -1,3-glucanos de distintas fuentes marinas y terrestres (Ochoa-Álvarez et al., 2021). Los β -1,3-glucanos son polisacáridos distintos del almidón que están presentes en la pared celular de bacterias, hongos y plantas. Son

utilizados para aumentar la resistencia de camarones contra bacterias e infecciones virales (Luan et al., 2021; Rodríguez et al., 2007).

Los β -1,3-glucanos extraídos de diferentes fuentes exhiben varias funciones inmunomoduladoras, debido a que actúan como PAMPs, e interactúan con los PRRs para activar la respuesta inmune innata (Sivakamavalli & Vaseeharan, 2013). Los β -1,3-glucanos extraídos de la levadura *Candida parapsilosis* tienen un efecto inmunomodulador contra WSSV en camarón, obteniéndose altas tasas de supervivencia (Wilson et al., 2015). Además de sus efectos sobre el sistema inmune, los β -1,3-glucanos de bacterias mejoran el estatus nutricional y antioxidativo de los camarones (Xu et al., 2021). Por otro lado, β -1,3-glucanos de levaduras marinas mejoran el estallido respiratorio y la actividad PO (Vidya Sagar Reddy & Ch, 2021).

Mediante la degradación de los β -1,3-glucanos, se obtienen oligo β -glucanos, con un mejor efecto inmunoestimulante y promotor de crecimiento del camarón (Luan et al., 2021). Los beneficios de usar los β -glucanos se han evidenciado por los exitosos resultados en supervivencia y rendimiento en estanques de camarón (Rodríguez et al., 2007). Efectos inmunomoduladores se han reportado incluso para otros polisacáridos que exhiben patrones repetitivos, tales como los heteropolisacáridos de arabinosa y galactosa de *Angelica sinensis* (Pan et al., 2018) y la pectina de *Theobroma cacao* (cacao) los cuales incrementan la respuesta inmune de *Penaeus vannamei* (Lee C.L. et al., 2020).

Como se describió anteriormente, en los camarones y otros artrópodos se ha descrito la inmunidad innata con especificidad o cebado inmune (Li W., 2021). Bajo la óptica de una posible respuesta inmune específica a patógenos, se han reportado ensayos de “vacunación” en camarón. En *Penaeus monodon* se ha utilizado la proteína VP28 de WSSV como antígeno, observándose efectos inmunomoduladores sobre diferentes efectores inmunes (caspasas, penaeidinas, crustinas, astquinas, syntenina, PmRACK, Rab7, STAT y lectina de tipo C) (Thomas et al., 2016).

1.8. Prebióticos

Se define a los prebióticos como fibras no digeribles que pueden mejorar el crecimiento y la actividad de las bacterias promotoras de la salud en el intestino (Gibson & Roberfroid, 1995). Del mismo modo, se han descrito a los prebióticos como ingredientes alimentarios no digeribles que se descomponen en sustancias más simples, mejorando el crecimiento y la actividad de los microorganismos benéficos que

se encuentran en el tracto gastrointestinal (Bindels et al., 2015). Los prebióticos se utilizan como fuentes de energía para las bacterias intestinales y pueden denominarse como sacáridos funcionales (Roberfroid, 1999). En general, los prebióticos son carbohidratos complejos de cadena larga que proporcionan energía a los microorganismos beneficiosos (probióticos) para mejorar la salud de un organismo.

1.8.1. Prebióticos en la acuicultura

En la industria acuícola se aplican los prebióticos como aditivos alimentarios (Abdul Kari et al., 2021; S. K. Song et al., 2014), derivados de productos de origen vegetal (Mohammadi et al., 2020), hongos comestibles (Balakrishnan et al., 2021) y algunos de productos lácteos animales. Los prebióticos se pueden encontrar de forma natural en verduras, frutas, frijoles, algas, microalgas y leche animal (Ahmadifar et al., 2019; Al-Sheraji et al., 2013; Van Doan et al., 2020). Prebióticos como los fructooligosacáridos (FOS), manano oligosacáridos (MOS), galactooligosacáridos (GOS), son aplicados en acuicultura (Ringø E. et al., 2010). También por ejemplo, oligofruktosa, xilooligosacárido, fructooligosacárido, galactooligosacáridos (Ringø E. et al., 2010), arabinoxilano-oligosacáridos (AXOS) e inulina en camarones (Li Y. et al., 2021).

1.8.2. Beneficios de los prebióticos

Entre los beneficios de los prebióticos aplicados en acuicultura se reportan mejoras en parámetros como el crecimiento del organismo, la eficiencia alimentaria, la microbiota intestinal, actividad de enzimas digestivas, adecuada morfología intestinal, estado inmune mejorado y resistencia a enfermedades (Akhter et al., 2015; Guerreiro et al., 2018). Los prebióticos pueden modificar la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal para mejorar las respuestas inmunitarias no específicas (Bailey et al., 1991) estimulando la resistencia a enfermedades de las especies acuícolas (Abdel-Latif et al., 2022; Li Y. et al., 2018).

Los estudios de aplicación de prebióticos en dieta de camarones revelan por ejemplo que la suplementación dietética de MOS puede estimular la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y el crecimiento en comparación del grupo control (Zhang et al., 2012). AXOS e inulina en dietas de camarones aumentaron los parámetros de crecimiento, así como la riqueza de la comunidad bacteriana y abundancia relativa de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Bacteriovorax* y *Lactobacillus*, mientras que se redujo la abundancia de *Vibrio* (Li 2020). Dietas en camarones con galactooligosacáridos (GOS), cambiaron las poblaciones de la microbiota intestinal, con reducción en los niveles de estrés y mejoras de la respuesta inmune (Mustafa et al., 2019).

Los prebióticos inmunoestimulantes como quitina, quitosano, y otros polisacáridos han sido estudiados en peces (Cuesta et al., 2003; Dautremepuits et al., 2004). Los polisacáridos también son utilizados con el mismo propósito en crustáceos (Hoseinifar et al., 2016; Mohan et al., 2016). Se ha reportado que FOS en concentraciones de 0,025 a 0,8% del peso, aumentó el estallido respiratorio de hemocitos de *Penaeus vannamei* (Li et al., 2007). La aplicación de ScFOs en dieta de *Penaeus vannamei* incrementó el peso y la tasa de crecimiento específico (Zhou Z. et al., 2007). En la **Tabla 2** se enlistan algunos prebióticos usados en cultivos de camarón.

Tabla 2. Prebióticos polisacáridos aplicados en cultivos de camarón.

Prebiótico	Usado en	Método de aplicación	Resultado	Referencia
Fructooligosacáridos de cadena corta (ScFOS)	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Aumento del recuento de hemocitos, estallido respiratorio de hemocitos y modificación de la comunidad microbiana.	(Li et al., 2007)
Fructooligosacáridos de cadena corta ScFOS	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Mejora del peso y aumento de la tasa de crecimiento.	(Zhou Z. et al., 2007)
Manano - oligosacáridos (MOS)	<i>Penaeus vannamei</i> (larvas)	Aditivo para <i>Artemia</i> sp.	Alta supervivencia en desafío con <i>Vibrio harveyi</i> , respuesta inmune mejorada, alto crecimiento, actividades de enzimas digestivas mejoradas.	(Widanarni et al., 2019)
Polisacárido de astrágalo (APS), ácido clorogénico (CGA) y berberina (BBR)	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Respuesta inmunitaria mejorada.	(Ding et al., 2020)
Inulina	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Aumento de peso final, mejora del estado oxidativo, y de la actividad de las enzimas digestivas.	(Zhou L. et al., 2020)
Polisacáridos de <i>Caulerpa racemosa</i> (galactosa, glucosa, manosa)	<i>Penaeus vannamei</i>	Aditivo para piensos.	Respuesta inmunitaria mejorada.	(Lee P.T. et al., 2020)

1.9. Objetivos de investigación

1.9.1. Objetivo General

Desarrollar una estrategia de cultivo basada en inmunomodulación, utilizando probióticos y biopolímeros inmunoestimulantes en camarones *Penaeus vannamei*, para mitigar mortalidades causadas por *Vibrio parahaemolyticus*.

1.9.2. Objetivos Específicos

Evaluar la capacidad de *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus* (P64) para establecer interacciones simbióticas con larvas y juveniles de *Penaeus vannamei*, mediante su capacidad colonizadora e inmunomoduladora.

Analizar *in vitro* e *in vivo* la capacidad inmunomoduladora de biopolímeros vegetales en *Penaeus vannamei*.

Determinar el posible efecto sinérgico de la interacción entre los probióticos y biopolímeros vegetales sobre las respuestas inmunes del camarón *Penaeus vannamei*.

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos, se diseñaron actividades para cada uno de los enfoques planteados. 1) Selección de organismos, actividades y técnicas para evaluar la capacidad colonizadora de las bacterias del consorcio probiótico: Se realizaron análisis de los apéndices extracelulares de las bacterias mediante microscopía electrónica, evaluación de la capacidad de formar biopelículas, movimiento en enjambre y capacidad de adherirse a las superficies externas e internas del camarón, usando bacterias teñidas con colorantes fluorocromos y uso de microscopía confocal y de epifluorescencia. 2) Actividades y técnicas para evaluar la capacidad inmunoestimulante de 18 fibras vegetales comerciales y naturales, a fin de elegir las mejores. Éstas se desarrollaron *in vitro* y fueron la determinación de la capacidad de las fibras para inducir generación de O_2^- y la activación de la PO en hemocitos. Finalmente se realizaron ensayos *in vivo* en camarones. Se trabajó combinando el consorcio de probióticos con las dos fibras más inmunoestimulantes en los ensayos *in vitro*. El efecto sobre la respuesta inmune se evaluó en larvas mediante estudios de expresión de tres AMPs, peneidinas, crustinas y ALFs. Por otro lado, en juveniles, se realizaron ensayos para medir generación de O_2^- , activación de la PO, conteo de hemocitos, cuantificación de proteína plasmática y evaluación de la expresión de peneidinas en tejidos mediante hibridación *in situ* (HIS). El efecto protector del consorcio de probióticos y fibras inmunoestimulantes se evaluó mediante ensayos de desafío con *Vibrio parahaemolyticus*, causante de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda AHPND.

2.1. Selección de organismos para los ensayos experimentales

Larvas de *Penaeus vannamei* en estadio nauplio 5 (N5), fueron transportadas a las instalaciones del Centro nacional de investigaciones de acuicultura e investigaciones marinas (CENAIM). Los N5 fueron sembrados a una densidad de 150 N5/Litro en 42 tanques de 50 Litros. El cultivo duró 16 días bajo parámetros controlados de temperatura (30 °C), oxígeno disuelto, pH y salinidad. Las larvas fueron alimentadas con una dieta basal según el protocolo del CENAIM. Camarones juveniles *Penaeus vannamei* de 3 g de peso fueron transportados a CENAIM y sembrados a 15 camarón/ 40Litros en tanques de 40 Litros, el cultivo permaneció por 50 días bajo parámetros controlados según protocolo CENAIM.

2.1.1. Bacterias y condiciones de crecimiento bacteriano

Los probióticos *Vibrio diabolicus* (cepa Ili), *Vibrio hepatarius* (cepa P62), *Bacillus cereus* (cepa P64), y el patógeno causante de AHPND *Vibrio parahaemolyticus* (cepa BA94C2) utilizados en el presente estudio fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM, ESPOL). Las tres cepas probióticas se cultivaron aeróbicamente en agar de soja tríptico con 2% de NaCl (TSA + 2% de NaCl) sembrado mediante estrías e incubando durante 18 horas a 28 °C. Las colonias individuales se transfirieron a caldo Luria-Bertani (LB) suplementado con 2% NaCl (p/V) (LB + 2% NaCl) incubando a 28 °C, con agitación constante (200 rpm) durante 8 horas.

La cepa de *Vibrio parahaemolyticus* utilizada para la prueba de desafío se cultivó en caldo de soja tríptico (TSB) con 2% de NaCl (TSB + 2% de NaCl). Se utilizó solución salina estéril (SS-2% NaCl) para ajustar la concentración densidad óptica (DO) a 620 nm para cada bacteria utilizada en el presente estudio.

2.1.2. Observación de fimbrias y flagelos de cepas probióticas en microscopía electrónica de barrido

Se tomaron colonias individuales de cultivos frescos de las tres cepas probióticas cultivadas en cajas de Petri con TSA + NaCl al 2%. Dichas colonias se resuspendieron en SS-NaCl al 2%, ajustando la concentración a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) mL⁻¹. Las suspensiones bacterianas se sometieron a centrifugación a 600 rpm durante 3 minutos hasta que se formaron los pellets. Posteriormente, los pellets se sometieron a dos lavados consecutivos para obtener una óptima observación de las células probióticas. El primer lavado se realizó con SS-NaCl al 1% y el segundo con agua milli-Q. Las bacterias fueron centrifugadas después de cada lavado, eliminándose gradualmente el exceso de NaCl. Después del lavado con agua milli-Q, cada sedimento bacteriano formado se resuspendió en 1 mL de agua milli-Q. Se depositó una gota en una rejilla para microscopía electrónica de G300. Este proceso fue repetido para cada cepa probiótica. La rejilla se empapó durante 3 segundos en la solución de contraste de ácido fosfotúngstico al 1% a un pH de 7,0. Después de absorber el exceso de solución con papel de filtro Whatman, los especímenes se observaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) en un microscopio TESCAN MIRA3 FEG-SEM de emisión de campo (Brno, República Checa) utilizado en modo transmisión. Este proceso se repitió para cada cepa probiótica.

2.1.3. Ensayos de formación de biopelículas de cepas probióticas

La formación de biopelículas de las tres cepas probióticas se evaluó siguiendo la metodología descrita por (Djordjevic et al., 2002) y modificada por (Domínguez-Borboret al., 2020). Los inóculos bacterianos se ajustaron a 1×10^8 UFC mL⁻¹, como se describió anteriormente (2.1.1). Posteriormente, con las suspensiones bacterianas, se realizó una dilución 1×10^6 UFC mL⁻¹ en SS-2% NaCl. Esta suspensión bacteriana se inoculó en una microplaca de 96 pocillos (20 µL / pocillo, 12 réplicas). Los pocillos contenían previamente 180 µL de LB. Las microplacas se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de PBS (conteniendo 2% de glucosa) por pocillo y se incubó durante 24 horas. Después de lavar con PBS, las microplacas se secaron a 50 °C durante 30 minutos. Las biopelículas bacterianas se tiñeron con cristal violeta (0,1%) durante 15 minutos, y posteriormente se lavaron con agua del grifo y se secaron a temperatura ambiente e 25°C. Las biopelículas se disolvieron con metanol y se leyeron en un lector de microplacas (Varioskan) a DO 600 nm.

Se transfirieron 4 mL de cada suspensión bacteriana a un SlideFlask (Nunc cat. No.170920) para cultivo celular y se agregó 1 mL de SS-2% NaCl estéril (concentración final 1.0 µg mL⁻¹). Los SlideFlask se incubaron a 28 °C durante 3 días. Después, las células flotantes se descartaron y los SlideFlask se lavaron con PBS. Las biopelículas se tiñeron con 1 mL de solución de AO (Sigma) al 0,25% durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, los SlideFlask se lavaron nuevamente con PBS y se retiraron los portaobjetos para la observación en el microscopio de epifluorescencia. Las biopelículas se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE E200), a una longitud de emisión entre 520 y 650 nm.

2.1.4. Ensayo de crecimiento en enjambre de bacterias probióticas

La motilidad en enjambre de las tres cepas probióticas se evaluó utilizando el protocolo descrito por Fünfhaus et al., 2018 y modificado por Domínguez et al. (2020). El medio de cultivo LB suplementado con agar al 0,8% y NaCl al 2% esterilizado en autoclave fue utilizado como sustrato. El medio LB a temperatura ambiente se dispersó en cajas Petri (100 × 15 mm), las cuales se enfriaron durante 30 minutos. Cada bacteria se sembró por triplicado usando 10 µL de suspensión bacteriana 10^8 UFC mL⁻¹ en SS-2% NaCl. Las bacterias se incubaron a 25 °C, 27 °C y 30 °C (una caja por bacteria para cada temperatura). Después de 72 horas, se midió el halo de motilidad formado por cada bacteria probiótica.

2.1.5. Ensayos de colonización, aplicación de bacterias probióticas teñidas a post larvas de camarón

Se prepararon suspensiones bacterianas a una concentración de 10^8 UFC mL⁻¹, como se describió anteriormente. Las suspensiones de bacterias probióticas se tiñeron con colorantes fluorocromos (1 mg mL⁻¹), naranja de acridina, azul de Evans y 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 15 minutos en cámara oscura. Posteriormente, se lavaron tres veces con SS-NaCl 2%. Las bacterias probióticas fueron centrifugadas después de cada lavado (3000 RCF, 20 °C, 10 minutos) para eliminar el exceso del colorante. Después del último lavado, cada sedimento bacteriano se re suspendió en 20 mL de agua de mar estéril. Estas suspensiones bacterianas se utilizaron como baños para 15 larvas de camarón. Después de 30 minutos, las larvas de camarón se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Nikon) o en el microscopio confocal (Olympus Fluo view 1200). Se repitió el mismo procedimiento con *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND teñido con naranja de acridina. Para evaluar las características protectoras de los probióticos, se observó su interacción con *Vibrio parahaemolyticus*. Este ensayo se realizó usando larvas en Z3 tratadas con cada probiótico individual y con el consorcio de los tres probióticos (Ili y P62 teñidos con DAPI, y P64 teñido con azul de Evans). Las larvas fueron expuestas a *Vibrio parahaemolyticus*, teñido con naranja de acridina, a una concentración de 10^5 UFC mL⁻¹ durante 15 minutos.

2.2. Selección de fibras vegetales con cualidades inmunoestimulantes

2.2.1. Evaluación de las fibras vegetales

Inicialmente, se realizó una evaluación *in vitro* del efecto inmunoestimulante en pruebas de generación de anión superóxido O₂⁻ y activación de la fenol oxidasa PO, los cuales son indicadores inmunes en camarones y la toxicidad (mediante la técnica de reducción del MTT) de 18 fibras de celulosa codificadas como C101, CNC-TRIS, CNC-EDA, CFM, IPCW, IPC, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9 y F10 y tres fibras comerciales C50, C20 y C101. La cuantificación de la producción de O₂⁻ se realizó en cultivos primarios de hemocitos de camarón, mientras que la activación de la PO se realizó usando extractos de hemocitos de camarón. Se utilizaron cuatro dosis, 10.0, 1.0, 0.5 y 0.1 mg mL⁻¹, con tres repeticiones para cada una. En los ensayos de detección de O₂⁻, se incluyó como desencadenante al 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (SIGMA_P8139). Para la cuantificación de O₂⁻ y la evaluación de la toxicidad de las fibras vegetales, se utilizaron sales de Hank como vehículo, con el fin de no afectar las

condiciones de cultivo de los hemocitos. De la misma manera, el PMA y los β -1,3-glucanos (usados como control) se mezclaron en sales de Hank.

2.2.2. Camarones y colección de hemolinfa

Se emplearon jeringas de 1 mL cargadas previamente con 100 μ L de anticoagulante citrato de sodio al 10% (p/v) para extraer la hemolinfa del seno ventral del camarón y se ajustó la dilución hemolinfa/anticoagulante, a una proporción final de 50/50. Para realizar el hemograma, se fijó una alícuota de 10 μ L de hemolinfa con 10 μ L de formaldehído al 3,7 %, en una relación v/v. Para los recuentos de hemocitos, se cargaron 10 μ L de la hemolinfa fijada en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se realizaron dos recuentos utilizando un microscopio de contraste de fases en aumento de 20X (Nikon, Eclipse Ci-L).

2.2.3. Cuantificación del anión superóxido (O_2^-)

La generación de O_2^- se mide utilizando el ensayo de reducción de azul de nitro-tetrazolio (NBT), siguiendo el protocolo de (Muñoz et al., 2000). El ensayo se realizó utilizando cultivos primarios de hemocitos (seis réplicas por desencadenante), preparados en microplacas de 96 pocillos. 50 μ L de hemolinfa por pocillo fueron incubados en solución salina de Hank conteniendo MgCl (26 mM) y CaCl₂ (12 mM) durante 1 hora y 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron inmediatamente 50 μ L de solución de Hank conteniendo MgCl (13 mM) y CaCl₂ (6 mM) a cada uno de los pocillos de la microplaca. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de sales de Hank, conteniendo los desencadenantes (las fibras vegetales, β -1,3-glucanoso PMA (SIGMA_P8139) por triplicado para cada desencadenante. Para determinar la actividad de base de la generación de O_2^- , se agregaron 50 μ L de sales de Hank sin ningún producto desencadenante a las tres réplicas restantes. Se incubó durante 15 minutos, y se agregaron 50 μ L de sales de Hank conteniendo NBT a una concentración de 3.3 mg mL⁻¹ a todos los pocillos, realizando una nueva incubación de 2 horas. Posteriormente, se descartó el sobrenadante de cultivo y se realizaron tres lavados, el primero con metanol absoluto y dos lavados con metanol al 70%. A continuación, las microplacas se secaron al aire durante 1 hora. El formazán precipitado (NBT reducido por O_2^-) se solubilizó con 120 μ L de KOH (1 M) y 140 μ L de DMSO. La DO se leyó en el lector de microplacas a 620 nm (Varioskan Lux Thermo Scientific). Los resultados se expresaron en tasas (actividad estimulada/actividad de base, sin estimulación).

2.2.4. Cuantificación de la activación de fenol oxidasa (PO)

La activación de la PO se realizó siguiendo la metodología de Hernández et al. (1998) modificada por Gullian et al. (2004) utilizando extractos de hemocitos. La hemolinfa se centrifugó a 800 RCF (4 °C por 10 minutos). Para obtener los extractos celulares, el sedimento de hemocitos se sometió a choque osmótico mediante re suspensión en tampón cacodilato (10 Mm) y centrifugación a 12000 RCF por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sedimento y se recuperó el sobrenadante. Este extracto de hemocitos se distribuyó en una microplaca de 96 pocillos, colocando 50 µL por pocillo. Cada fibra re suspendida en tampón cacodilato 10 Mm se analizó por triplicado. Se utilizó laminarina (SIGMA_L9634) como control positivo. La microplaca se incubó durante 77 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se agregaron 50 µL de L-Dopa diluida en tampón cacodilato en cada pocillo. La lectura se realizó en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scientific) a 490 nm cada 5 minutos, durante 20 minutos.

2.2.5. Cuantificación de proteínas plasmáticas totales.

Se realizó la cuantificación de las proteínas plasmáticas totales mediante el método de (Lowry et al., 1951) Se preparó una curva estándar utilizando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg mL⁻¹) y se realizaron 11 diluciones con agua destilada estéril. Las muestras de plasma de camarón diluidas (1:100), se analizaron por triplicado en una microplaca de 96 pocillos (20 µL por pocillo). A cada pocillo se agregaron 20 µL de la mezcla de reactivos (A: hidróxido de sodio 0.5 N, carbonato de sodio anhidro 10%; B: sulfato de cobre pentahidratado 1%; C: tartrato de sodio y potasio tetrahidratado 2%), incubando en la oscuridad. Posteriormente, se adicionaron 60 µL del reactivo de Folin- ciocalteu, incubando por 30 minutos protegido de la luz. La lectura se realizó en un lector de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scientific) a 620 nm. La concentración de proteínas en las muestras de plasma se calculó en base a la curva estándar.

2.2.6. Evaluación *in vitro* de la posible toxicidad de las fibras vegetales

La inocuidad de las fibras vegetales más eficientes se evaluó *in vitro* en cultivos primarios de hemocitos siguiendo el procedimiento descrito por (Domínguez-Borbor et al., 2018). El ensayo se basó en la capacidad de las mitocondrias para reducir el MTT de color amarillo en formazán de color púrpura, a través de la enzima succinato deshidrogenasa. Los cultivos primarios de hemocitos de camarón se activaron en sales de Hank durante 75 minutos y se expusieron a cada fibra vegetal durante 2 horas a

diferentes concentraciones. Posteriormente se incubó durante 2 horas con 5 mg mL⁻¹ de MTT disuelto en sales de Hank. El sobrenadante y los cristales de formazán se disolvieron con isopropanol mezclado con ácido clorhídrico 0.04 N. La reacción colorimétrica se leyó a 620 nm. Los resultados se transformaron en porcentajes de viabilidad celular, considerando el cultivo primario de hemocitos sin exposición a fibras vegetales como la respuesta control de la respiración celular óptima (máxima viabilidad celular). Las concentraciones evaluadas para las fibras de vegetales fueron 1,0 y 0,5 mg mL⁻¹.

2.3. Ensayos *in vivo*. Efecto del consorcio de probióticos (Ili, P62 y P64) y las fibras inmunoestimulantes F4 y C101 sobre la supervivencia de larvas de camarón desafiadas con *Vibrio parahaemolyticus*

2.3.1. Diseño experimental y tratamientos en la cría larvaria

Se obtuvieron nauplios 5 (N5) libres de patógenos de un laboratorio de la Península de Santa Elena. Estos nauplios se cultivaron en 36 acuarios de 50 L de agua de mar tratada con UV, con aireación permanente y temperatura de 30 °C, a una densidad de siembra inicial de 150 N5/L. Durante 20 días, P62, P64 y las fibras F4 y C101 se aplicaron dos veces al día en el alimento. Los probióticos P62 y P64 (1 x 10⁵ UFC mL⁻¹) así como las fibras vegetales F4 y C101 se mezclaron en el pienso (1 mg/kg). Para evitar la lixiviación, el pienso se revistió con aceite de pescado a razón de 30 mL/kg. El probiótico Ili se aplicó en el agua dos veces al día a una concentración 1 x 10⁵ UFC mL⁻¹. Diariamente se renovó 20% del agua de los acuarios, removiendo mediante sifón los restos de alimento y las heces. El diseño experimental consistió en 6 tratamientos y 6 repeticiones para cada uno de ellos como se detalla en la **Tabla 3**. El tratamiento 6 (T6) recibió la dieta basal y no fue expuesto a los probióticos ni a las fibras.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos en larvas de camarones *Penaeus vannamei*.

Tratamiento	Descripción	
T1	Probiótico Ili en agua + P62 + P64 en dieta basal	
T2	Probiótico Ili en agua + P62 + P64 en dieta basal + fibra F4	
T3	Probiótico Ili en agua + P62 + P64 en dieta basal + fibra C101	

T4	Dieta basal + Fibra F4	
T5	Dieta basal + Fibra C101	
T6 (Control)	Dieta basal sin tratamiento	

2.3.2. Análisis de la expresión de los genes de péptidos antimicrobianos (peneidinas, crustina y antilipopolisacaridos ALF) mediante RT-qPCR

Este análisis se realizó en PLs de camarón. El período de exposición a los tratamientos terminó en el estadio PL 8. En este punto, se realizó la recolección de las muestras en tres acuarios de cada tratamiento. Por lo tanto, se obtuvieron 21 muestras para los ensayos de expresión génica. Para ello, se pesaron entre 0,15 y 0,22 g de PL y se colocaron en microtubos de 1,5 mL estériles. Inmediatamente, se añadió un volumen de 5 veces la solución estabilizadora RNA later (Ambion, Life Technologies), por tubo, y se llevaron las muestras a 4 °C durante toda la noche. Las muestras se transportaron en hielo seco al Laboratorio de Nanomedicina y Nanobiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE, Sangolquí), donde fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Para realizar la extracción de ARN se utilizó el kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Luego, se realizó la remoción de ADN contaminante de las muestras con el kit TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Para ello, se añadieron 5 µL de 10X TURBO DNase Buffer y 1µL de TURBO DNase a cada muestra, y se mezcló vigorosamente. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para realizar la cuantificación de ARN se utilizó el espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Se determinó la pureza de las muestras analizando los ratios 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm. Para evaluar cualitativamente el ARN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se utilizó SYBR Safe (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Para sintetizar el ADNc se utilizó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El master mix de reacción para la síntesis de ADNc, se detalla en la **Tabla 4**. Se dispensaron 14 µL de master mix en cada tubo de PCR de 0,2 mL, y posterior se añadieron 6 µL de muestra, completando un volumen final de 20 µL. Los tubos se colocaron en el termociclador (TECHE

FTC51H2D) con el siguiente programa: 1 hora a 50 °C, 5 minutos a 85 °C, y 10 minutos a 4 °C. Después de la síntesis, las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C.

Tabla 4. Master mix de reacción (44x) para la síntesis de ADNc.

Reactivo	C _{final}	V(1x)	V(44x)
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer	1x 8 mM MgCl ₂	4 µL	176 µL
Protector RNase Inhibitor	20 U	0,5 µL	22 µL
Deoxynucleotide Mix	1 mM	2 µL	88 µL
Transcriptor Reverse Transcriptase	10 U	0,5 µL	22 µL
Anchored- oligo(dT) ₁₈ primer	2.5 µM	1 µL	44 µL
H ₂ O, PCR grade	---	6 µL	264 µL
TOTAL		14 µL	616 µL

La amplificación de los genes se llevó a cabo en el equipo LightCycler® 96 (Roche) empleando el kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL, conteniendo 1 µL de ADNc. Cada dilución se probó por duplicado, y se incluyó un control negativo (sin ADNc). En el software del equipo LightCycler® 96, se definió cada muestra como 'estándar' y se ingresaron las concentraciones correspondientes, para que se procesen los cálculos de todos los parámetros de la curva estándar. En la **Tabla 5** se enlistan los iniciadores utilizados tanto de los genes de referencia, proteína ribosomal 40S-S24, factor de elongación alfa (EF1α), y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) así como de los Péptidos antimicrobianos AMPs (ALF, crustina y peneidina 3a). Las condiciones de RT-qPCR se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Iniciadores utilizados para los ensayos de RT-qPCR de AMPs.

Gen	Secuencias de los primers (5'-3')	Número de acceso GenBank	T _m (°C)	Tamaño del producto (bp)	Ref.
40S-S24	F: CAGGCCGATCAACTGTCC	XM_027373709.1	60	204 pb	(Alvarez-Ruiz et al., 2015)
	R: CAATGAGAGCTTGCCTTTCC		60		

EF1 α	F: TGGCTGTGAACAAGATGGACA	GU136229.1	63	103 pb	(Barreto et al., 2018)
	R: TTGTAGCCACCTTCTTGACG		62		
GAPDH	F: CCATGGAATGTTCTCGGGCT	KT861451	64	120 pb	(Valenzuela-Castillo et al., 2017)
	R: AAGTATGACAGCACCCACGG		61		
ALF	F: GCTTCACCGTCAAACCTTACATC	DQ208702	62	193 pb	(Maralit et al., 2018)
	R: CACCGCTTAGCATCTTGTTTCG		63		
Pen-3a	F: CACCCTTCGTGAGACCTTTG	Y14926	61	141 pb	(Pourmozaffar et al., 2017)
	R: AATATCCCTTTCCACGTGAC		60		
Crustina	F: CCCACAAGTCCGTCCCACAT	XM_027352254.1	65	160 pb	(Shockey et al., 2009)
	R: TCATCCAAAAACCTGCGATCCG		68		

Tabla 6. Gradiente de temperatura utilizado para el ensayo de PCR convencional.

Genes	Gradiente de temperatura (°C)
Proteína ribosomal 40S-S24	55 – 58 – 61
EF1 α	58 – 61 – 63
GAPDH	58 – 61 – 63
ALF	58 – 61 – 63
Pen-3a	55 – 58 – 61
Crustina	60– 63 – 66

2.3.3. Ensayos de cuantificación relativa

Una vez estandarizados los ensayos de RT-qPCR, se procedió a analizar la expresión relativa de los genes ALF, Pen-3a, y crustina en PLs 8. La cuantificación relativa se basa en la comparación de los niveles de dos genes diferentes (el gen de interés y el de referencia), en la misma muestra, y expresa ese resultado como el ratio de los genes. Se asume que la expresión del gen de referencia se mantiene constante bajo todas las condiciones de prueba. Se añadieron 9 μ L del master mix y 1 μ L de muestra en cada pocillo de la placa para qPCR (LightCycler® Multiwell Plates, Roche). Cada muestra se preparó por triplicado y se incluyó un control negativo (sin ADNc) por

ensayo. Como se observa en la **Figura 5**, cada tratamiento tuvo tres repeticiones biológicas, y se realizaron tripletas de las muestras para los ensayos de RT-qPCR. Por ende, se obtuvieron 9 valores de ciclo umbral de amplificación (Cq) por tratamiento. En el presente ensayo, se utilizaron dos genes de referencia (40S-S24 y GAPDH) y las muestras del tratamiento 6 (T6) como calibrador, por encontrarse sin tratamiento.



Figura 5. Diseño de placa para los ensayos de cuantificación relativa.

A continuación, se presenta la fórmula para el cálculo de la expresión relativa, la misma que depende de los valores de Cq obtenidos y de la eficiencia de amplificación.

$$Expresión\ relativa = \frac{E_T^{(Cq_{T,cal} - Cq_T)}}{\sqrt{E_{R1}^{(Cq_{R1,cal} - Cq_{R1})} \times E_{R2}^{(Cq_{R2,cal} - Cq_{R2})}}}$$

Donde:

- E_T = Eficiencia de amplificación del gen target
- E_{Ri} = Eficiencia de amplificación del gen de referencia i
- Cq_T = Valor de Cq del gen target
- Cq_{Ri} = Valor de Cq del gen de referencia i
- Cal = Calibrador del estudio

2.3.4. Análisis estadístico. Tratamiento de valores de Cq

Inicialmente se contó con información de los valores de Cq de la expresión de 5 genes (40S-S24, crustina, ALF, GAPDH, Pen-3a) y 6 tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5 y T6). Con esta información se procedió a evaluar descriptivos básicos como: mínimo,

máximo, mediana, moda, media, desviación estándar (DE) y coeficiente de variabilidad (CV). Además, se estimaron al 95% los límites superiores e inferiores de confianza para el Cq promedio. Se verificó el ajuste de los datos a la distribución normal y la homogeneidad de grupos. Para ver diferencias significativas preliminares, se realizó un contraste de hipótesis de diferencia de Cq por dos factores (gen y tratamiento).

2.3.5. Análisis de expresión relativa (radio)

Una vez calculados los valores de expresión relativa (radios), se procedió a evaluar descriptivos básicos como: mínimo, máximo, mediana, moda, media, DE., y CV. Además, se estimó al 95% los límites superiores e inferiores para las radios promedio (Anexos 5 - 6 - 7). Se realizaron gráficos box-plot (caja y bigote) y gráficos de límite de confianza superior e inferior. En virtud de la estructura de cálculo de expresión relativa, y considerando el hecho de que los valores Cq se ajustaron a la distribución normal, se verificó que los radios pueden modelarse con una distribución Log-Normal, cuyos parámetros se estimaron por máxima verosimilitud. Se realizaron los gráficos de contornos de verosimilitud, densidades y distribuciones estimadas (Anexo 8). Por último, se calculó la probabilidad de que el radio sea mayor a 1: $P(\text{radio} > 1)$ y el intervalo de 14,7% de verosimilitud para esta probabilidad. Esto permitió contrastar los tratamientos (en cada gen) con mayor probabilidad de generar radios mayores a 1.

2.3.6. Desafío con *Vibrio parahaemolyticus* y análisis de supervivencia

Larvas de camarones en estado de PL 8 tratadas durante 18 días con el consorcio probióticos (Ili, P62 y P64) y fibras vegetales (F4 y C101) fueron desafiadas con *Vibrio parahaemolyticus* (cepa BA94C2) siguiendo la metodología de (Domínguez-Borbor et al., 2019). Las PL8 se transfirieron a viales que contenían 200 mL de agua de mar filtrada y esterilizada con UV, sin aireación, con temperatura 29,5 ° C. Todos los tratamientos contenían 30 PL8 con 5 réplicas por tratamiento, y un control sin tratamiento.

Se cultivó *Vibrio parahaemolyticus* durante 8 horas en medio TSB que contenía NaCl al 2%. El cultivo bacteriano se centrifugó (4000 RCF, 10 minutos, 25 °C) y los sedimentos bacterianos resultantes se re suspendieron en solución salina (NaCl-2%). La DO de esta suspensión bacteriana se ajustó a 600 nm equivalente a concentraciones de 10^5 UFC mL⁻¹. Se agregaron 0,2 mL del inóculo bacteriano a todos los viales. El recambio de agua (50%) se realizó 24 horas después de la infección y se determinó la supervivencia cada 2 horas durante 48 horas.

2.4. Efecto inmunoestimulante del consorcio probiótico (Ili, P62 y P64) y fibras vegetales F4 y C101 en camarones juveniles *Penaeus vannamei*

2.4.1. Diseño experimental y tratamientos aplicados a camarones juveniles

Penaeus vannamei

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

Los camarones fueron alimentados con una dieta comercial (5% de su biomasa) dos veces al día durante todo el bioensayo (50 días). El pienso se mezcló con el consorcio de probióticos P62 y P64 (1×10^8 UFC mL⁻¹) y las fibras vegetales F4 y C101 (1 mg/kg de pienso). El probiótico Ili se añadió en el agua a una concentración de 10^5 UFC mL⁻¹. Para evitar la lixiviación, el pienso se revistió con aceite de pescado a razón de 30 mL/kg. Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y fueron denominadas de manera similar al ensayo con larvas de camarones de *Penaeus vannamei*, exceptuando el control interno del CENAIM, el tratamiento 9 (T9), el cual solo recibió el probiótico Ili. Antes de la prueba de desafío con *Vibrio parahaemolyticus*, se pesaron los camarones y se extrajeron muestras de hemolinfa de 15 camarones por tratamiento (sin reemplazo). Las muestras de hemolinfa se utilizaron para realizar análisis inmunológicos, hemogramas, generación de anión superóxido O₂⁻, activación de fenol oxidasa PO y cuantificación de proteínas plasmáticas.

2.4.2. Análisis inmunológico realizados en camarones tratados con probióticos

Se extrajo la hemolinfa del seno ventral de camarones *Penaeus vannamei* tratados con el consorcio probiótico en estudio y se ajustó la dilución con anticoagulante a una proporción final de 50/50. Después de tomar las alícuotas de hemolinfa para el análisis de la producción de O₂⁻ y el recuento de hemocitos, las muestras de hemolinfa se centrifugaron (800 RCF por 10 minutos). Los sedimentos de hemocitos se emplearon para preparar extractos para el análisis de activación de la PO. En las muestras de sobrenadante (plasma), se midieron las proteínas plasmáticas.

2.4.3. Histopatología

Se tomaron muestras de camarones antes de la prueba de desafío. Las muestras para histología se conservaron utilizando el fijador de Davidson (330 mL de alcohol etílico al 95%, 220 mL de formol al 37%, 115 mL de ácido acético y 335 mL de agua destilada). El protocolo utilizado para el análisis histológico se basó en la metodología descrita por (T.A. Bell, 1989) con ligeras modificaciones. Se obtuvieron cortes histológicos de 4 μm del cefalotórax de camarón. Los especímenes se tiñeron con hematoxilina y eosina (E&H) y se observaron al microscopio (Nikon Eclipse E200) con lentes de 4, 10 y 40 x. Se hizo énfasis en las lesiones de AHPND, presencia de hemocitos infiltrantes, presencia de esferoides en el LO, tejido conectivo, glándula antenal, hepatopáncreas, intestino, tejido hematopoyético, músculo, tejido nervioso y corazón. Los grados de severidad de las lesiones se registraron según el procedimiento de Panchana et al. (comunicación personal), que da un valor numérico cualitativo de 1 a 4 según el grado de gravedad de las lesiones.

2.4.4. Preparación de la sonda de peneidinas.

Las sondas se prepararon a partir del ARN de hemocitos de camarón. La hemolinfa se tomó de 10 camarones que pesaban 12 gramos. El ARN total de los hemocitos de camarón se obtuvo usando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen™), siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración y pureza se midieron utilizando un lector de microplacas (Varioskan), en concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y absorbancia 260 nm/280nm obteniendo 1,7 y 2,1. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando el sistema de RT-PCR de un solo paso SuperScript™ III con el sistema de RT-PCR cuantitativa Platinum™ Taq DNA Polymerase Quantitative (Invitrogen). Se siguieron las instrucciones de los fabricantes para las reacciones de un paso. Se utilizó una mezcla de reacción 2 x SSIII RT/Platinum, Taq Mix y MgCl_2 (concentración final 5 mM) y cebador 20 x (FORWARD 5'-GTGTACAAGGGCGGTTACACG-3'; REVERSE 5'-CAACAGGTTGTCAAGCGAGGT-3' (Destoumieux et al., 1997). A continuación, se añadió la muestra de ARN a la mezcla maestra de cada tubo (20 μL de volumen total) y se mezcló el contenido. El paso de RT-PCR implicó la incubación a 55 °C durante 20 minutos. Los ciclos de PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 minutos, seguida de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 55 °C durante 45 segundos. La amplificación se realizó en el termociclador Veriti (biosistema aplicado). Para verificar la especificidad, los productos amplificados se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen (Corea). Las sondas realizadas se marcaron con Digoxigenina.

2.4.5. Hibridación *in situ* (HIS) para detectar la expresión de peneidina en tejidos de camarón *Penaeus vannamei*

Se colocaron secciones histológicas de 6 camarones de cada tratamiento en placas cargadas positivamente (Fisher Scientific). Después de la desparafinización, hidratación, digestión con proteinasa K y post-fijación, las secciones se cubrieron con 100 μL de solución de hibridación (50% de formamida, 1% de solución de Denhart en concentración final, 10% dextrano, y 4 % en concentración final de tampón de solución citrato salino (SSC) (NaCl 3 M, citrato de sodio 300 mM, pH 7), 0,5 mg mL⁻¹ de ADN de esperma de salmón, 1 mM EDTA, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y la sonda (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Los especímenes se incubaron a 40 °C durante 18 horas, en cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con SSC. Después de equilibrar las secciones con 500 μL de tampón de Tris salino (TBS: Tris HCl 100 mM a pH 7.4 y NaCl 150 mM), se añadieron 500 μL de solución de bloqueo. Finalmente, la detección se realizó con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y se visualizó utilizando como sustrato NBT y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP). Se utilizó una contra tinción de 1 minuto con Bismark Brown al 1%. Después de lavar los portaobjetos, las muestras se deshidrataron y se impregnaron en permount (Sp15-100). Las secciones se visualizaron en un microscopio óptico (Olympus).

2.4.6. Prueba de desafío en camarones juveniles *Penaeus vannamei* con *Vibrio parahaemolyticus*.

Los camarones *Penaeus vannamei* con un peso de 5,88 \pm 0,66 g, tratados durante 50 días con el consorcio de probióticos y las fibras vegetales, fueron desafiados con *V. parahaemolyticus* (cepa BA94C2), siguiendo la metodología descrita por (Domínguez-Borbor et al., 2019). Los camarones juveniles fueron transferidos a acuarios que contenían 20 Litros de agua de mar filtrada y esterilizada con UV. Se proporcionó aireación continua y la temperatura fue de 29,7 \pm 2 °C. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones (15 camarones juveniles por unidad experimental). Se cultivó *Vivrio parahaemolyticus* durante 8 horas en medio TSB que contenía NaCl al 2%. El cultivo bacteriano se centrifugó (4000 RCF, 10 minutos, 25 °C) y los sedimentos bacterianos resultantes se re suspendieron en solución salina (SS-2% NaCl).

La DO de esta suspensión bacteriana se ajustó a 600 nm \sim 0.5, equivalente a una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹. Se agregaron 20 mL del inóculo bacteriano a todos los acuarios. El recambio de agua (50%) se realizó 24 horas después de la infección y

se determinó la supervivencia cada 2 horas durante 48 horas. Se tomaron muestras para histopatología e HIS de camarones moribundos y supervivientes.

2.4.7. Análisis Estadístico

Los experimentos *in vitro* e *in vivo* se realizaron en réplicas de $n=3$ y $n=6$ respectivamente. Se realizó el análisis descriptivo de los datos, reportando el valor promedio, error estándar y el valor de significancia (M, SE, p-value). Posteriormente, los datos se evaluaron con una prueba de normalidad de Shapiro Wilk y con la prueba de homocedasticidad de varianza de Levene, con un valor de significancia (α) de 0,05. Los datos que aprobaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad se analizaron con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un valor de significancia (α) de 0,05. De acuerdo a los factores evaluados en cada experimento, se realizó una prueba bifactorial, trifactorial o de medidas repetidas. El resultado de las pruebas ANOVA, se reportaron con el valor de F (grados de libertad de factor, grados de libertad de error) y el valor de significancia (p). Además, se realizaron pruebas post-hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar si las diferencias entre grupos dentro de los factores fueron significativas. Los análisis se realizaron con el software estadístico IBM SPSS Statistics v25.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las bacterias probióticas, Ili, P62 y P64

3.1.1. Caracterización morfológica en microscopía electrónica

Mediante SEM se visualizó la presencia de fimbrias y flagelos en las células bacterianas probióticas (**Figura 6**). Celularmente, Ili es una bacteria ovalada, presenta extremos redondeados con tamaño entre 1,3 - 2,2 μm de longitud y 0,6 - 0,9 μm de ancho, con una presencia distintiva de numerosos flagelos laterales (**Figura 6A**). La bacteria P62 tiene celdas de forma ovalada con un tamaño entre 1,4 - 2,7 μm de longitud y 0,8 - 1,7 μm de ancho con una membrana plasmática bien definida donde se anclan las fimbrias (**Figura 6B**). P64 es un bacilo con un tamaño entre 1,5 - 2,9 μm de largo y 0,8 - 1,2 μm de ancho, además de poseer una membrana plasmática con presencia de flagelos y fimbrias (**Figura 6C**).

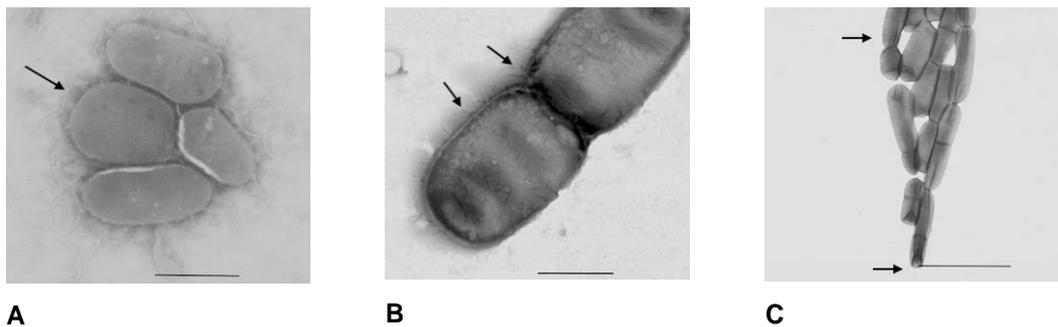
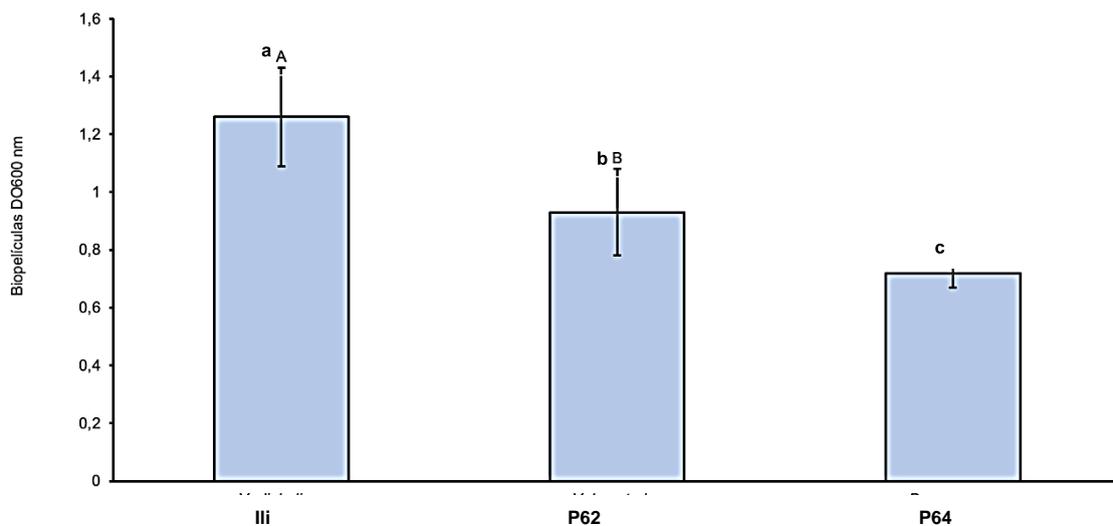


Figura 6. Micrografías electrónicas (SEM) de bacterias probióticas.

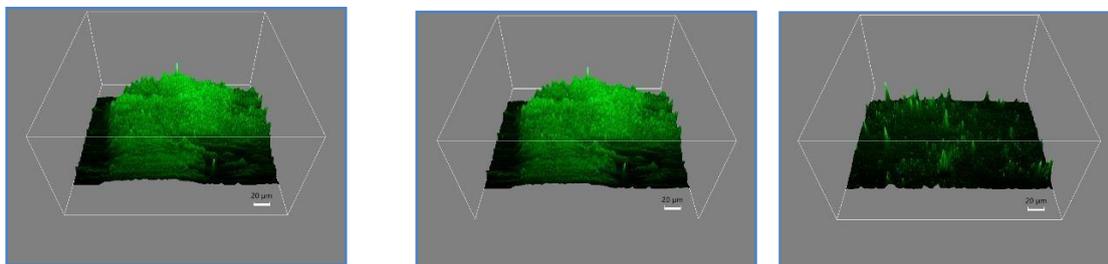
A) *Vibrio diabolicus* (Ili) con presencia de flagelos, barra 1 μm . **B)** *Vibrio hepatarius* (P62) con numerosas fimbrias pequeñas, barra: 1 μm . **C)** *Bacillus cereus* s.s. (P64) presenta finas fimbrias y flagelos, barra: 5 μm .

3.1.2. Formación de biopelículas.

Las tres bacterias probióticas en investigación formaron biopelículas después de 48 horas de incubación. La biopelícula más fuerte ($P < 0,05$) fue formada por la bacteria probiótica Ili, seguida de P62 y P64 (**Figura 7A**). Estos resultados se confirmaron cuando se realizó la tinción de las biopelículas con el colorante AO, como se puede observar en la **Figura 7B**.



A



B

Figura 7. Ensayos de biopelícula realizados con los probióticos Ili, P62 y P64. **A)** Biopelículas de los tres probióticos teñidos con cristal violeta. Los puntos de datos se representan como la media \pm DE, (12 repeticiones) y corresponden al porcentaje de formación de biopelícula normalizado frente al valor promedio. **B)** Biopelículas de los tres probióticos teñidos con AO, foto 3D.

3.1.3. Ensayos de motilidad de enjambre

La motilidad de enjambre de las tres bacterias probióticas (Ili, P62 y P64) cambió significativamente ($P < 0,05$) según la temperatura de incubación resultando con diferencias significativas en la que se destaca a la bacteria Ili alcanzando su máximo crecimiento a temperaturas de 27 °C ($P < 0,05$) como se observa en la **Figura 8**. El crecimiento en enjambre de Ili fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la de las otras bacterias probióticas a todas las temperaturas (**Tabla 7**).

El probiótico P62 (*Vibrio hepatarius*) y P64 (*Bacillus cereus*) exhibieron menor motilidad de enjambre a 25 °C con un tamaño de $13,83 \pm 0,29$ mm y $16,33 \pm 0,58$ mm respectivamente (**Tabla 7**). Si bien la motilidad de enjambre de P64 no se vio afectada por la temperatura, a 25 °C el crecimiento del enjambre fue significativamente más alto ($P < 0,05$) en comparación con el probiótico P62 (**Tabla 7**).

Tabla 7. Motilidad de enjambre (mm) de las tres bacterias probióticas.

Bacteria	CÓDIGO	T: 25 °C	T: 27 °C	T: 30 °C
<i>V. diabolicus</i>	ILI	20,33 ± 1,15 a	31,33 ± 3,51 a	29,66 ± 3,8 a
<i>V. hepatarius</i>	P62	13,83 ± 0,29 b	15,52 ± 0,87 b	16,67 ± 0,28 b
<i>B. cereus</i> S.S.	P64	16,33 ± 0,58 c	17,33 ± 0,11 b	16,03 ± 0,12 b

La migración se expresa en (mm), después de 72 horas de incubación. Los resultados se presentan como media ± DE, 5 repeticiones. Diferentes letras minúsculas indican las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las bacterias en la motilidad de enjambre.

El probiótico P62 (*Vibrio hepatarius*) y P64 (*Bacillus cereus*) exhibieron menor motilidad de enjambre a 25 °C con un tamaño de $13,83 \pm 0,29$ mm y $16,33 \pm 0,58$ mm respectivamente (**Tabla 7**). Si bien la motilidad de enjambre de P64 no se vio afectada por la temperatura, a 25 °C el crecimiento del enjambre fue significativamente más alto ($P < 0.05$) en comparación con el probiótico P62 (**Tabla 7**).

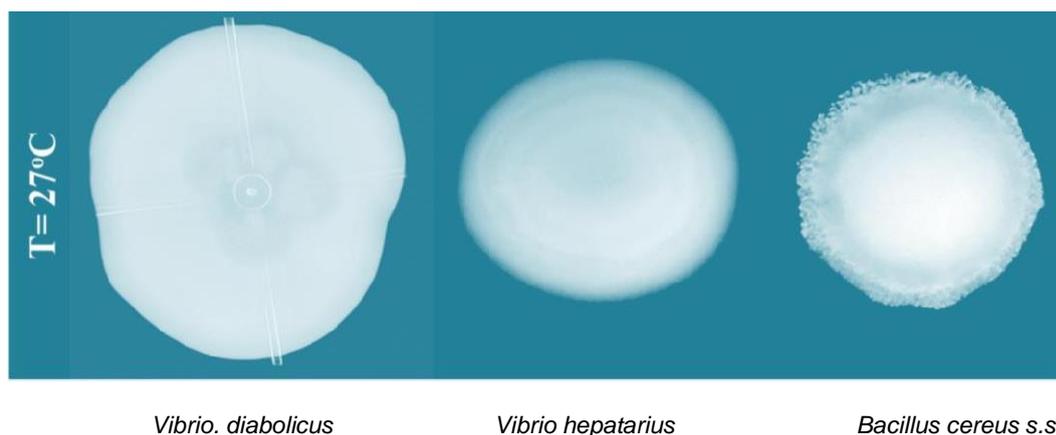


Figura 8. Ensayo de motilidad de enjambre realizado con tres bacterias probióticas *Vibrio diabolicus* (ILI), *Vibrio hepatarius* (P62) y *acillus. cereus* (P64).

3.1.4. Ensayo *in vitro* de la colonización de bacterias probióticas de larvas de camarón *Penaeus vannamei*

La microscopía de fluorescencia permitió el análisis tridimensional de la colonización de los probióticos marcados con los fluoróforos DAPI, azul de Evans y naranja de acridina en larvas de camarón. En la **Figura 9A** y **9B**, los probióticos Ili y P62 teñidos con DAPI se adhirieron a la cutícula externa del nauplio de camarón (N5). En la **Figura 9C**, el probiótico P62 teñido con naranja de acridina colonizó la zona oral, estómago, hepatopáncreas y la cutícula de larvas de camarón (Zoea 1). El probiótico Ili teñido con DAPI se adhiere a la cutícula externa y a la membrana peritrófica del intestino

en PL de camarón (PL2) (**Figura 9D**). La señal del probiótico P64, teñido con azul de Evans, fue observada en el hepatopáncreas de PL2 del camarón *Penaeus vannamei* (**Figura 9E**).

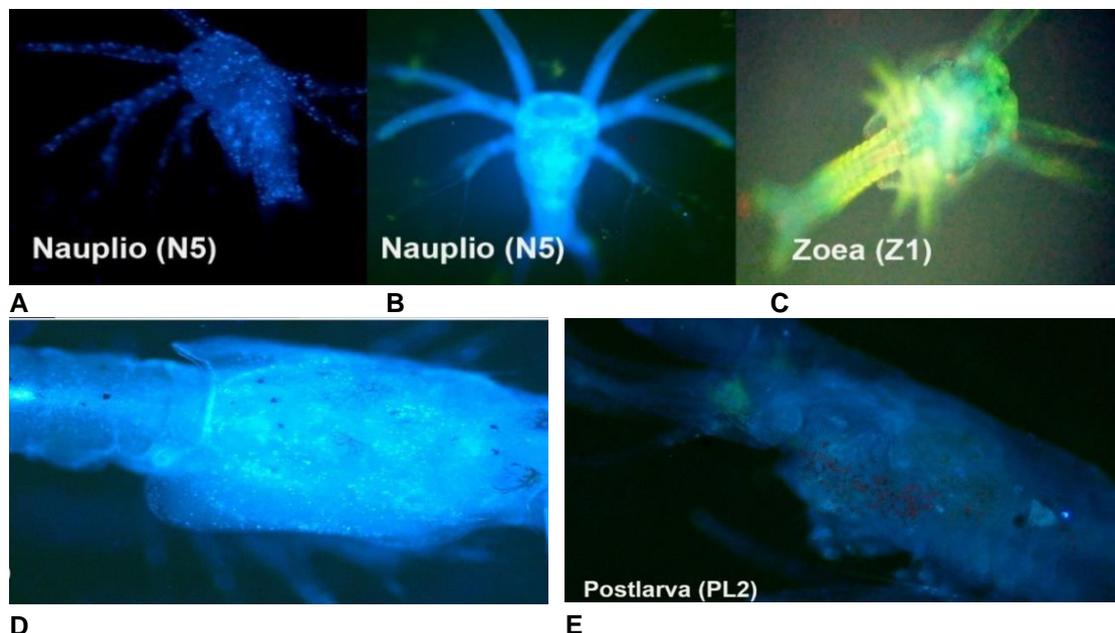


Figura 9. Micrografías de epifluorescencia de larvas de camarón expuestas a probióticos teñidos con tintes fluorocromos. **A)** Probiótico Ili teñidos con DAPI. **B)** Probióticos P62 teñido con DAPI. **C)** Probióticos P62 teñido con naranja de acridina. **D)** Probiótico Ili teñidos con DAPI (PL2). **E)** Probiótico P64 teñidos con azul de Evans.

La microscopía confocal muestra a la cepa probiótica Ili unida a la cutícula de la zona oral (**Figura 10 A**). En la **Figura 10B**, la cepa probiótica P62 teñida con AO se adhiere a la membrana peritrófica del intestino. En la **Figura 10C**, el probiótico P64 teñido con DAPI se observa en los urópodos.

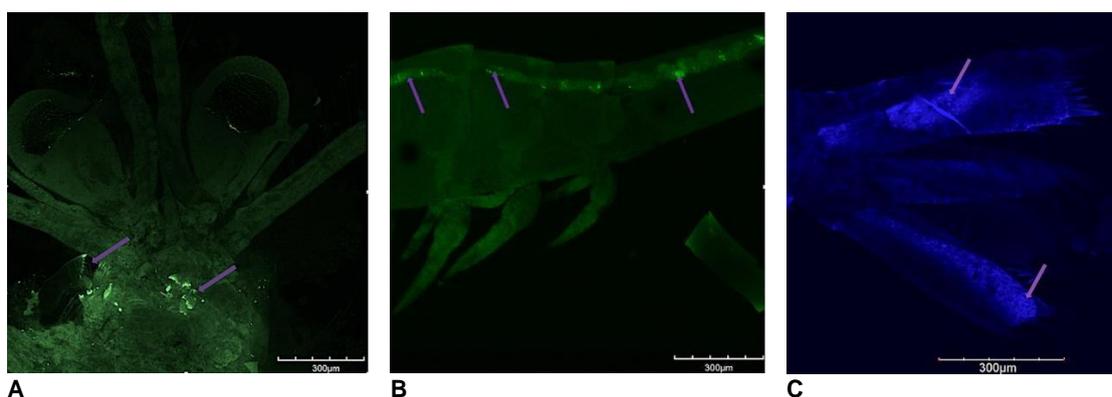


Figura 10. Micrografías confocales que muestran la capacidad de las cepas probióticas de adherirse a la cutícula interna y externa de *Penaeus vannamei* en la etapa PL2. **A)** La cepa Ili se adhiere a la zona oral. **B)** La cepa P62 se adhiere a la membrana peritrófica en el intestino medio. **C)** La señal de P64 se detecta en los urópodos. Observar el fuerte marcado en las inserciones de las setas.

Las características protectoras de los tres probióticos se evaluaron por su interacción con *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND. Larvas en Z3 teñidas con naranja de acridina expuestas a *Vibrio parahaemolyticus* estuvieron completamente colonizadas, por el vibrio (**Figura 11A**). Cuando las larvas fueron colonizadas previamente por el consorcio de probióticos, solo se detectó una señal débil del patógeno en el exterior de la cutícula (**Figura 11B**), y no se detectó ninguna señal de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND en el estómago. Si las larvas fueron colonizadas previamente con cada probiótico individual, la señal de *Vibrio parahaemolyticus* fue menor, y estaba restringida a la cutícula externa y una sección del estómago (**Figura 11C, D, E**).

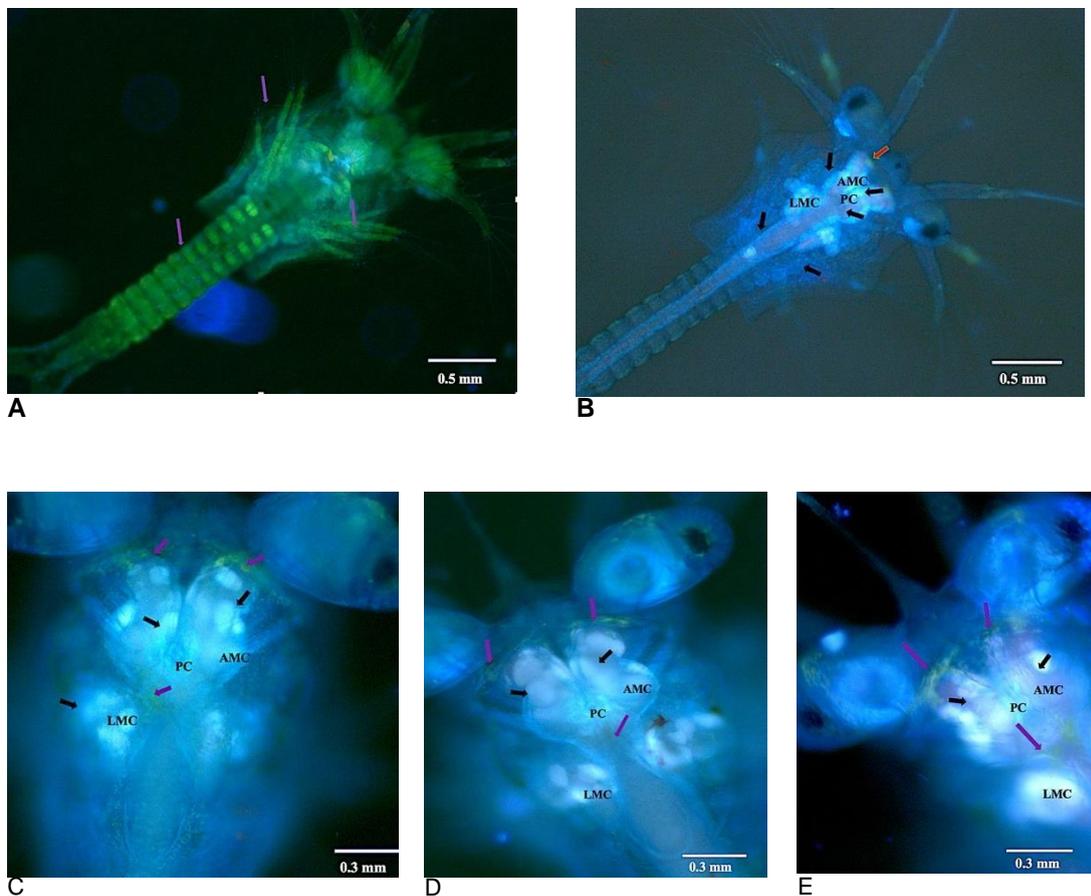


Figura 11. Interacción entre probióticos y *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND. **A)** Larvas (Zoea 3) expuestas a *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND, teñidas con naranja de acridina, están completamente colonizadas. **B)** Larvas colonizadas por el consorcio de probióticos, solo se detecta una señal débil del vibrio patógeno en la cutícula externa, ausencia de señal de *Vibrio parahaemolyticus* en el intestino. AMC: Ciego del intestino medio anterior, LMC: Ciego del intestino medio lateral (futuro hepatopáncreas), PC: Cámara pilórica (intestino anterior). **C, D, E).** Larvas previamente colonizadas con cada probiótico individual, Ili (teñido con DAPI), P62 (teñido con DAPI) y P64 (teñido con azul de Evans) (flechas negras), antes de la exposición a *Vibrio parahaemolyticus* (naranja de acridina). La señal del vibrio patógeno es débil

y está restringida a la cutícula externa y la sección anterior del ciego del intestino medio (flechas de color violeta).

3.2. Selección *in vitro* de fibras vegetales mediante ensayos de activación de la PO y generación de O_2^- en hemocitos de camarones

3.2.1. Selección de las fibras vegetales

Con respecto a las fibras vegetales de código F en concentraciones de 1,0 y 0,5 mg mL⁻¹, los resultados de activación de la PO indicaron una respuesta significativa ($p < 0,05$ superior con las fibras F1 (0,534 y 0,542 mDO) F3 (0,522 y 0,568 mDO) y F4 (0,541 y 0,586 Mdo) en las dos concentraciones utilizadas (**Figura 12**). Como controles positivos se usó β -1,3-glucanos, agarosa y quitosano. En la **Figura 13** se presentan los resultados de activación de la PO con fibras vegetales de código C, obteniéndose valores superiores a los controles con las fibras C_20, C_50 y C101.

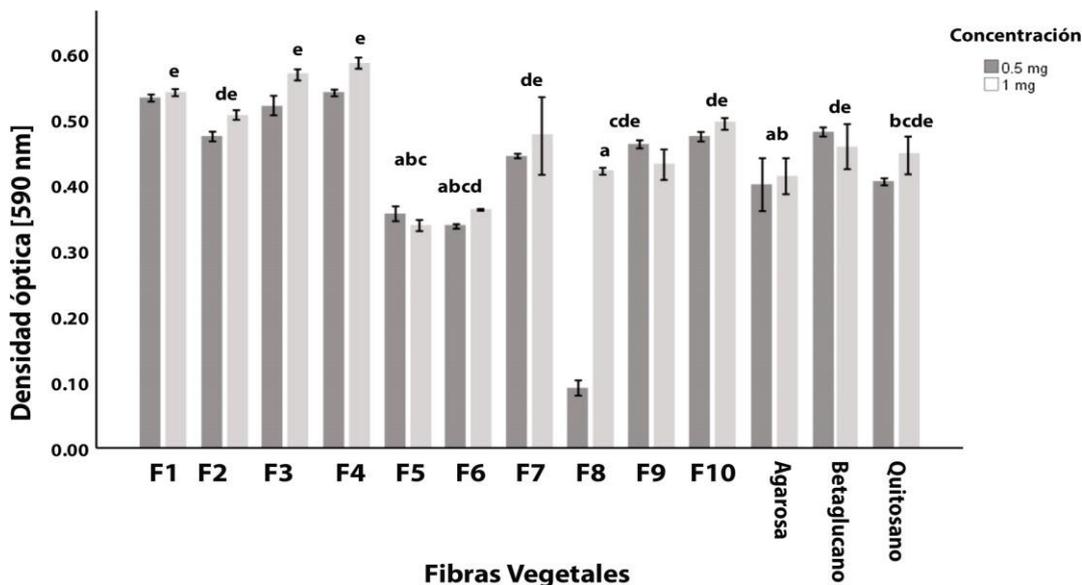


Figura 12. Resultados de selección de las fibras vegetales con código F mediante la prueba inmunológica de activación de la fenol oxidasa (PO). Para cada variable se reporta la media. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

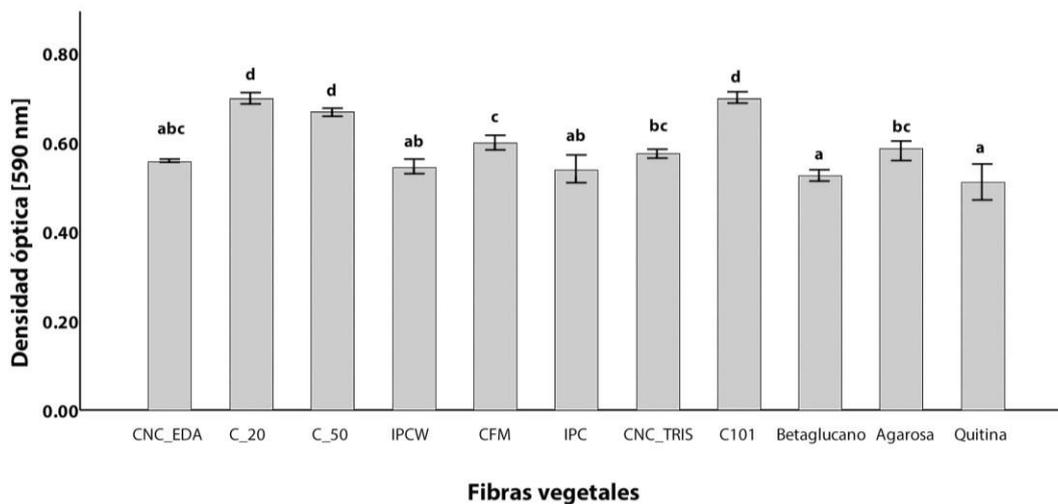


Figura 13. Resultados de selección de las fibras vegetales con código C mediante la prueba inmunológica de activación de la PO. Para cada variable se reporta la media. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En generación de O_2^- con las fibras de código F, destacó con los mayores valores ($p < 0,05$) la fibra F4 a 0,125; 0,5 y 1,0 $mg mL^{-1}$, resultando en una tasa de O_2^- de 2,75 a 1 $mg mL^{-1}$ (**Figura 14**). Comprobando los valores atípicos de las fibras vegetales (Anexo 5). Con las fibras de código C, a 0,1; 0,5 y 1,0 $mg mL^{-1}$, hubo interacción entre el tipo de fibra y la concentración con una mayor respuesta ($p < 0,05$) con la fibra C101 a 1 $mg mL^{-1}$ (**Figura 15**).

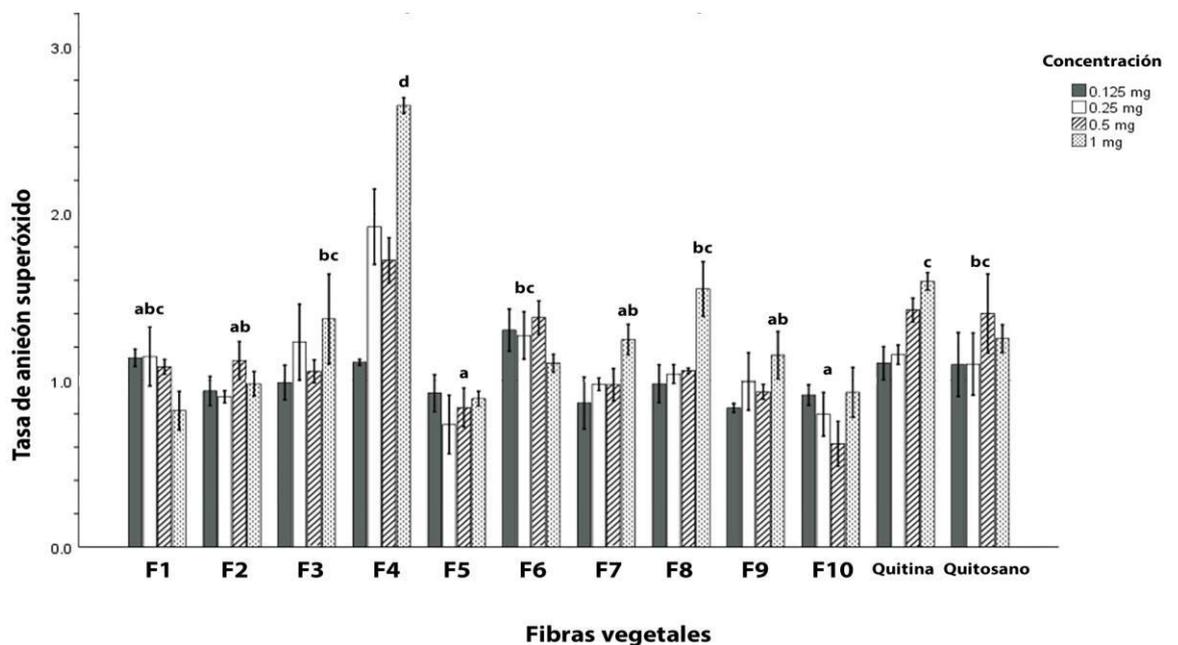


Figura 14. Resultados de generación de O_2^- obtenidos con las fibras vegetales de código F a cuatro concentraciones. Se grafican las medias. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

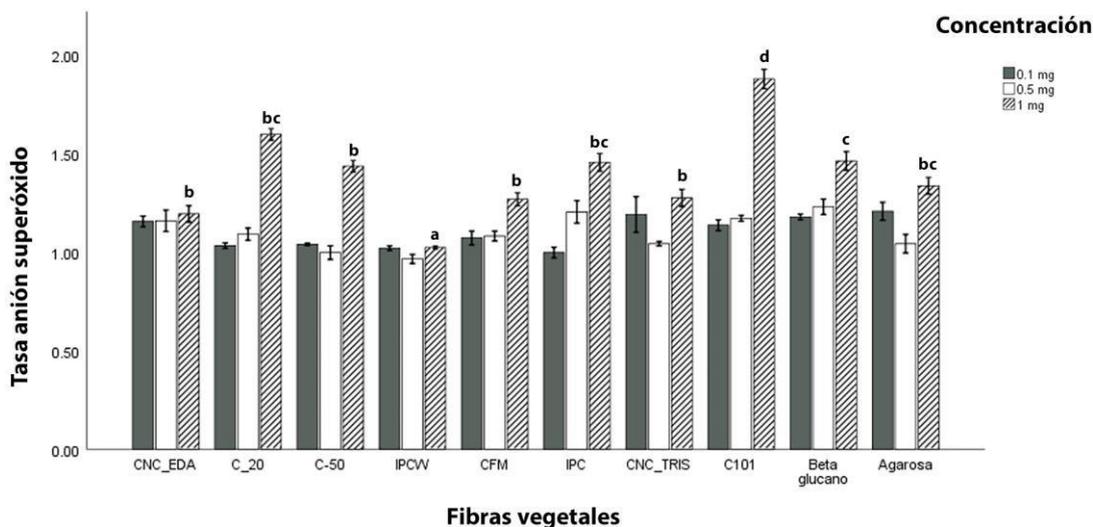


Figura 15. Resultados de la prueba de selección de las fibras vegetales con código C mediante la prueba inmunológica de generación de O_2^- . Para cada variable se reporta la media de cada concentración. En cada columna, los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se realizó nuevamente el análisis inmunológico de las fibras vegetales en conjunto código F y código C (**Tabla 8**). A dosis de 1 mg mL^{-1} , las tasas de O_2^- fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) con las fibras C_20, C_50, C101, F4 y F6 ($1,70 \pm 0,10$; $1,99 \pm 0,44$; $2,69 \pm 0,15$; $2,03 \pm 0,08$) respectivamente. Esto en comparación a la tasa obtenida con el β -1,3-glucano comercial ($1,58 \pm 0,03$) a la misma concentración. La activación de la PO a una concentración de 1 mg mL^{-1} por parte de las fibras de código C osciló en un rango de 509 a 699 mDO siendo la fibra C101 ($698,67 \pm 10,02 \text{ mDo}$) la de mejor respuesta. Por otro lado, en el caso de las fibras del código F, los resultados de activación de la PO oscilaron en un rango de 334 a 586 mDO, siendo la fibra F4 ($586,33 \pm 13,32 \text{ mDO}$) la de mejor respuesta.

Tabla 8. Resultados de pruebas inmunológicas de las fibras vegetales de mejor respuesta

Fibras vegetales	Tasas O_2^-		Actividad PO (mDO)	
	1,0 mg mL^{-1}	0,5 mg mL^{-1}	1,0 mg mL^{-1}	0,5 mg mL^{-1}
Códigos				
C_20	$1,70 \pm 0,10c$	$1,02 \pm 0,05^a$	$695,67 \pm 11,02c$	$551,01 \pm 9,12b$
C_50	$1,55 \pm 0,03b$	$1,03 \pm 0,37a$	$663,33 \pm 7,77c$	$561,11 \pm 7,91b$
C_101	$1,99 \pm 0,44b$	$1,15 \pm 0,37a$	$698,67 \pm 10,02c$	$522,01 \pm 8,02b$
F4	$2,69 \pm 0,15c$	$1,65 \pm 0,12b$	$586,33 \pm 13,32b$	$541,33 \pm 8,33b$
F6	$2,03 \pm 0,08c$	$1,04 \pm 0,02a$	$486,33 \pm 13,34a$	$526,02 \pm 7,15b$
Control	$1,15 \pm 0,19a$	$1,30 \pm 0,34a$	$441,33 \pm 22,39a$	$470,01 \pm 10,08a$

Utilizando las fibras seleccionadas, se repitieron las pruebas inmunológicas. Con respecto a la generación de O_2^- , no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores obtenidos entre las fibras vegetales C20, C50, C101, F6, a concentraciones de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (**Figura 16A**). Los valores obtenidos no superaron a los del control. La fibra vegetal F4 incrementó significativamente ($p < 0,05$) la generación de O_2^- a la concentración de 1 mg mL^{-1} con un valor de OD de 0.425 y con una tasa de 3.13 (**Figura 16B**), superior a las fibras vegetales restantes y al control positivo (PMA). La activación de la PO se incrementó significativamente ($P < 0.05$) con las fibras vegetales F4, C20, C50 y C101 a 1 mg mL^{-1} , obteniéndose resultados de mejor respuesta con las fibras vegetales C50 y C101, con valores de OD 0.530 y 0.467, respectivamente, en comparación con laminarina (control positivo), con la cual los resultados de OD fueron de 0.362 en promedio (**Figura 16C**).

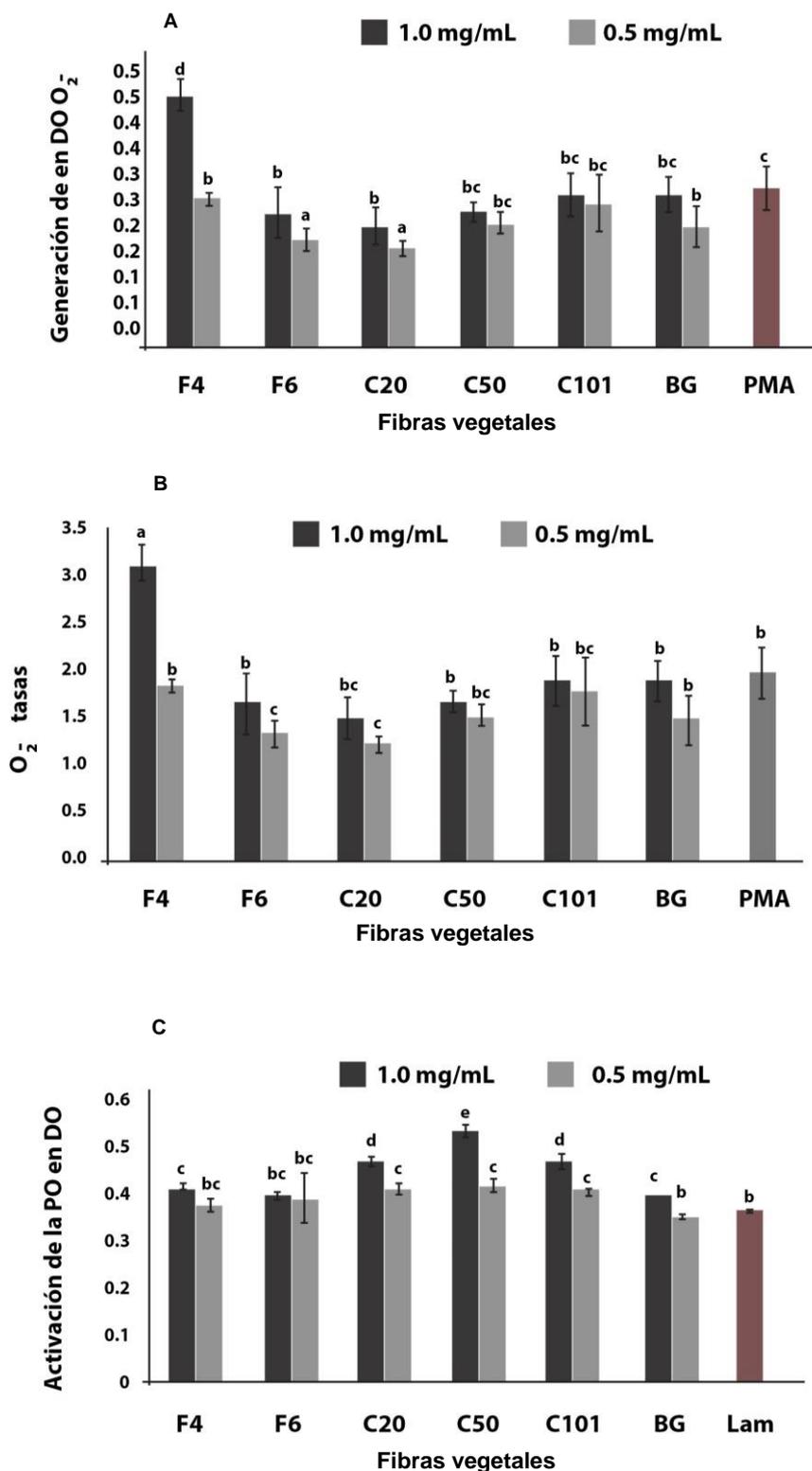


Figura 16. Efecto inmunoestimulante de cinco fibras vegetales. **A)** Generación de O_2^- en hemocitos de camarón. **B)** Tasas de generación de O_2^- . **C)** Cuantificación de la activación de la PO en extracto de hemocitos. Se grafica la media error estándar. Los promedios indicados con letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$), análisis post hoc de Tukey. BG: β -1,3-glucanos, Lam: laminarina

3.2.2. Evaluación *in vitro* de la toxicidad de las fibras vegetales seleccionadas en hemocitos de camarones.

La viabilidad celular evaluada mediante la prueba de reducción del MTT, a concentraciones de estimulación inmune *in vitro* (1,0 y 0,5 mg mL⁻¹) y un control sin células tratadas con las fibras vegetales, indicó que ninguna de las fibras evaluadas para la estimulación inmunitaria es tóxica para los hemocitos de los camarones (**Figura17**).

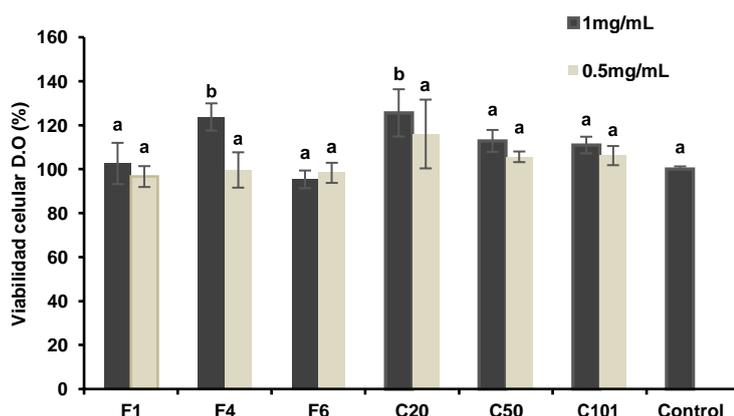


Figura 17. Ensayo de toxicidad de fibras vegetales en hemocitos de camarones juveniles.

El cribado *in vitro* realizado permitió seleccionar las fibras vegetales más inmunogénicas y determinar las dosis eficaces para las pruebas *in vivo*. Las fibras F4 y C101 fueron seleccionadas para evaluar su actividad inmunoestimulante en ensayos *in vivo* y su efecto protector contra *V. parahaemolyticus* causante de AHPND.

3.3. Ensayos *in vivo*, de larvas de camarón cultivadas con el consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4 y C101)

Las larvas de camarón se cosecharon en PL8. Los datos de supervivencia no fueron normales por lo tanto se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Al no cumplir la normalidad obteniendo un resultado con diferencias significativas ($p < 0,05$). Al término de la larvicultura (PL8), la tasa de supervivencia en los tratamientos T1, T2 y T4 no mostraron diferencias significativas en comparación con el control (larvas no tratadas) 84,4% (**Tabla 9**). Por otro lado, la supervivencia de larvas en T3 fue superior ($p < 0,05$) al control y a todos los tratamientos restantes, con un resultado de 90,44%. La supervivencia más baja ($p < 0,05$) se obtuvo en el tratamiento T5 (76,88%). En esta cría larvaria no se observaron brotes de vibriosis. Estas larvas se utilizaron para estudiar

la expresión de genes de AMPs y también fueron sometidas a desafío con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND.

Tabla 9. Supervivencias al final de la larvicultura, de larvas de camarón tratadas con diferentes combinaciones de fibras vegetales y probióticos.

Tratamiento	Supervivencia %
T1	83,77 ± 3,00 a
T2	83,33 ± 2,82 a
T3	90,44 ± 2,82 c
T4	84,44 ± 2,72 a
T5	76,88 ± 4,08 b
Control	84,44 ± 2,28 a

3.3.1. Análisis de expresión de genes de péptidos antimicrobianos AMPs en larvas tratadas con probióticos y fibras vegetales

3.3.1.1 Cuantificación de la expresión relativa de los genes ALF, Pen-3a, y crustina

Evaluando los estadísticos descriptivos básicos de los valores de Cq obtenidos se observó que la mayor variación en los datos se obtuvo en las repeticiones biológicas, lo cual es aceptable debido a la naturaleza de los ensayos. Se verificó el ajuste de los datos a la distribución normal mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov (valor $p = 0.1043$). Se calcularon los valores de expresión relativa, tomando en cuenta al tratamiento control (T6) como calibrador, y a 40S-S24 y GAPDH como genes de referencia (**Figura 18**). Se generaron que permiten inferir que podrían existir diferencias en la variabilidad de algunos de los tratamientos analizados con respecto al gen crustina (**Figura 19**), con respecto al gen ALFs (**Figura 20**) y con respecto al gen Peneidina 3-a (**Figura 21**).

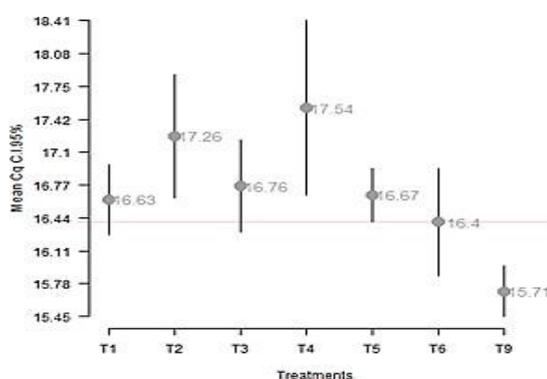


Figura 18. Media de intervalos de confianza de los valores de Cq del gen 40S-S24.

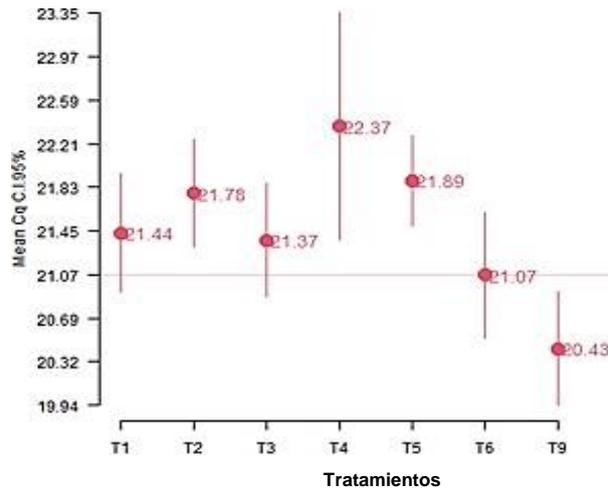


Figura 19. Media de intervalos de confianza de los valores de Cq del gen crustina.

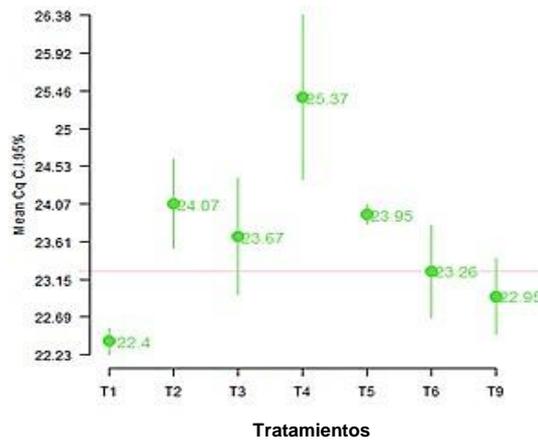


Figura 20. A) Media de intervalos de confianza de los valores de Cq del gen ALFs.

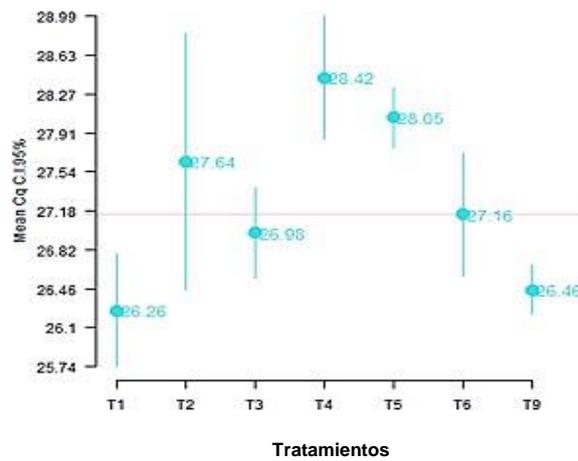


Figura 21. intervalos de confianza de los valores de Cq del gen Peneidina – 3a

Como se puede observar, los datos obtenidos son homogéneos ya que los coeficientes de variación son bajos ($< 7,5$). Sin embargo, el supuesto de homogeneidad entre grupos no se cumplió. Debido a la estructura del cálculo de los valores de expresión relativa (radios), y considerando el hecho de que los valores de C_q se ajustan a la distribución normal, se verificó que los valores de expresión relativa puedan modelarse con una distribución Log-Normal, cuyos parámetros se estimaron por máxima verosimilitud, cada grupo con su promedio (parámetro μ) y desviación estándar (DE) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Modelamiento de los valores de expresión relativa de los genes crustina, ALFs y peneidina-3a ajustados a la expresión normal y estimados por máxima verosimilitud (parámetro) y la desviación estándar (DE)

		MLE de Parámetros Log-Normal					
	Tratamiento	Valor p Ajuste a Log-Normal	μ	s	Esperanza	DE	CV
GEN Crustina	1	0,542	-0,464	0,427	0,689	0,308	61,983
	2	0,888	0,115	0,389	1,210	0,489	32,150
	3	0,670	0,248	0,407	1,392	0,591	29,258
	4	0,489	0,145	0,818	1,615	1,575	50,624
	5	0,556	-0,144	0,326	0,913	0,306	35,670
	9	0,272	0,008	0,411	1,097	0,470	37,439
GEN ALFs	1	0,877	0,339	0,129	1,415	0,184	9,132
	2	0,777	0,074	0,428	1,180	0,529	36,281
	3	0,122	0,189	0,556	1,410	0,850	39,459
	4	0,141	-0,332	0,790	0,980	0,913	80,615
	5	0,896	-0,027	0,092	0,978	0,090	9,388
	9	0,457	-0,225	0,367	0,854	0,324	42,974
GEN Pen-3a	1	0,331	0,404	0,443	1,652	0,769	26,794
	2	0,362	0,261	1,012	2,166	2,892	46,699
	3	0,861	0,576	0,354	1,894	0,692	18,701
	4	0,380	0,149	0,482	1,303	0,666	36,987
	5	0,989	-0,206	0,237	0,837	0,201	28,290
	9	0,750	0,060	0,193	1,082	0,210	17,807

Para analizar posibles diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, se calculó la probabilidad del valor de expresión relativa (radio) sea mayor a 1: $P(\text{radio} > 1)$ e intervalo de 14.7% de verosimilitud para esta probabilidad (**Figura 22**). Esto permite contrastar los tratamientos (en cada gen) con mayor probabilidad de dar valores de expresión relativa mayores a 1. La expresión relativa de los genes crustina y Pen-3a disminuyó en las larvas expuestas a los tratamientos 1 y 5, respectivamente. Por otro lado, en el tratamiento T1 aumentó la expresión de ALFs, y en el tratamiento T3 aumentó la expresión de Pen-3a. Los tratamientos restantes no influyeron en la expresión de los genes de manera significativa.

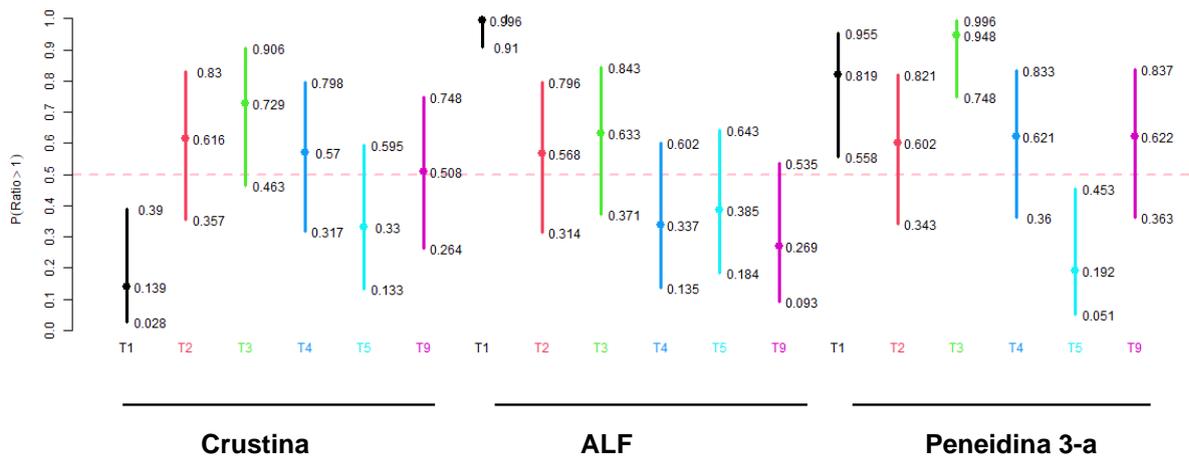


Figura 22. Expresión relativa de los genes antimicrobianos AMPs crustina, ALFs, y Pen-3a con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

3.3.2. Supervivencia de larvas de camarón después del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* causante de necrosis hepatopancreática aguda AHPND

Durante las primeras 10 horas no se observaron diferencias en la mortalidad de las larvas en los tratamientos. Sin embargo, después de 15 horas empezó la mortalidad, terminando el control con una supervivencia del 23.3%. Las larvas de los tratamientos T1, T2 y T3 mostraron altas supervivencias en comparación al control 97,8; 92,2; 89,4. Las larvas del tratamiento T4, que recibieron solo fibra vegetal F4 tuvieron una supervivencia superior al 50%. En el T5, las larvas obtuvieron 30% de supervivencia. El análisis de supervivencia realizado mediante Kaplan Meier indicó diferencias significativas en las curvas de mortalidad ($p < 0,05$) (**Figura 23**).

+ Control, + T1 (probióticos), + T2 (Probióticos + Fibra F4), + T3 (Probióticos + Fibra C101), + T4 (Fibra F4), + T5 (Fibra C101)

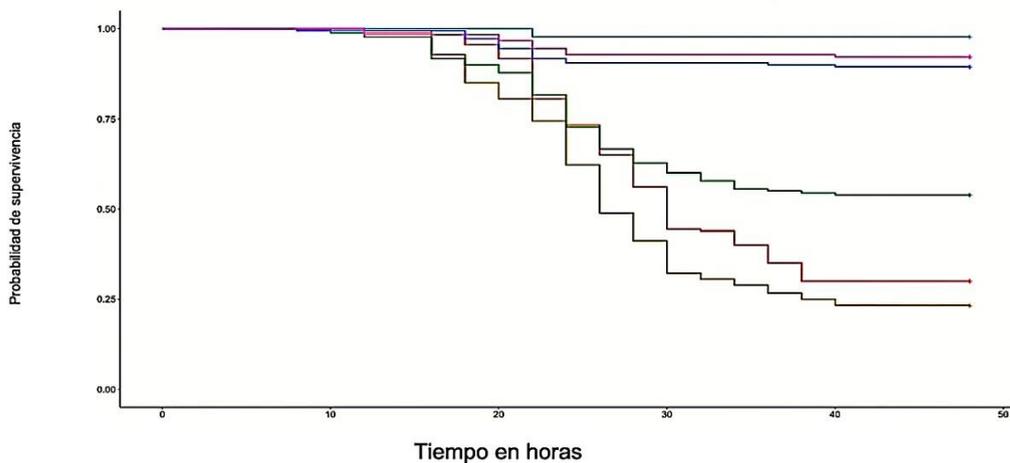


Figura 23. Curva de mortalidad de larvas de camarones tratados con Consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4, C101) desafiadas con *Vibrio parahaemolyticus* (BA94C2).

3.4. Ensayo *in vivo* en camarones juveniles con el consorcio de probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101)

Después de 50 días de la aplicación de los diferentes tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no se observaron diferencias en el peso entre los camarones juveniles tratados con los del control ($p > 0.05$) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Pesos obtenidos (g) de camarones juveniles tratados con probióticos y fibras vegetales.

Tratamiento	Muestra	Promedio (g)	Error Estándar
T1	3	5,87	0,092
T2	3	5,69	0,642
T3	3	5,57	0,377
T4	3	6,35	0,381
T5	3	5,66	0,013
CONTROL	3	6,13	0,105

3.4.1. Respuesta inmunoestimulante y protectora contra *Vibrio parahaemolyticus* en camarones juveniles tratados con consorcio de probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4 y C101)

El recuento total de hemocitos (THC) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control (**Figura 24**). Los recuentos diferenciales de hemocitos indicaron que los camarones tratados exhibieron hemocitos semi granulosos (SGC) significativamente más abundantes ($p < 0,05$) con respecto al control, principalmente en los camarones tratados con la fibra vegetal F4 (T4) y la combinación del consorcio de probióticos con la fibra F4 (T2). En el recuento de hemocitos granulosos HG los camarones juveniles del tratamiento T4 fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los del control y los otros tratamientos, y los juveniles del T1 con un recuento de hemocitos granulosos inferiores a los del control, seguidos de los tratamientos T2 y T3. Los hemocitos granulosos HG tuvieron recuentos inferiores ($p < 0,05$) en los juveniles del tratamiento T1y T3 con respecto al control (**Figura 25**).

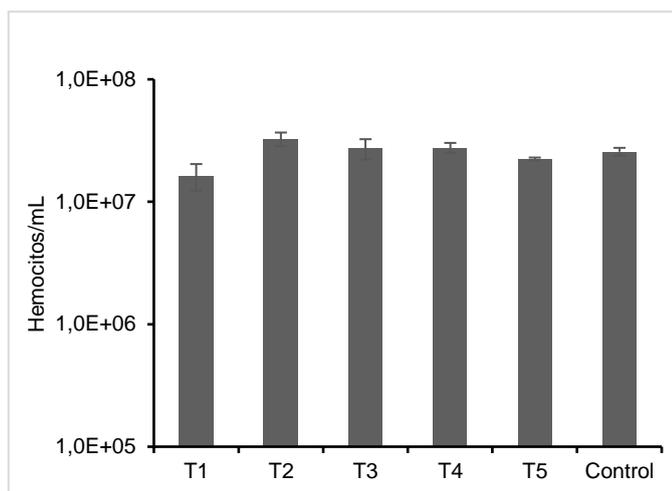


Figura 24. Conteos totales de hemocitos (HCT) en los camarones *Penaeus vannamei* sometidos a distintos tratamientos con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 y las fibras vegetales. Se reporta la media \pm error estándar.

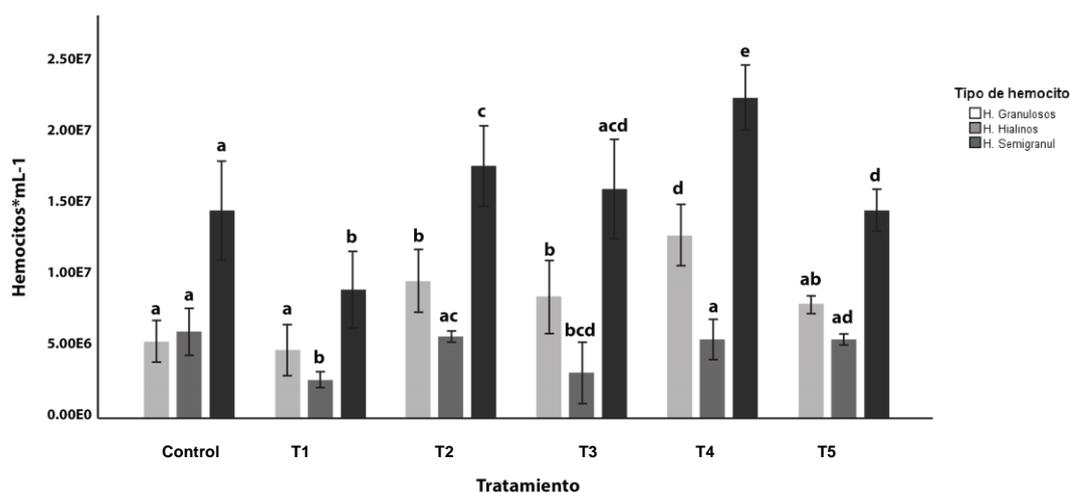


Figura 25. Conteos diferenciales de hemocitos en los juveniles de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5. Se reporta la media \pm error estándar.

La generación de O_2^- se incrementó significativamente en los camarones de todos los tratamientos ($P > 0.05$) (Anexo 6). Las tasas obtenidas para la generación de O_2^- fueron $1,7 \pm 0,07$ (T1); $2,04 \pm 0,075$ (T2); $2,19 \pm 0,19$ (T3); $2,37 \pm 0,17$ (T4) y $2,13 \pm 0,13$ (T5), mientras que con el control se obtuvo una tasa de $1,27 \pm 0,032$, situándose los valores más altos en los tratamientos T4, T3 y T5 (**Figura 26**).

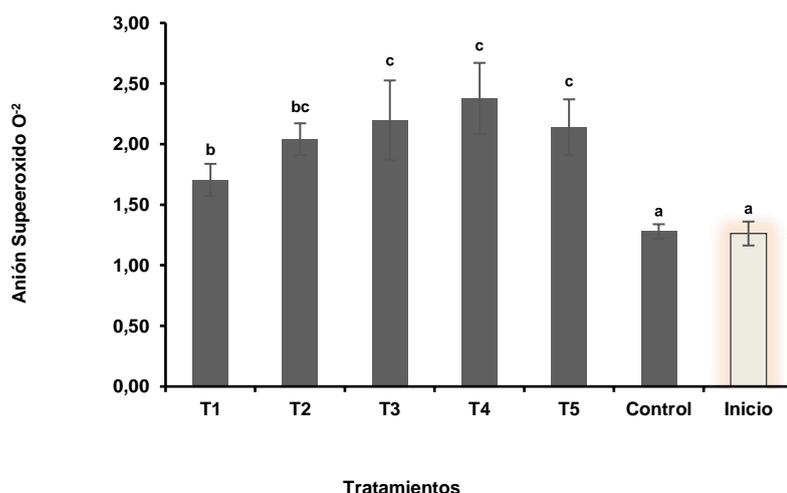


Figura 26. Generación de anión superóxido O₂⁻ en los hemocitos de los camarones tratados con consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101). Se reporta la media ± de error estándar. Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes.

En la activación de la PO, no se observaron cambios significativos con respecto al control en los hemocitos de los camarones tratados ($p > 0,05$) (**Figura 27**) (Anexo7). Las concentraciones de proteína plasmática en los camarones de los tratamientos T3 y T4 fueron significativamente superiores al control ($p < 0,05$) (**Figura 28**).

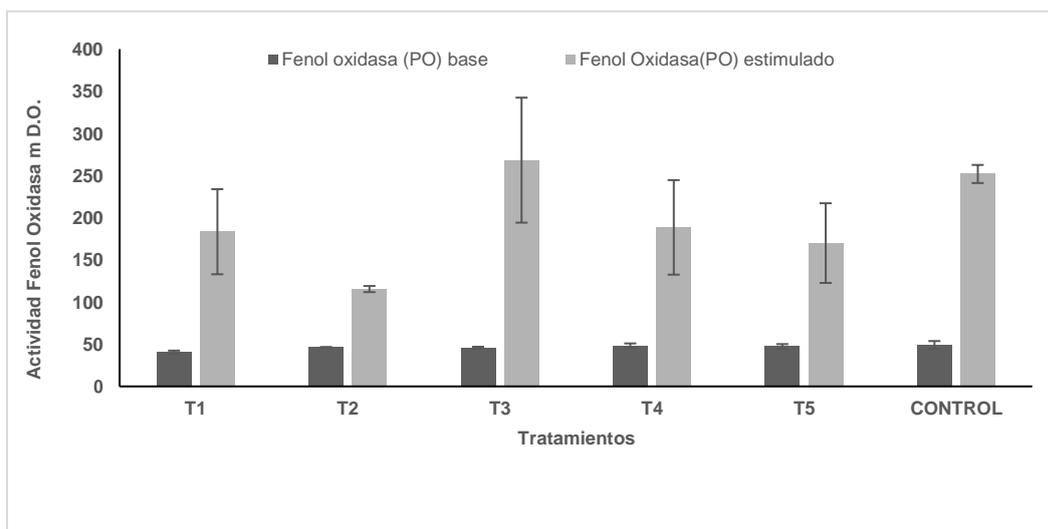


Figura 27. Activación de Fenol oxidasa PO en los hemocitos de los camarones tratados con consorcio probióticos (Ili, P62, P64) y fibras vegetales (F4 y C101) reporta la media ± de error estándar.

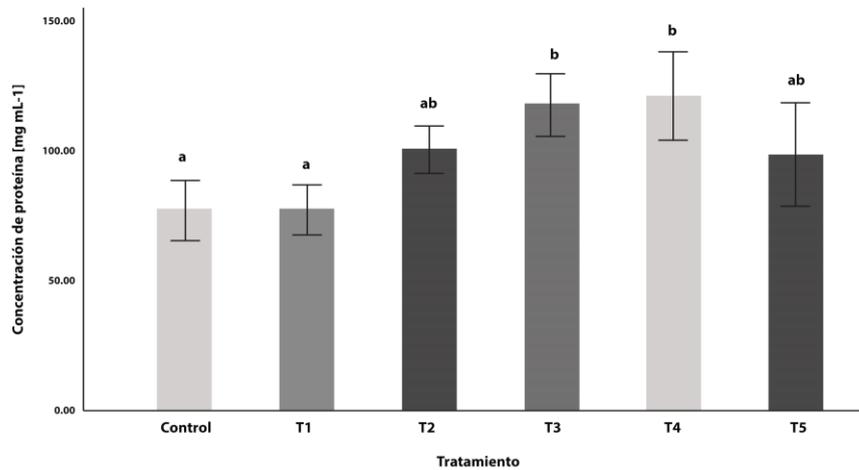


Figura 28. Contenido de proteínas plasmáticas en los camarones juveniles tratados con el consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibras inmunoestimulantes (F4 y C101). Se reporta la media \pm error estándar. Los promedios indicados con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

3.4.2. Respuesta *in vivo* de la supervivencia de camarones juveniles cultivados con el consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibras vegetales seleccionadas (F4, C101) después de la prueba del desafío con *Vibrio parahaemolyticus*

En la prueba de desafío efectuada con *Vibrio parahaemolyticus* los camarones juveniles *Penaeus vannamei* del tratamiento T2, descrito por el consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibra vegetal F4, obtuvieron la supervivencia más alta (91.1%), a las 13 horas, seguida por los juveniles del tratamiento T1, consorcio probiótico (Ili, P62, P64), con una supervivencia del 88,9%, determinada a las 31 horas. Los camarones juveniles del tratamiento T5 tuvieron una supervivencia de 82,2% a las 19 horas. El tratamiento T4 obtuvo una supervivencia del 73,3% a las 31 horas, y finalmente el tratamiento T3, consorcio probiótico (Ili, P62, P64) y fibra vegetal C101, tuvo una supervivencia de 71,4% a las 33 horas después de la prueba de desafío (**Figura 29**).

+ Control, + T1 (probióticos), + T2 (Probióticos + Fibra F4), + T3 (Probióticos + Fibra C101), + T4 (Fibra F4), + T5 (Fibra C101)

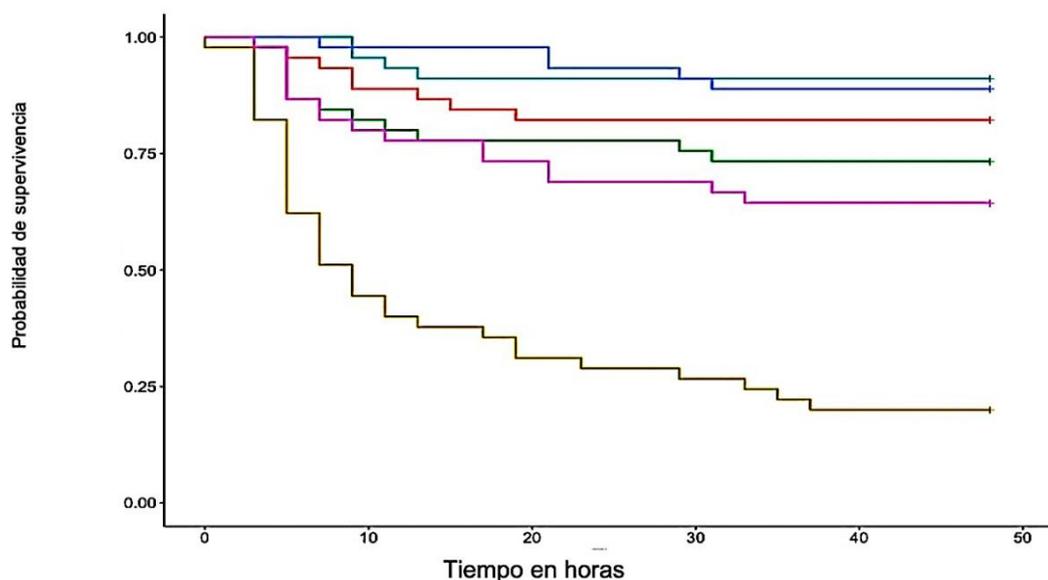


Figura 29. Curvas de supervivencia de camarones juveniles desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* BA94C2: T1 (Consortio probióticos Ili, P62 y P4), T2 (Consortio probióticos y fibra vegetal F4), T3 (Consortio probióticos y fibra vegetal C101), T4 (F4), T5 (C101) y Control.

3.5. Resultados de hibridación *in situ* (HIS)

Se aplicó la técnica de HIS a los camarones juveniles de los diferentes tratamientos, con el fin de observar la expresión del AMP peneidina en los diferentes tejidos por histopatología. En términos generales, se observaron hemocitos infiltrados positivos para peneidinas en el tejido conectivo de distintos órganos, en particular de los apéndices bucales, estómago y tejido conectivo bajo el epitelio del cefalotórax. Además, se observaron hemocitos positivos en LO, en el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón y hepatopáncreas, entre los túbulos del hepatopáncreas, vasos hemales y branquias.

Otros tejidos que presentaron señal positiva para peneidinas fueron músculo mandibular, ganglio supraesofágico, conectivo cincunesofagal y glándulas tegumentales de la zona oral (en particular labrum y paragnatha) y en una ocasión en epitelio del hepatopáncreas. Se observaron diferencias en el tipo de tejido y fuerza de la señal entre los distintos tratamientos. Los camarones no tratados del control presentaron pocos hemocitos infiltrados en los tejidos y escasa señal de peneidinas. Existió una señal más intensa en los hemocitos que rodeaban los esferoides. También se observó la señal

positiva en los límites del seno branquio-pericárdico a nivel del corazón, en hemocitos presentes en él LO, y en hemocitos en el tejido conectivo del estómago.

Tejidos de animales del control (**Figura 30**) presentaron señal para peneidinas en glándulas tegumentales de labrum, paragnatha músculo mandibular y el conectivo circunesofagal. En estos animales no se detectó señal en ganglio supraesofágico y ganglio subesofágico. En los sobrevivientes del control, se observó poca infiltración de hemocitos positivos para peneidinas en el tejido conectivo del epitelio de la cabeza. Se observaron muchos hemocitos positivos en LO, con presencia de esferoides, y en los hemocitos que mostraron distensiones bajo el epitelio de la cabeza en los sobrevivientes. En los camarones moribundos, se observaron hemocitos positivos para peneidinas en tejido conectivo de cabeza, en ganglio supraesofágico y ganglio subesofágico, glándula antenal y el conectivo circunesofágico. La expresión de las peneidinas con fuerte señal se observó en el epitelio del seno branquio-pericárdico a nivel del corazón, incluso se observó señal positiva en los bordes de algunos túbulos del LO, con ausencia de expresión de peneidinas en glándulas tegumentales de la boca.

En los camarones del (T1) (**Figura 31**) expuestos únicamente a probióticos se observaron hemocitos con fuerte señal para peneidinas bajo el epitelio del cephalotorax, además de una fuerte infiltración de hemocitos positivos en el tejido conectivo del estómago, LO, y en apéndices bucales, también la expresión de peneidinas se observó en hemocitos bajo el epitelio de la cabeza y en el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón. En la mandíbula, los hemocitos formaron redes (posibles trampas extracelulares). Se detectaron muchos esferoides positivos en LO, mandíbula y tejido conectivo de la cabeza y señal positiva en vaso hemal. El tejido nervioso también dio señal positiva para peneidinas, nervio antenal, conectivo circunesofagal y neuronas de los ganglios nerviosos. Se observó señal positiva en los bordes del hepatopáncreas. Al menos cuatro muestras observadas tuvieron hemocitos distendidos y hemocitos formando redes. La ceca anterior presentó hemocitos infiltrantes positivos, con posibles trampas extracelulares. En este tratamiento la mortalidad fue muy baja y solo se obtuvieron tres muestras para histología entre los moribundos. En ellas se detectó señal de peneidinas en glándulas tegumentales y tejido conectivo con infiltraciones de hemocitos. El circunesofagal esofágico fue negativo con ausencia de infiltraciones de hemocitos.

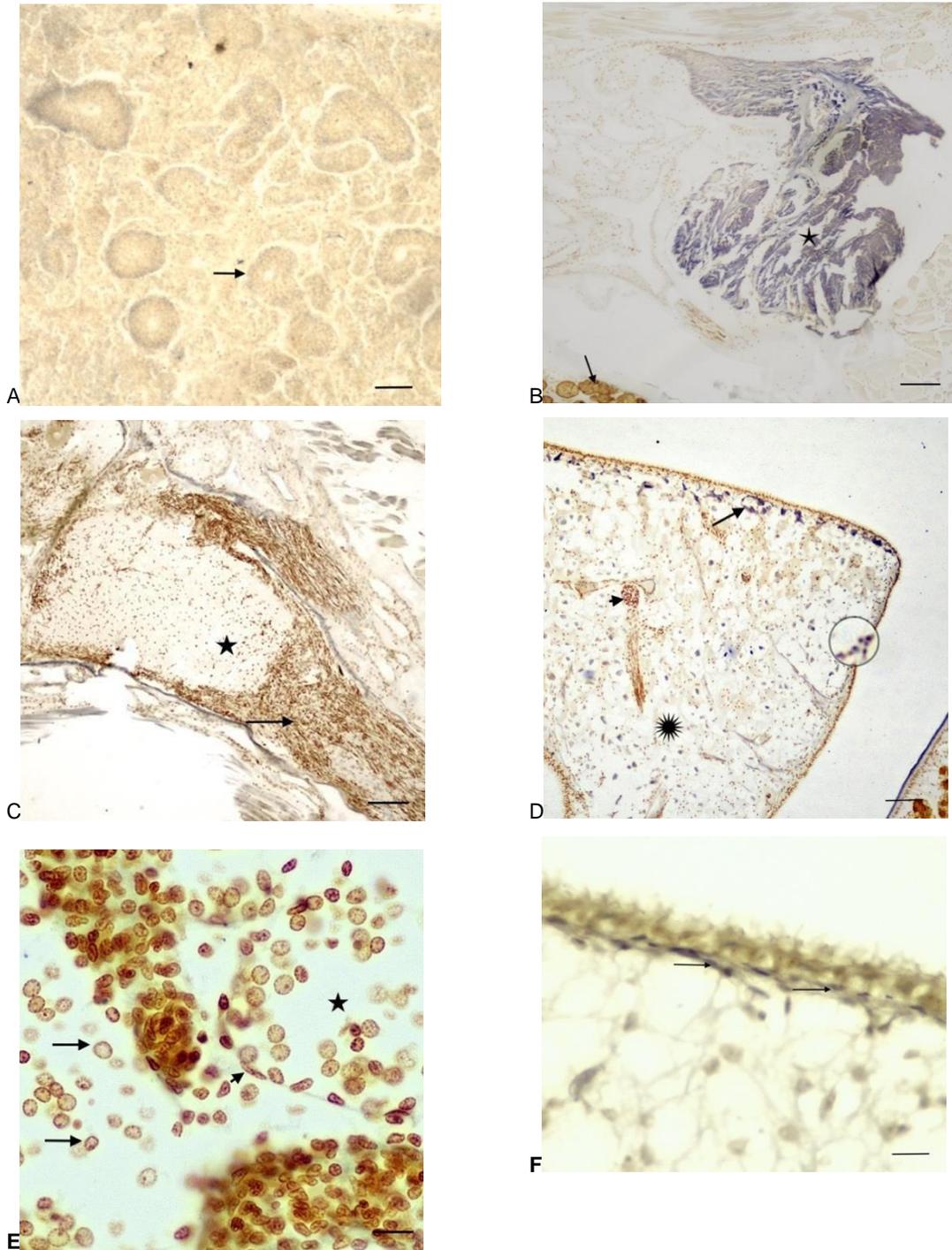


Figura 30. Control: Camarones de control no tratados, moribundo (A, B, C D) y sobrevivientes (E, F) luego del desafío con *Vibrio parahaemolyticus*. **A:** LO, señal positiva para peneidinas en los bordes de los túbulos (flecha), barra: 45 μ m. **B:** Músculo mandibular positivo para peneidinas (asterisco), nótese glándulas tegumentales negativas (flecha), barra: 50 μ m. **C:** Gánglio supraesofágico (estrella), conectivo circunesofágico negativos para peneidinas, barra 50 μ m. **D:** Mandíbula, note hemocitos positivos bajo el epitelio cuticular (flecha, lupa) y el tejido conectivo (asterisco) y la escasa presencia de hemocitos infiltrantes, barra: 50 μ m. **E:** LO, nótese ligera señal positiva para peneidinas en los núcleos de los esferoides (flechas, asterisco) y de las células que rodean los esferoides, barra: 13 μ m. **F:** Estómago con hemocitos infiltrantes positivos para peneidinas bajo el epitelio (flechas), barra: 10 μ m.

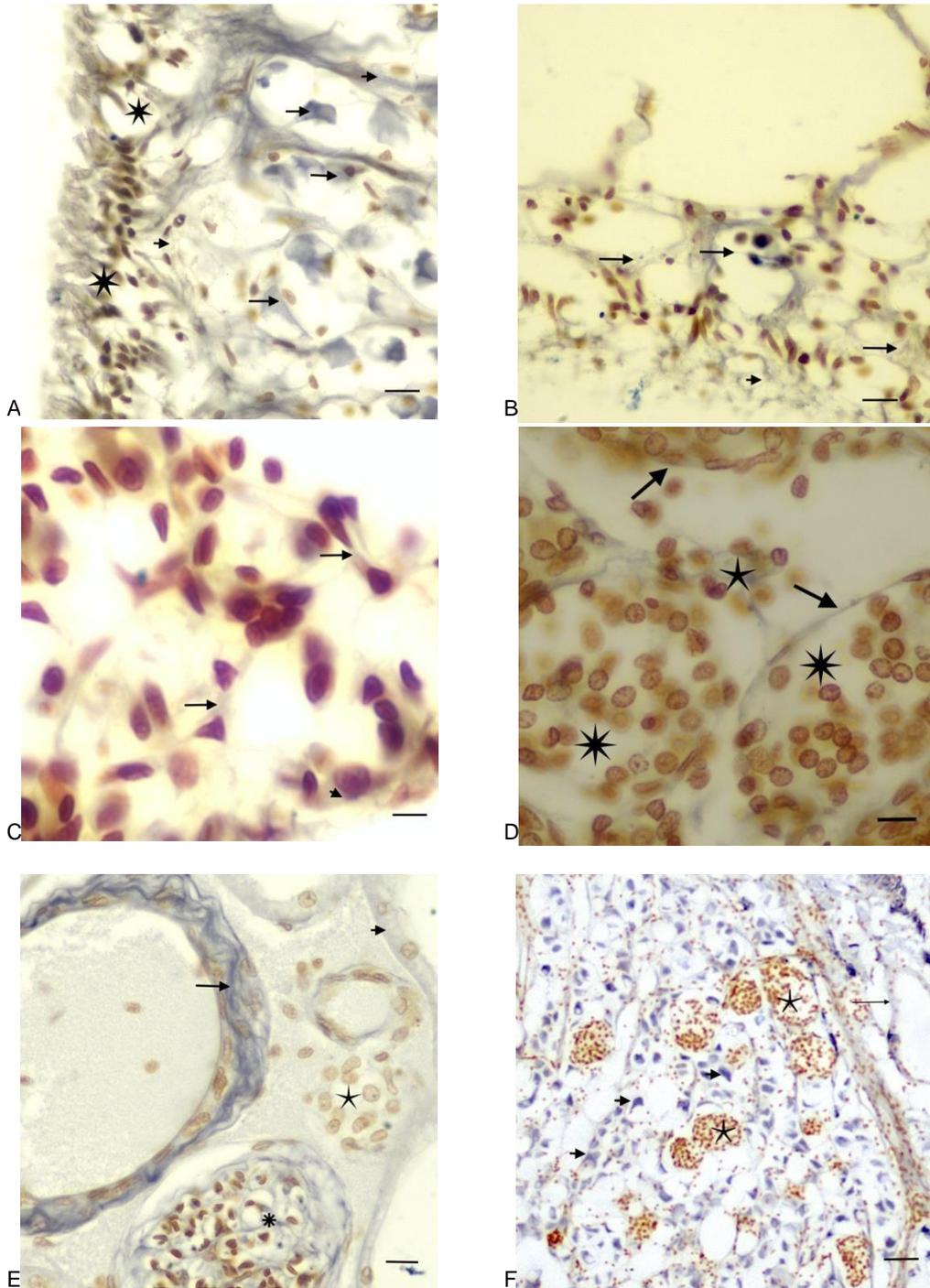


Figura 31. T1. Camarones tratados con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 probióticos antes del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* (A, B, C, D, E) y superviviente luego del desafío (F). **A:** Cabeza, Note abundantes hemocitos extendidos (flechas), epitelio de la cabeza (asteriscos), barra: 15 μ m. **B:** Mandíbula: Hemocitos formando extensas redes, note el citoplasma positivo y los globulitos (flechas), barra: 15 μ m. **C:** Maxila, note la presencia de abundantes hemocitos infiltrantes formando extensiones y redes. barra: 9 μ m **D:** Órgano linfoide, esferoides (asteriscos), hemocitos infiltrantes formando redes positivas (estrella), barra 13 μ m. **E:** Cabeza, tejido endotelial positivo en el vaso hemal (flecha), nervio antenal positivo para peneidinas (asterisco), presencia de un esferoide ectópico (estrella). Note una ligera señal en las células del laberinto de la glándula antenal, barra: 11 μ m. **F:** Tejido conectivo de la cabeza, Note la abundante presencia de esferoides y de hemocitos infiltrantes extendidos con señal positiva para peneidinas, barra: 45 μ m.

Solo se analizó una muestra de camarón tratado del tratamiento (T2) (**Figura 32**), en el que se observaron muchos hemocitos infiltrantes positivos, algunos de los cuales exhibieron distensiones en los apéndices bucales y formación de redes. Se detectó la existencia de infiltraciones hemocíticas en las gónadas. En los camarones sobrevivientes, se observaron hemocitos infiltrados en el tejido conectivo del estómago. Otros tejidos con señal positiva para peneidinas fueron músculo mandibular, nervio antenal y ligeramente el conectivo circunesofágico. Los camarones moribundos de este tratamiento (muy pocos) mostraron tejido del hepatopáncreas muy destruido, con escasa infiltración de hemocitos. Sin embargo, la expresión de peneidina fue observada en hemocitos infiltrados en branquias y en epitelio de la mandíbula, nódulos y esferoides positivos. Al menos en un caso, se detectó una combinación de hemocitos distendidos y hemocitos formando posibles trampas. También se observó señal positiva en glándulas tegumentales del labrum y músculo mandibular. En el tejido conectivo circunesofágico la expresión de peneidina fue negativa.

En el tratamiento T3 (**Figura 33**) se observaron hemocitos positivos en el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón, muchos hemocitos infiltrados positivos en el tejido conectivo de la cabeza, músculo mandibular, ganglio supraesofágico y el conectivo circunesofágico. Hubo señal positiva para hemocitos delimitando el estómago y hemocitos infiltrados en el tejido conectivo del estómago. Muchos esferoides presentaron bordes positivos para peneidinas en LO. Se observaron esferoides negativos en la zona oral. También se detectaron redes (posibles trampas extracelulares) en el tejido conectivo de la mandíbula y la cabeza, al menos en tres casos se observaron hemocitos distendidos. En los camarones sobrevivientes se detectaron muchos hemocitos positivos, delimitando el epitelio de la cabeza, así como abundancia de hemocitos rodeando el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón. El músculo mandibular también fue positivo. Se observaron hemocitos infiltrados en el hepatopáncreas, también se observaron hemocitos positivos para peneidinas infiltrados en la glándula antenal y hemocitos infiltrados en el tejido conectivo de la cabeza formando redes. Se observaron abundantes hemocitos positivos en OL y en esferoides. Se detectó la presencia en dos casos de hemocitos distendidos bajo el epitelio de la cabeza.

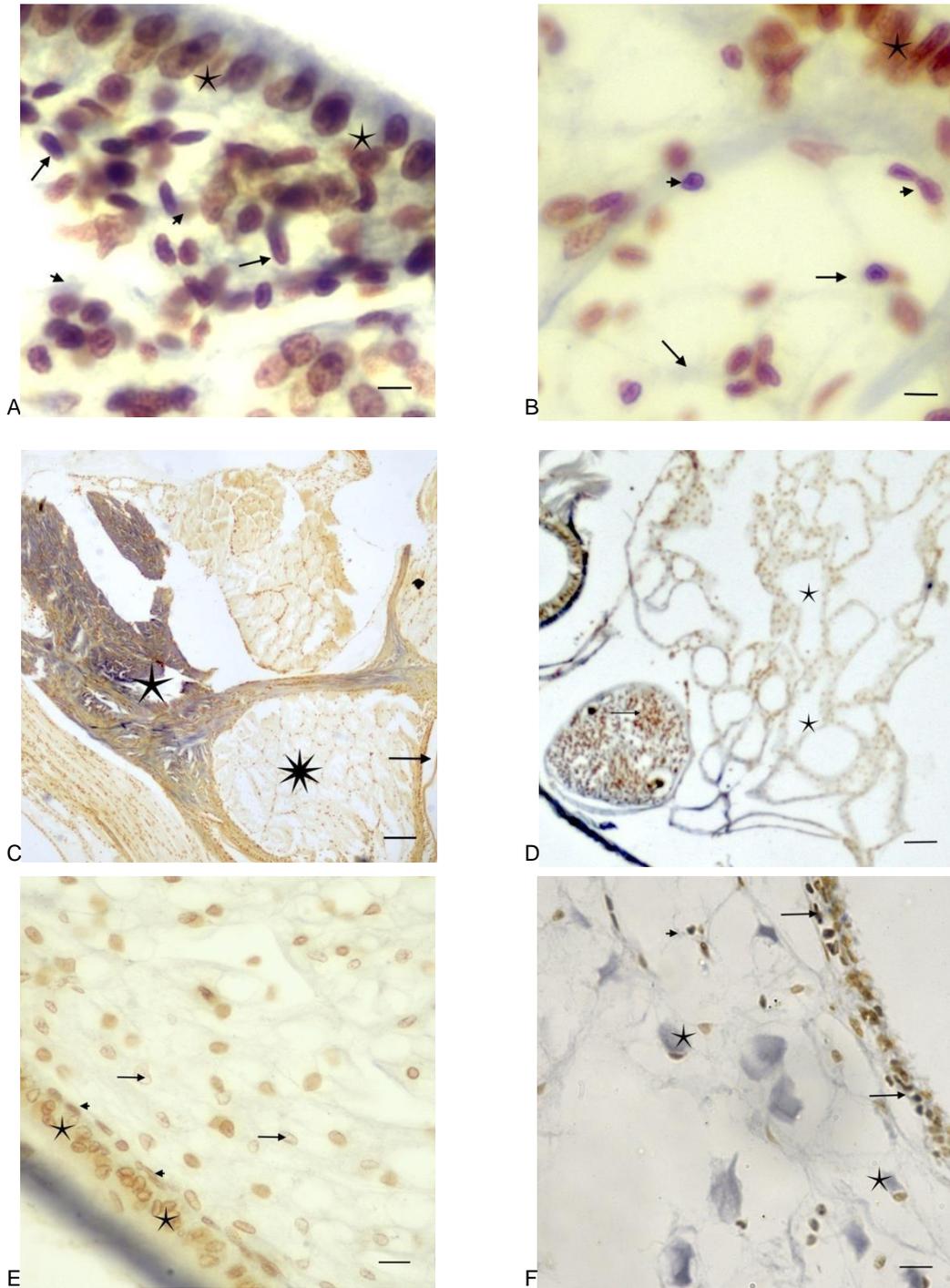


Figura 32. T2: Camarones tratados con el consorcio de probióticos Ili, P 62, P64 y la fibra F4, antes del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* (A, B), sobrevivientes luego del desafío (C, D, E), moribundo (F). **A y B:** Maxílula y mandíbula, note los hemocitos infiltrantes en tejido conectivo (flecha), algunos extendidos formando redes (cabeza de flecha), epitelio cuticular (estrella), barra 9 μm . **C:** Músculo mandibular positivo para peneidinas (estrella), músculo mandibular negativo (asterisco), barra: 50 μm . **D:** Cabeza, nótese la señal positiva en el nervio antenal (flecha), glándula antenal (estrella), barra: 50 μm . **E:** Mandíbula, nótese los hemocitos positivos (cabeza de flecha) extendiéndose bajo el epitelio cuticular (estrellas), barra: 11 μm . **F:** Mandíbula Hemocitos extendiéndose bajo el epitelio cuticular (flecha) y hemocitos extendidos en el tejido conectivo (estrellas), barra: 15 μm .

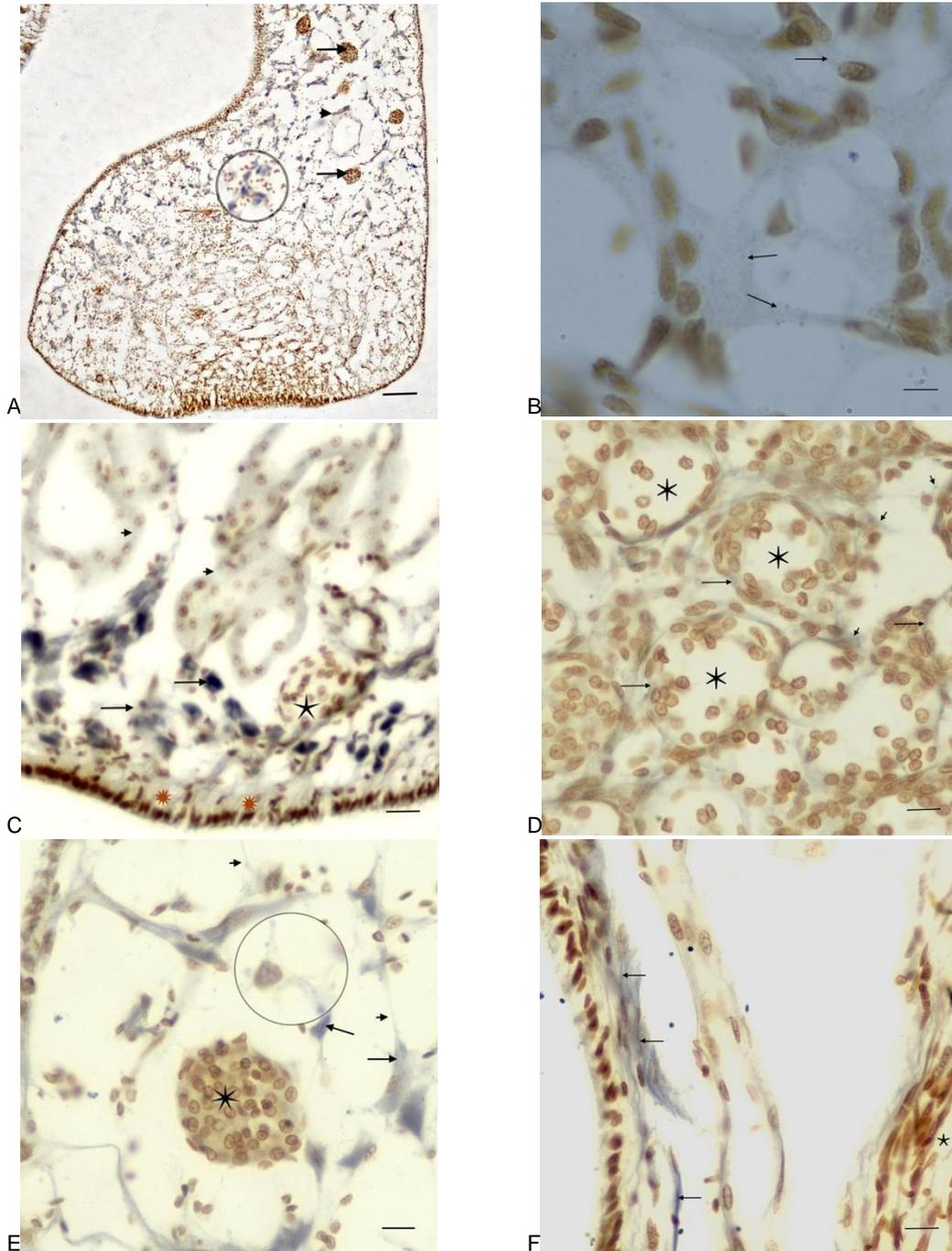


Figura 33. T3: Camarones tratados con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 y la fibra C101, antes del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* (A, B, C, D, E) y luego del desafío (F).

A: Mandíbula, Nótese la gran cantidad de hemocitos extendidos (cabeza de flecha y lupa), así como la presencia de abundantes esferoides, Barra: 15 μ m. **B:** Hemocitos formando redes (flechas) en la mandíbula, barra: 6.5 μ m. **C:** Cabeza de camarón, note los hemocitos extendidos bajo el epitelio (flechas) y presencia de esferoides (estrella). Cabezas de flechas señalan túbulos de la glándula antenal. LO, esferoides (estrellas), hemocitos infiltrantes formando redes positivas (cabezas de flecha). Hay señal positiva alrededor de los esferoides (flechas), barra: 15 μ m. **D:** Esferoide ectópico en mandíbula (asterisco), hemocitos infiltrantes extendidos (flechas) o formando redes (cabezas de flecha), barra 13 μ m. **E:** Esferoides (estrella) y hemocitos distendidos en mandíbula, barra: 13 μ m. **F:** Cabeza, note los hemocitos extendiéndose bajo el epitelio (flechas), tejido nervioso (estrella), barra 13 μ m.

En el tratamiento T4 (**Figura 34**) se detectaron abundantes hemocitos positivos en el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón, entre los túbulos del hepatopáncreas y en la mandíbula. Se observaron hemocitos infiltrados en el tejido conectivo del osículo (estómago). En los camarones sobrevivientes, se observaron abundantes hemocitos infiltrados en la mandíbula, así como hemocitos distendidos. Se detectó señal positiva en epitelio del hepatopáncreas y músculo mandibular. Los camarones moribundos presentaron hemocitos positivos en branquias y señal para peneidinas en el músculo mandibular. También se observó el epitelio del hepatopáncreas destruido con escasos hemocitos positivos.

En los camarones del tratamiento T5 (**Figura 35**) se observaron abundantes hemocitos positivos, delimitando el seno branquio-pericárdico a nivel del corazón, también hemocitos distendidos bajo el epitelio de la cabeza. Muchos hemocitos infiltrados en el LO, con ligera señal positiva para peneidinas, en el estómago y entre los túbulos del hepatopáncreas. En los sobrevivientes se detectó señal positiva en el músculo mandibular, en el tejido conectivo de la cabeza y redes de hemocitos en las tres muestras analizadas, principalmente en apéndices bucales.

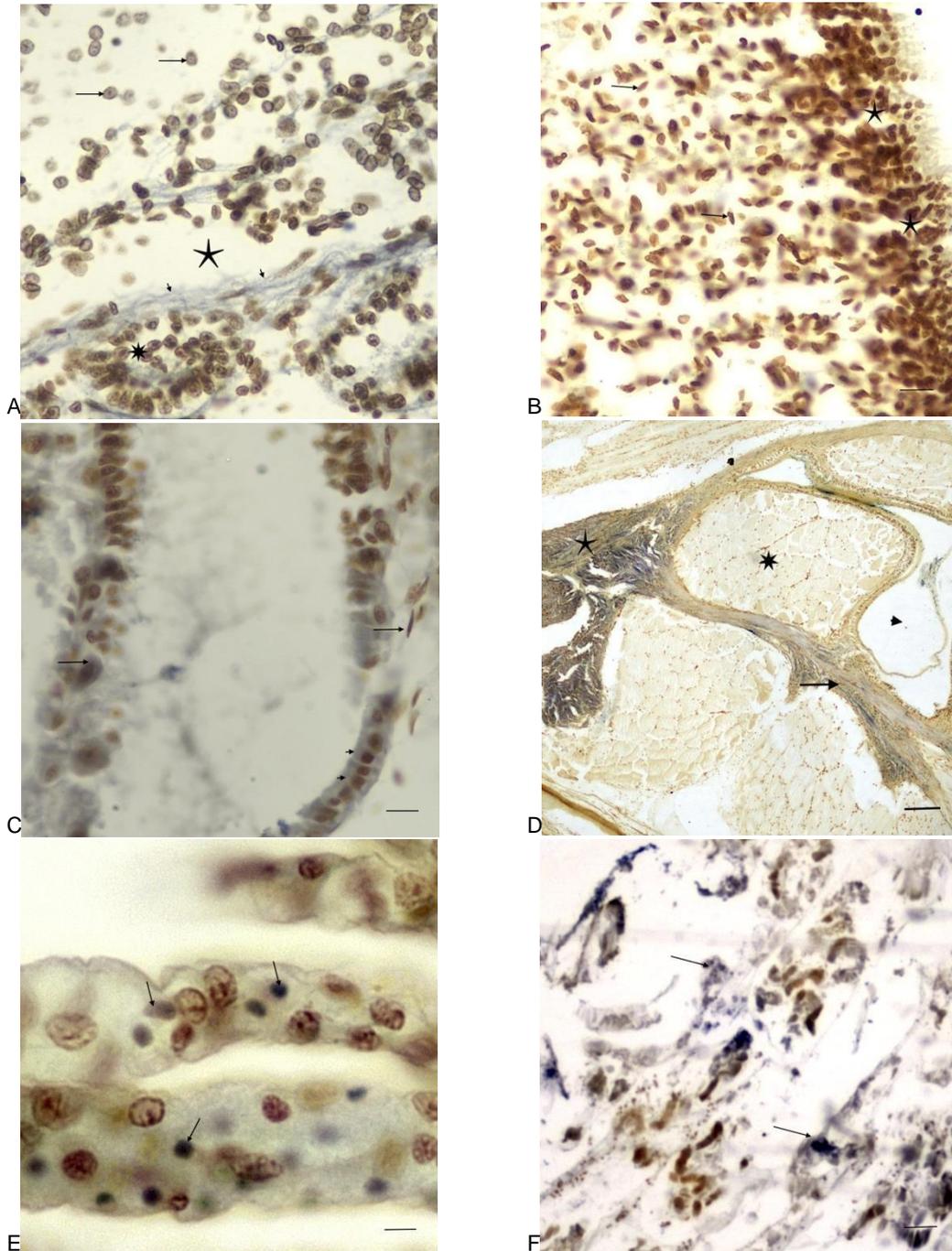


Figura 34. T4: Camarones tratados con la fibra vegetal F4, antes del desafío (A, B, C), sobreviviente luego del desafío (D) y moribundo (E). **A:** Seno bronquio pericárdico a nivel de hepatopáncreas (estrella), note la gran cantidad de hemocitos circulantes positivos (flechas) y la señal positiva para peneidinas en las paredes del seno (cabeza de flecha), barra: 15 μ m. **B:** Mandíbula en la que se observa infiltración de muchos hemocitos, algunos están extendidos, pero no están formando redes, epitelio (estrellas), barra: 15 μ m. **C:** Hepatopáncreas, hay señal positiva en algunas células del tejido epitelial de los túbulos (cabezas de flecha): Algunos hemocitos infiltrantes también están positivos, barra: 11 μ m. **D:** Músculo mandibular, mostrando fuerte señal para peneidinas (estrella, flecha). Otras secciones musculares están negativas (asterisco), barra: 50 μ m. **E:** Branquias con hemocitos positivos (flechas), barra: 6.5 μ m. **F:** Hepatopáncreas destruido de camarón moribundo. Nótese los agregados celulares positivos para peneidinas, barra: 15 μ m.

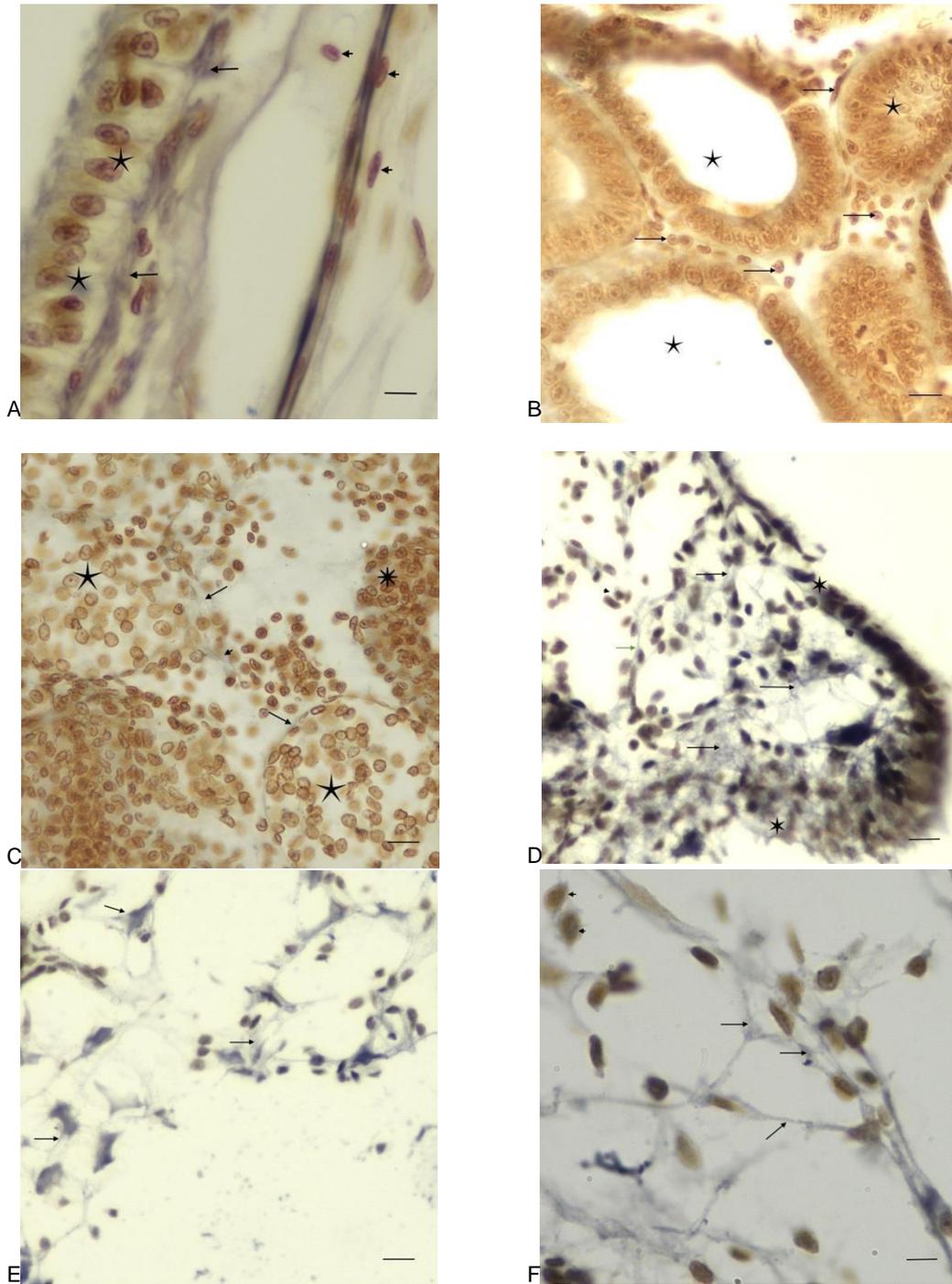


Figura 35. T5 Camarones tratados con la fibra vegetal C101, antes del desafío (A, B, C) y sobrevivientes luego del desafío (D, E, F). **A:** se observa hemocitos infiltrantes extendidos (flechas) bajo el epitelio de la cabeza (restrellas). También hay señal en las paredes del seno bronquio pericárdico, barra: 7 μ m. **B:** Hepatopáncreas mostrando muchos hemocitos infiltrados (flechas) entre los túbulos (estrellas) con señal positiva para peneidinas, barra: 15 μ m. **C:** LO mostrando muchos esferoides (estrellas), débil señal en redes de hemocitos (Cabezas de flecha) y en los bordes de los esferoides (flechas), barra: 13 μ m. **D y E:** Maxílula mostrando muchos hemocitos infiltrados formando redes. (flechas). **F:** Magnificación en 100 x de las redes de hemocitos en maxílula (flechas), barra 15 μ m. **F:** Hemocitos formando redes en maxílula, barra: 11 μ m.

3.6. DISCUSIÓN

Uno de los métodos más prometedores para controlar enfermedades en la acuicultura está relacionado con el fortalecimiento de los mecanismos de defensa de los organismos en producción. En el cultivo de camarones la aplicación de probióticos se ha caracterizado por proteger a los camarones contra la vibriosis, especialmente en los últimos años, en los que han surgido vibrios muy agresivos, como *Vibrio parahaemolyticus*, portador de toxinas PiAr/PirB. El mecanismo de acción de los probióticos puede ser optimizado incorporando fibras vegetales inmunoestimulantes en la dieta. En el presente estudio se aplicó un consorcio de probióticos (Ili, P62 y P64) y las fibras vegetales inmunoestimulantes F4 y C1011, en larvas y camarones juveniles realizando estudios *in vitro* e *in situ*. Los probióticos, Ili, P62 y P64 mostraron tener una fuerte capacidad colonizadora de los camarones y fueron capaces de impedir la adherencia de *Vibrio parahaemolyticus*, causante de AHPND. El efecto sinérgico de estas fibras y los probióticos se evidenció mediante una respuesta inmune mejorada y alta supervivencia ante desafíos con el *Vibrio parahaemolyticus*.

3.6.1 Estudios de la capacidad colonizadora de los probióticos del consorcio Ili, P62 y P64 mediante ensayos *in vitro*

Los resultados obtenidos *in vitro* de la caracterización morfológica utilizando microscopía electrónica de barrido demostraron que las bacterias del consorcio probiótico, poseen apéndices en la superficie celular bacteriana representados por fimbrias en la *Vibrio hepatarius* (P62), flagelos en *Vibrio diabolicus* (Ili) y fimbrias y flagelos en *Bacillus cereus* (P64). Estos apéndices les proveen la capacidad de interactuar con el ambiente cumpliendo funciones de motilidad y adhesión a superficies, funciones importantes que permiten la formación de biopelículas, reconocimiento y colonización de superficies objetivo (Van Gerven et al., 2011).

Los flagelos observados en las bacterias son considerados principalmente de motilidad, y les permiten el movimiento en enjambre, característica que se puede observar en bacterias patógenas y beneficiosas como las bacterias probióticas Ili y P62. El estudio demostró que la bacteria Ili posee los flagelos en toda la superficie de su cuerpo. Esta bacteria tuvo un movimiento en enjambre superior a P62 y P64, esto incidió, además en la formación de una biopelícula más fuerte. Estas características fueron establecido también en *Pseudomonas aeruginosa* (Conrad, 2012). En la formación de biopelículas también son importantes las fimbrias (Barken et al., 2008). Las biopelículas permiten a las bacterias protegerse del estrés ambiental y proliferar

(Solano et al., 2014). Como biopelículas, las células bacterianas son más resistentes que en su estado planctónico (Arunkumar et al., 2020). Además Las biopelículas contienen canales por los que pueden circular nutrientes (Klemm & Schembri, 2000) . Probióticos capaces de formar biopelículas fuertes son más resistentes y pueden aprovechar mejor los nutrientes disponibles.

Cabe señalar que *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND infecta a los camarones colonizando primero las superficies del estómago, donde genera toxinas que pueden penetrar en el hepatopáncreas posteriormente destruyéndolo (Luangtrakul et al., 2021; Soto-Rodriguez et al., 2015; Tran et al., 2013). Si estos sitios ya están ocupados por probióticos, la patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* podría reducirse. La capacidad de adhesión y movimiento en enjambre son características que permiten la colonización, siendo por lo tanto factores importantes en la caracterización de las bacterias probióticas. Ili, P62 y P64 aplicadas a larvas de camarones demostraron capacidad de adhesión y desplazamiento hacia diferentes superficies externas e internas en los diferentes estados larvarios del camarón. La bacteria Ili se adhiere y coloniza espacios de la superficie externa del cuerpo y en la entrada de la boca de las larvas de camarones. P62 colonizó la membrana peritrófica, P64 colonizó el epitelio de urópodos e intestino y el hepatopáncreas. Es decir, estas bacterias benéficas ejercieron su mecanismo inhibitorio llegando a sitios específicos, siendo uno de éstos el tracto digestivo. Colonizar migrando de manera coordinada a través de la superficie de los organismos, previene la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal (Senok et al., 2005).

Mediante la colonización las bacterias probióticas pueden ejercer mecanismos de exclusión competitiva que les permite posicionarse defendiendo la salud del camarón. Los resultados obtenidos con el consorcio probiótico Ili, P62, P64 concuerdan con Hao et al. (2014), quienes aplicaron un consorcio de bacterias (*Bacillus cereus*, *Aeromonas bivalvium*) en camarones, en su estudio el consorcio de bacterias excluyó competitivamente la acción del patógeno *Vibrio harveyi*. Resultados similares fueron encontrados por Domínguez et al., (2019) quienes establecieron la exclusión competitiva ejercidas de larvas camarones por *Pseudovibrio denitrificans* contra vibriospatógenos. (Sha et al., 2016), en su estudio establecieron que bacterias probióticas de *Lactobacillus* colonizaban superficies en el intestino del camarón excluyendo competitivamente a *Vibrio parahaemolyticus*. Los resultados revelan que los probióticos del consorcio Ili, P62, P64 aplicados en larvas de camarones poseen características y

propiedades idóneas para la colonización en el hospedero, y su aplicación en el cultivo de camarones puede adoptarse.

Cabe resaltar que los tres probióticos en estudio son de origen marino, Ili fue aislado de una larvicultura (Morales, comunicación personal) P62, P64 aislados de los camarones silvestres (Gullian et al., 2004). Ili y P62 pertenecen al género *Vibrio*, siendo este un grupo versátil, de una amplia diversidad y distribución ecológica, incluyendo ambientes marinos, donde es un grupo dominante (Liu Y. et al., 2017). P64 (*Bacillus cereus* ss), sería un comensal habitual de camarones. De hecho, se han aislado otras cepas probióticas de *Bacillus cereus* en el intestino de *Penaeus monodon* (NavinChandran et al., 2014), en quien se reportó una capacidad antagonista del bacilo contra patógenos del camarón. Los orígenes de los probióticos investigados en el estudio explican su aptitud (éxito) en interacciones con el camarón siendo idóneos para ejercer acción protectora en el organismo de camarones de cultivo.

3.6.2 Evaluación de las características inmunoestimulantes de las fibras vegetales mediante ensayos *in vitro*

El segundo factor analizado en esta tesis para favorecer las defensas del camarón contra *Vibrio parahaemolyticus* fue la inmunoestimulación de larvas y juveniles de camarón, mediante fibras vegetales naturales y comerciales las cuales se analizaron inicialmente *in vitro*, para lograr una detección rápida y de bajo costo (Villena, 2003). Además, los ensayos *in vitro* permiten un mayor control de las condiciones de los experimentos y modelizar las interacciones entre los agresores y el huésped (Villena et al., 2013). La evaluación *in vitro* realizada permitió seleccionar las fibras vegetales más inmunogénicas y determinar las dosis eficaces para las pruebas *in vivo*. Las fibras vegetales revelaron poseer capacidad de actuar como inmunoestimulantes al promover el choque respiratorio y la activación de la PO en cultivos primarios de hemocitos y extractos hemocitarios. Resultados similares han sido reportados por Lee et al. (2020), aplicando un extracto de polisacáridos en hemocitos de camarones *in vitro*, activando significativamente la fenoloxidasa (PO) y la tasa fagocítica, sin afectar la viabilidad celular.

De 18 polisacáridos analizados *in vitro* en este estudio, seis produjeron valores de generación de superóxido y activación de la PO superiores a los β -1,3-glucanos, utilizados como inmunoestimulante de referencia. Por su capacidad inmunoestimuladora los β -1,3-glucanos se han utilizado en estrategias de prevención

de enfermedades (Chen Y.Y. et al., 2016). Las cualidades inmunoestimulantes de diversos tipos de polisacáridos, además β -1,3-glucanos (Wang X.W. & Wang, 2013), se han reportado en varios estudios (Huang et al., 2006; Sun et al., 2019). La presencia de carbohidratos en la estructura repetitiva puede ser asumida por la inmunidad innata con PAMPs. La inmunidad innata es la herramienta que tienen los invertebrados para resistir a las infecciones (Medzhitov & Janeway, 2000), implicando el reconocimiento de patógenos por medio de los PRR, los cuales reconocen patrones moleculares repetitivos (β -1,3-glucanos, peptidoglicanos, LPS), propios de microorganismos, siendo esenciales para su supervivencia. En base a los resultados *in vitro*, las fibras F4 y C101 fueron seleccionadas como las más inmugénicas.

Antes de pasar a los ensayos *in vivo* se realizaron pruebas de toxicidad *in vitro* de las fibras. En los ensayos de viabilidad celular, las fibras vegetales seleccionadas F4, F6, C20, C50 y C101 demostraron no poseer toxicidad contra los hemocitos de camarones; de hecho, los valores de reducción del MTT fueron superiores a los del control. Este resultado permitió una mejor selección de la fibra vegetal inmunoestimulante. Estudios similares se realizaron con *Psidium guajava* (guayaba), la cual tiene propiedades inmunoestimulantes para camarón sin revelar toxicidad contra hemocitos de camarones (Dewi et al., 2021). Es importante investigar la viabilidad celular porque un estudio previo reveló que algunos extractos de plantas pueden ejercer un efecto tóxico sobre la célula huésped (Ajaiyeoba et al., 2006).

3.6.3 Ensayos *in vivo* en larvas de camarón combinando el consorcio de bacterias probióticas y fibras vegetales inmunoestimulantes

Las fibras F4 y C101 seleccionadas fueron aplicadas en la dieta de larvas, diseñándose diferentes tratamientos en combinación con probióticos, en los que se consideraron T1 (probióticos), T2 (probióticos + F4), T3 (probióticos + C101), T4 (F4), T5 (C101) y un control (sin tratamiento). Las larvas fueron tratadas por 18 días (durante la larvicultura) y se tomaron muestras de cada tratamiento para analizar la expresión de los genes de los péptidos antimicrobianos (AMPs) posteriormente las larvas fueron sometidas a la prueba de desafío con *Vibrio parahaemolyticus*. Los genes de AMPs que son constitutivamente expresados o inducidos, proveen medios de defensas rápidos y efectivos. La mayoría de estos genes codifican péptidos que son movilizados poco después de una infección y actúan rápidamente para neutralizar una amplia variedad de microbios (Diamond et al., 2009). Los AMPs del camarón, incluyendo las penaeidinas,

crustina y ALFs, juegan un papel importante en las respuestas antibacterianas y antivirales.

En el presente estudio, los probióticos aplicados en el tratamiento 1 (T1) regularon hacia abajo la expresión de crustinas, pero regularon al alza la expresión de ALF y peneidinas, indicando un efecto profundo sobre el sistema inmune. Esos resultados no concuerdan con las investigaciones realizadas por Luna Gonzalez et al. (2013) en las cuales camarones alimentados con probióticos y levaduras no presentaron diferencias significativas en la expresión de genes de peneidinas y crustinas. El resultado obtenido en el estudio con la expresión del gen de ALF fue similar a lo reportado por (Kewcharoen & Srisapoome, 2019), los cuales establecieron que la expresión del gen ALFs fue favorecida por la adición de bacterias probióticas en la dieta de camarones.

En cuanto a los tratamientos que incluyeron fibras se observó una regulación hacia abajo de peneidinas en el tratamiento T5 (C101), sin embargo, la combinación C101 con probióticos (T3) reguló al alza las peneidinas, cabe resaltar que luego de la larvicultura las larvas del tratamiento T3 tuvieron la mayor supervivencia. Estudios de alimentación combinando probióticos y quitosano (Chen et al., 2020b) resultaron en un aumento en la expresión de crustina y una regular expresión de peneidinas. La expresión de los genes AMPs en los tratamientos restantes del estudio no se incrementó de manera significativa. De acuerdo a Gollas-Galvan et al., 2017, esto podría deberse a la falta de un sistema inmunitario completamente desarrollado en las post larva de crustáceos.

Después del desafío, se observó una alta supervivencia de las larvas de camarones en los tratamientos que incluyeron el consorcio probiótico, en comparación con los otros tratamientos y el grupo control, reflejando la capacidad excluyente de patógenos de los probióticos. Se ha reportado que el probiótico Ili suplementado en la dieta de camarones, es capaz de limitar el crecimiento de vibrios patógenos (Restrepo et al., 2021). Resultados similares se obtuvieron con camarones suplementados con consorcio de *Bacillus* spp, manifestando una mejora de resistencia ante la acción del *Vibrio parahaemolyticus* (Kewcharoen & Srisapoome, 2019). Los tratamientos T4 (F4) y T5 (C101) no incluyen probióticos que puedan frenar el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* sin evitar, por lo tanto, la colonización del patógeno y la liberación de toxinas, tampoco evitarían que el patógeno proliferara en el agua lo que conduciría a la mortalidad de las larvas a pesar del efecto inmunoestimulante, observado inicialmente

en las primeras horas después del desafío en las larvas de camarones. En ese contexto resulta sorprendente la alta supervivencia obtenidos con las larvas tratadas con la fibra F4, demostrando los beneficios de un sistema inmune mejorado. La adición conjunta de probióticos y fibras vegetales puede mejorar la supervivencia y el estado fisiológico del organismo por su efecto dual de exclusión del patógeno y mejora de la respuesta inmune como se ha observado en otros estudios (Lee et al., 2020; NavinChandran et al., 2014; Rengpipat et al., 1998).

3.6.4 Ensayos *in vivo* en larvas de camarón combinando el consorcio de bacterias probióticas y fibras vegetales inmunoestimulantes

Los camarones juveniles fueron tratados por 50 días con los mismos tratamientos aplicados a las larvas. A fin de determinar el carácter inmunoestimulante de los tratamientos, antes del desafío se tomaron muestras de hemolinfa para realizar las pruebas inmunológicas de hemograma, activación de PO, generación de anión superóxido, y concentración de proteínas plasmáticas. Además, se tomaron muestras para histología y se realizó inmuno histoquímica para peneidinas con la finalidad de observar la expresión de este péptido en los hemocitos infiltrados en los tejidos. Finalmente, también se realizó una prueba de desafío con *Vibrio parahaemolyticus*. La capacidad inmunoestimulante de las fibras vegetales F4 y C101 y los probióticos se observó en la respuesta inmunitaria mejorada de los camarones, principalmente en generación de anión superóxido y concentración de proteínas plasmáticas. No se observaron diferencias significativas en conteos totales de hemocitos.

Los hemocitos de los camarones peneidos son responsables de la coagulación, endurecimiento del exoesqueleto y eliminación de materiales extraños (Johansson & Soderhall, 1989; Song & Hsieh, 1994). El THC es un indicador del estado inmune de los camarones, en el presente estudio el THC de los diferentes tratamientos no mostró diferencias significativas con respecto al control. En estudios previos se han reportado resultados similares, en esos estudios la administración de varias cepas bacterianas en camarones, no influyeron significativamente sobre el THC (Gullian et al., 2004; Sapcharoen & Rengpipat, 2013), sin embargo estudios realizados con *Bacillus cereus* aplicados en camarones indicaron un aumento en parámetros inmunológicos como el recuento total de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasa y el estallido respiratorio (NavinChandran et al., 2014). La información sobre aplicación combinada de probióticos y polisacáridos en cultivo de camarones es muy limitada, se cita por ejemplo la

investigación de la interacción de probiótico y β -1,3/1,6-glucanos (Rodríguez et al., 2007) quienes establecieron que el THC fue significativamente superior en comparación con el control.

En este estudio si se observaron diferencias en los conteos diferenciales de hemocitos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Pan et al., (2018) quienes aplicando fibras vegetales en la dieta de *Penaeus vannamei*, observaron aumento significativo en el recuento de células diferenciales de hemocitos. Los camarones del tratamiento, T4 mostraron un aumento significativo en el recuento de los hemocitos semigranulosos (SGC Los SGC poseen abundantes gránulos pequeños, intervienen en la fagocitosis, encapsulación y melanización (Smith & Söderhäll, 1983), además sintetizan y liberan los péptidos antimicrobianos, siendo una gran ventaja el incremento de los SGC en los diferentes tratamientos de la investigación. La disminución de SGC en el tratamiento T1 podría ser provocada por la alta infiltración de este tipo de células en el tejido conectivo, estómago y branquias, como ha sido reportado en infecciones bacterianas (Muñoz et al., 2002).

El anión superóxido es el primer producto liberado en el choque respiratorio. La medición del O_2^- ha sido aceptada como un método confiable para la cuantificación de la intensidad respiratoria (Song & Hsieh, 1994). Los resultados obtenidos en el estudio demostraron una tasa de anión superóxido (O_2^-) alta en los tratamientos con fibras vegetales con respecto al control, resultados inmunoestimulantes similares han sido previamente reportados usando extractos de (Dewi et al., 2021) en camarones juveniles cuyos experimentos revelaron mayor producción de anión superóxido, actividad fagocítica, recuento total de hemocitos y actividad de fenol oxidasa.

Con respecto a la activación de la PO los resultados en el presente estudio no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en contraste con otro estudio que demostró que la administración de probióticos aumentó significativamente la activación de la PO en la hemolinfa de camarones juveniles (Chomwong et al., 2018). Otro estudio demostró que la aplicación de extracto de cacao aplicados en camarones produjeron aumentos significativos en el recuento total de hemocitos, semigranulares, células, células granulares y actividad de la PO (Lee et al., 2020). En el presente estudio el efecto protector de un sistema inmunitario mejorado se reflejó en el aumento de la supervivencia y la resistencia ante *Vibrio parahaemolyticus*.

En los tratamientos de probióticos y combinación de fibras y probióticos, los resultados de supervivencia después del desafío con *Vibrio parahaemolyticus* fueron muy altos indicando la necesidad de probióticos para excluir al patógeno de los camarones y limitar su crecimiento en el medio. Cabe recalcar que las supervivencias de los camarones usando solo fibras vegetales F4 de 73,3% y de C101 de 82,2% resultaron altas comparadas con el control (23%) y similares a la obtenida (72,2) con la dieta que incluyó extracto de hojas de guayava (Dewi et al., 2021), indicando que un sistema inmune fortalecido protege a los camarones de las bacterias patógenas presentes. Estos resultados fueron consistentes con los informados por Trejo-Flores et al., 2016, quienes aplicaron una dieta inmunoestimulante (1g kg⁻¹ de alimento) por un período de 26 días con *Aloe vera* rico en polisacáridos (pectinas, celulosa, derivados de hemicelulosa, glucomanano, acemanano y manosa), reportando altas tasas de supervivencia en los camarones desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*.

De la misma manera (Luo et al., 2019) trataron camarones *Penaeus vannamei* con una dieta intermitente inmunoestimulante (200 mg /kg pienso⁻¹) de β -1,3-glucano durante 60 días, y observaron un aumento en la supervivencia de los camarones desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*, la que estuvo acompañada de Inmunidad mejorada. La mejora de la respuesta inmune o de la supervivencia con la suplementación dietética de prebióticos y/o probióticos ha sido también observada en otros estudios (Lee C. L. et al., 2020; Navin Chandran et al., 2014; Rengpipat et al., 1998). Varios probióticos entre otros por ejemplo *Vibrio* spp., *Bacillus* spp, bacterias ácido-lácticas, microalgas (Lakshmi et al., 2013) han mejorado, el sistema inmune y la supervivencia de los camarones.

Gullian et al. (2004) reportó que las cepas probióticas *V. hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus*. (P64), usadas en este estudio poseen un efecto inhibitorio contra el patógeno *Vibrio harveyi*. Los autores demostraron un aumento significativo del peso promedio y de la activación de la PO, en los camarones estimulados con ambos probióticos. Además, P64 incrementó el índice inmunitario en comparación con P62 (Mariel Gullian et al., 2004). Se conoce también que *Vibrio alginolyticus* posee actividad antagonista hacia un panel de vibrios patógenos de camarón blanco (Thompson J. et al., 2010). Balcázar et al. (2007) indicaron que la administración del probiótico *Vibrio diabolicus* (conocido en ese entonces como *Vibrio alginolyticus*) mejora la tasa de conversión alimenticia, y podría reducir la tasa de enfermedad causada por vibrios

(Balcázar & Rojas-Luna, 2007). La aplicación combinada de probióticos y prebióticos en la dieta reduce la colonización de bacterias patógenas (Kim, C. H. Seo & Paik, 2011).

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

En los camarones tratados con las distintas combinaciones de probióticos y fibras vegetales, se observaron en la mayoría de los casos fuertes incrementos en la presencia de hemocitos infiltrantes en el tejido conectivo de distintos órganos, en varios casos estos hemocitos estaban distendidos o formando redes (posibles trampas extracelulares). Los hemocitos distendidos o formando redes fueron más abundantes en los camarones tratados con la fibra C101 (tratamientos T3 y T5). En los camarones tratados con la fibra F4 se observaron hemocitos distendidos y en menor medida redes. También se detectaron gran cantidad de esferoides en el LO y ectópicos (zona oral). Hemocitos distendidos y esferoides también se observaron en animales moribundos y sobrevivientes del control, pero estos últimos presentaron escasa infiltración de hemocitos.

Cabe resaltar que esta abundancia de hemocitos fue palpable incluso en los tratamientos T1, T3 y T5, los cuales mostraban conteos de hemocitos totales no diferentes al control. Los resultados conjuntos de hemograma y de hemocitos infiltrados en tejidos, indican la gran abundancia de hemocitos totales en los camarones tratados con la fibra F4 (tratamientos T2 y T4), en los cuales se observaron altos conteos de hemocitos y muchos hemocitos infiltrados en los tejidos. En cuanto a señal para peneidinas se puede decir que se observó señal positiva tanto en hemocitos como otros tejidos, sin embargo, cabe resaltar que estos comportamientos estuvieron relacionados al tipo de tratamiento y que mayor número de tejidos marcados se detectaron en animales tratados con las dos fibras en evaluación.

A pesar de la enorme inversión en tejidos y procesos inmunes, el peso (g) de los camarones juveniles con los diferentes tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no se afectó en comparación con el control, estos resultados están en contraste con los resultados obtenidos con MOS en los que el peso de los camarones tratados por 60 días fue mejorado significativamente en comparación con el control (Zhang Jian et al., 2012). A pesar de los efectos sinérgicos positivos la aplicación de probióticos y fibras vegetales (considerado como prebiótico) aplicado en el cultivo de camarones es muy limitado, investigaciones de prebióticos y probióticos aplicados por 8 semanas en camarones demostraron no ejercer diferencias significativas en cuanto al peso (Prabawati et al., 2022). Es importante señalar que no tener efectos negativos sobre peso con tratamientos de fuerte demanda energética (los camarones deben hacer mucha inversión en tejidos inmunes, moléculas y mecanismos de defensa), constituye un factor a favor de los tratamientos aplicados. En conclusión, la combinación de probióticos de alta capacidad colonizadora con fibras inmunoestimulantes incrementa varios parámetros inmunes y mejoran la resistencia contra *Vibrio. parahaemolyticus* de camarones juveniles.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Los resultados de los ensayos indican que las bacterias del consorcio probiótico, *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus cereus* (P64), demostraron tener estructuras externas como fimbrias y flagelos que facilitan la motilidad, la adhesión a las superficies y la formación de biopelículas. Esto favoreció la colonización efectiva de las superficies internas y externas del cuerpo del camarón. Esto en combinación con el uso de las fibras inmunoestimulantes seleccionadas en este trabajo, mostraron un efecto protector significativo contra la vibriosis en las larvas y juveniles de camarón *Penaeus vannamei*, cuando fueron desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*.

Los tratamientos de probióticos y fibras vegetales tuvieron un impacto en la expresión de genes de AMPs en las larvas de camarón. Se observó una regulación a la baja en la expresión de crustinas y una mayor expresión de los genes de peneidinas y ALFs en el tratamiento probiótico, existiendo una posible relación entre expresión de peneidinas y mayor supervivencia.

Los tratamientos que combinaron probióticos y fibras vegetales mejoraron la respuesta inmune de los camarones, observándose una mayor generación de anión superóxido, una alta concentración de proteínas plasmáticas y la presencia de hemocitos positivos para peneidinas infiltrados en el tejido conectivo, principalmente en la zona oral. Esto contribuyó a una alta supervivencia frente al desafío realizado con *Vibrio parahaemolyticus*.

Todos los resultados obtenidos confirman que la combinación de probióticos con capacidad colonizadora y fibras inmunoestimulantes puede ser una estrategia efectiva para mejorar la salud y la resistencia inmune de larvas y juveniles del camarón *Penaeus vannamei* frente a la vibriosis. Esta estrategia podría tener aplicaciones beneficiosas en la acuicultura.

4.2. Recomendaciones

Se sugiere ampliar el presente estudio a través de la inmunomodulación y el uso de otros probióticos excluyentes de vibrios patógenos con otras fibras vegetales inmunoestimulantes.

Validar los ensayos de los mejores tratamientos encontrados en este estudio en sistemas de cultivo de camarón (larviculturas y piscinas) a fin de incrementar la confiabilidad en la investigación que permitan tejer redes entre la academia y la industria.

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

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif, H. M. R., Yilmaz, E., Dawood, M. A. O., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 551(January). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737951>
- Abdollahi-Arpanahi, D., Soltani, E., Jafaryan, H., Soltani, M., Naderi-Samani, M., & Campa-Córdova, A. I. (2018). Efficacy of two commercial and indigenous probiotics, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunophysiology and resistance response of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 496, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.082>
- Abdul Kari, Z., Kabir, M. A., Mat, K., Rusli, N. D., Razab, M. K. A. A., Ariff, N. S. N. A., Edinur, H. A., Rahim, M. Z. A., Pati, S., Dawood, M. A. O., & Wei, L. S. (2021). The possibility of replacing fish meal with fermented soy pulp on the growth performance, blood biochemistry, liver, and intestinal morphology of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture Reports*, 21, 100815. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100815>
- Abnave, P., Muracciole, X., & Ghigo, E. (2017). Macrophages in invertebrates: From insects and crustaceans to marine bivalves. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 62, 147–158. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_6
- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Aguilar-Rendón, K. G., Lozano-Olvera, R., Yáñez-Rivera, B., & Soto-Rodríguez, S. A. (2020). Bacteriological and histopathological analysis of *Penaeus vannamei* experimentally infected with *Vibrio parahaemolyticus*-AHPND strains. *Diseases of Aquatic Organisms*, 140, 167–177. <https://doi.org/10.3354/DAO03503>
- Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N., & Faggio, C. (2019). Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture*, 507(November 2018), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.049>

- Ajaiyeoba, E. O., Abiodun, O. O., Falade, M. O., Ogbale, N. O., Ashidi, J. S., Happi, C. T., & Akinboye, D. O. (2006). In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine*, *13*(4), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.01.015>
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, *45*(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Al-Deriny, S. H., Dawood, M. A. O., Zaid, A. A. A., El-Tras, W. F., Paray, B. A., Van Doan, H., & Mohamed, R. A. (2020). The synergistic effects of *Spirulina platensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, *17*(April), 100390. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100390>
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>
- Alvarez-Ruiz, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Mejía-Ruiz, C. H., Magallón-Barajas, F. J., Llera-Herrera, R., & Galván-Alvarez, D. A. (2015). Long-lasting Effect Against White Spot Syndrome Virus in Shrimp Broodstock, *Litopenaeus vannamei*, by LvRab7 Silencing. *Journal of the World Aquaculture Society*, *46*(6), 571–582. <https://doi.org/10.1111/jwas.12236>
- Amatul-Samahah, M. A., Wan Omar, W. H. H., Mohd Ikhsan, N. F., Amal Azmai, M. N., Zamri-Saad, M., & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*, *18*, 100471. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Amparyup, P., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2008). Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*, *45*(4), 1085–1093. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.07.031>
- Amparyup, P., Sutthangkul, J., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2012). Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(13), 10060–10069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294744>

- Andrade, T. P. D., Redman, R. M., & Lightner, D. V. (2008). Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. *Aquaculture*, 278(1–4), 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.024>
- Anggraeni, M. S., & Owens, L. (2000). The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(2), 85–92. <https://doi.org/10.3354/dao040085>
- Antony, S. P., Singh, I. S. 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. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.030>
- Arunkumar, M., Lewisoscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). *In vitro* and *in vivo* bio film forming *Vibrio* spp : A signi fi cant threat in aquaculture. 94(February), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.029>
- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendy, I., & Griffith, D. R. W. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 93–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x>
- Babu, B., Sathiyaraj, G., Mandal, A., Kandan, S., Biju, N., Palanisamy, S., You, S. G., Nisha, R. G., & Prabhu, N. M. (2021). Surveillance of disease incidence in shrimp farms located in the east coastal region of India and in vitro antibacterial efficacy of probiotics against *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 179(January), 107536. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107536>
- Bachère, E. (2003). Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: Potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 227(1–4), 427–438. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00521-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00521-0)
- Bailey, J. S., Blankenship, L. C., & Cox, N. A. (1991). Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*, 70(12), 2433–2438. <https://doi.org/10.3382/ps.0702433>
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>

- Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55(5), 409–412. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9000-0>
- Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>
- Banco Central del Ecuador (BCE)/ Ministerio de Producción, Comercio Exterior, I. y P. (2021). *BOLETIN DE CIFRAS. Comercio Exterior*.
- Bandeira, P. T., Vernal, J., Matos, G. M., Farias, N. D., Terenzi, H., Pinto, A. R., Barracco, M. A., & Rosa, R. D. (2020). A Type IIa crustin from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (crusFpau) is constitutively synthesized and stored by specific granule-containing hemocyte subpopulations. *Fish and Shellfish Immunology*, 97(October 2019), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.055>
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C. B., Engel, J. N., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 10(9), 2331–2343. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>
- Barreto, C., Coelho, J. D. R., Yuan, J., Xiang, J., Perazzolo, L. M., & Rosa, R. D. (2018). Specific Molecular Signatures for Type II Crustins in Penaeid Shrimp Uncovered by the Identification of Crustin-Like Antimicrobial Peptides in *Litopenaeus vannamei*. *Marine Drugs*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/md16010031>
- Bartlett, T. C., Cuthbertson, B. J., Shepard, E. F., Chapman, R. W., Gross, P. S., & Warr, G. W. (2002). Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Marine Biotechnology*, 4(3), 278–293. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0020-2>
- Basson, A., Flemming, L. A., & Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial Ecology*, 55(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9245-y>
- Bayne, C. J. (1990). Non-Self Phagocytosis Phagocytosis appears to be an ancient line

- of defense in Invertebrate Recognition. *Bioscience*, 40(10), 723–731.
- Ben Braïek, O., Morandi, S., Cremonesi, P., Smaoui, S., Hani, K., & Ghrairi, T. (2018). Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic *Enterococcus lactis* strains isolated from raw shrimps. *Microbial Pathogenesis*, 117, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.021>
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., & Walter, J. (2015). Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(5), 303–310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>
- Bray, W. A., Williams, R. R., Lightner, D. V., & Lawrence, A. L. (2006). Growth, survival and histological responses of the marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to three dosage levels of oxytetracycline. *Aquaculture*, 258(1–4), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.018>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Brown, K. L., & Hancock, R. E. W. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>
- Brunton, L. A., Desbois, A. P., Garza, M., Wieland, B., Mohan, C. V., Häsler, B., Tam, C. C., Le, P. N. T., Phuong, N. T., Van, P. T., Nguyen-Viet, H., Eltholth, M. M., Pham, D. K., Duc, P. P., Linh, N. T., Rich, K. M., Mateus, A. L. P., Hoque, M. A., Ahad, A., ... Guitian, J. (2019). Identifying hotspots for antibiotic resistance emergence and selection, and elucidating pathways to human exposure: Application of a systems-thinking approach to aquaculture systems. *Science of the Total Environment*, 687, 1344–1356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.134>
- 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(7), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R., & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 12(4), 353–366. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377>

- Carriel-Gomes, M. C., Kratz, J. M., Barracco, M. A., Bachère, E., Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2007). In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), 469–472. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000028>
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2011). Coagulation in invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.1159/000322066>
- Chen, M., Chen, X. Q., Tian, L. X., Liu, Y. J., & Niu, J. (2020a). Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*). *Aquaculture Reports*, 17(June), 100408. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100408>
- Chen, M., Chen, X., Tian, L., Liu, Y., & Niu, J. (2020b). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Improvement of growth, intestinal short-chain fatty acids, non-specific immunity and ammonia resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary water-soluble chitosan and mixed pr. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 236(February), 108791. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108791>
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., Wang, H. C., Han Ching, Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09923-6>
- Chen, Y. H., & He, J. G. (2019). Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 84(August 2018), 744–755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.069>
- Chen, Y. Y., Chen, J. C., Kuo, Y. H., Lin, Y. C., Chang, Y. H., Gong, H. Y., & Huang, C. L. (2016). Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to

- seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 55, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>
- Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M., & Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2), 364–377. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>
- Chiu, S. T., Chu, T. W., Simangunsong, T., Ballantyne, R., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2021). Probiotic, *Lactobacillus pentosus* BD6 boost the growth and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* via oral administration. *Fish and Shellfish Immunology*, 117(July), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.024>
- Chomwong, S., Charoensapsri, W., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2018). Two host gut-derived lactic acid bacteria activate the proPO system and increase resistance to an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 89, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.002>
- Chou Hsin-Yiu, Huang Chang-Yi, Wang Chung-Hsiung, Chiang Hsien-Choung, & Lo Chu-Fang. (1995). Pathogenicity of a *baculovirus* infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(3), 165–173. <https://doi.org/10.3354/dao023165>
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- Conrad, J. C. (2012). Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: Implications for biofilm formation. *Research in Microbiology*, 163(9–10), 619–629. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.016>
- Cornelio, C.-A. (2010). *Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo de camarón blanco Penaeus vannamei*. *Organismo internafile:///C:/Users/Oscar Soriano/Documents/Buenas Prácticas Acuícolas/225254.pdf* *cional regional OIRSA*
- Crittenden, R., Bird, A., Gopal, P., Henriksson, A., Lee, Y., & Playne, M. (2005). Probiotic Research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific Region. *Current Pharmaceutical Design*, 11(1), 37–53. <https://doi.org/10.2174/1381612053382304>

- Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Meseguer, J. (2003). In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *15*(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00134-1)
- Dautremepuits, C., Paris-Palacios, S., Betoulle, S., & Vernet, G. (2004). Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *137*(4), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.005>
- Dawood, M. A. O., & Koshio, S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, *454*, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.033>
- Defoirdt, T. (2014). Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *6*(2), 100–114. <https://doi.org/10.1111/raq.12030>
- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*, *26*(4), 313–328. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: Lessons learned from in vivo work. *ISME Journal*, *2*(1), 19–26. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.92>
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.004>
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., & Bachère, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28398–28406. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28398>
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., & Bachère, E. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*, *113*(3), 461–469. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.3.461>
- Dewi, N. R., Huang, H. T., Wu, Y. S., Liao, Z. H., Lin, Y. J., Lee, P. T., & Nan, F. H.

- (2021). Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 118(August), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.017>
- Dhar, A. K., & Thomas Allnutt, F. C. (2008). Taura Syndrome Virus. *Encyclopedia of Virology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00782-2>
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., & Kisich, K. O. (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host... [Curr Pharm Des. 2009] - PubMed result. *Current Pharmaceutical Design*, 15(21), 2377–2392. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2750833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ding, Y., Pan, L., Gao, G., & Huang, H. (2020). In vitro and in vivo immunologic potentiation of herb extracts on shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 107, 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.003>
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002>
- Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. A. (2019). The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans*, is effective to control pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 508(April), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.077>
- Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. A. (2018). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010>
- Domínguez-Borbor, C., Sánchez-Rodríguez, A., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. (2020). Essential oils mediated antivirulence therapy against vibriosis in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529(June), 735639. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735639>
- Duangsuwan, P., Phoungpetchara, I., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Wanichanon, C., & Sobhon, P. (2008). Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish*

- Immunology*, 24(4), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.011>
- Fakruddin, M., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1591-9>
- FAO. (2020). The State of world fisheries and aquaculture. In *INFORM* (Vol. 32, Issue 6). <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. In *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021*. <https://doi.org/10.4060/cb4474en>
- Farzanfar, A. (2006). The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48(2), 149–158. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x>
- Fernandes, S., Kerkar, S., D'Costa, A., Costa, M., Mishra, A., Shyama, S. K., & Das, K. R. (2021). Immuno-stimulatory effect and toxicology studies of salt pan bacteria as probiotics to combat shrimp diseases in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 113(December 2020), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.03.017>
- Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258(1–4), 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.013>
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>
- Flegel, Timothy W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(2), 249–266. <https://doi.org/10.1111/jwas.12589>
- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO Journal*, 27(17), 2271–2280. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.155>
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/jam.1989.66.issue-5>
- Fünfhaus, A., Göbel, J., Ebeling, J., Knispel, H., Garcia-Gonzalez, E., & Genersch, E.

- (2018). Swarming motility and biofilm formation of *Paenibacillus* larvae, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27193-8>
- García-Medel, D. I., Angulo, C., Escamilla-Montes, R., Fierro-Coronado, J. A., Diarte-Plata, G., Gámez-Jiménez, C., & Luna-González, A. (2020). *Bacillus licheniformis* BCR 4-3 increases immune response and survival of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* IPNGS16. *Aquaculture International*, 28(6), 2303–2318. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00585-2>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gollas-Galvan, T., Cabanillas-Gámez, M., Hernández-López, J., Coronado-Molina, D., & Martínez-Porchas, M. (2017). Transcriptional expression of immune system genes in *Litopenaeus vannamei* during ontogenetic development. *Aquaculture Research*, 48(3), 1110–1118. <https://doi.org/10.1111/are.12953>
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Al, G. E. T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (1999). AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Society*, 65(3), 969–973.
- Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W., & Warr, G. W. (2001). Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(7), 565–577. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00018-0)
- Guerreiro, I., Oliva-Teles, A., & Enes, P. (2018). Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 800–832. <https://doi.org/10.1111/raq.12201>
- Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1–4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>
- Gutiérrez-Dagnino, A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruí, P., del Carmen Flores-Miranda, M., Miranda-Saucedo, S., Medina-Beltrán, V., & Escamilla-Montes, R. (2015). Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. *Latin American*

Journal of Aquatic Research, 43(5), 912–921. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-11>

- Hackman, R. H. (1987). Chitin and the fine structure of cuticles. *Chitin and Benzoylphenyl Ureas*, 1–32. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4824-2_1
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- Hai, Ngo Van. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
- Hancock, R. E. W., Brown, K. L., & Mookherjee, N. (2006). Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211(4), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.017>
- Hancock, R. E. W., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, 8(9), 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0)
- 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*, 428–429, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.016>
- Hasson, K. W., Lightner, D. V., Poulos, B. T., Redman, R. M., White, B. L., Brock, J. A., & Bonami, J. R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(2), 115–126. <https://doi.org/10.3354/dao023115>
- Hasson, Kenneth W., Lightner, D. V., Mohny, L. L., Redman, R. M., & White, B. M. (1999). Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 38(2), 93–105. <https://doi.org/10.3354/dao038093>
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Mane, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hübby, N., & Givskov, M. (2003). Attenuation of PA by QSI. *EMBO Journal*, 22(15), 3803–3815.

- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., & Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 113(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0)
- Hideaki, A., Ichiro, O., & Katsuyoshi, M. (1993). Cell type-specific roles in the hemocyte clotting system of the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 105(1), 11–15. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90166-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90166-2)
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., & Esteban, M. Á. (2016). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 8(1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/raq.12082>
- Hossain, M. S., Dai, J., & Qiu, D. (2021). Dysbiosis of the shrimp (*Penaeus monodon*) gut microbiome with AHPND outbreaks revealed by 16S rRNA metagenomics analysis. *Aquaculture Research*, 52(7), 3336–3349. <https://doi.org/10.1111/are.15178>
- Huang, X., Zhou, H., & Zhang, H. (2006). The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(5), 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.008>
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H., & Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89415-w>
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164(1–4), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00193-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00193-8)

- Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU31R against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-12>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*(2), 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, *211*(4), 213–236. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>
- Johansson, M. W., & Soderhall, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology Today*, *5*(6), 171–176. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90139-7)
- Johansson, Mats W., & Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology B*, *156*(2), 175–181. <https://doi.org/10.1007/BF00695771>
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., & Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, *428–429*, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, *274*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
- 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 and Shellfish Immunology*, *94*(July), 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.013>
- Khmel, I. A., Belik, A. S., Zaitseva, Y. V., & Danilova, N. N. (2008). Quorum Sensing and Communication in Bacteria. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, *63*(1), 25–31. <https://doi.org/10.3103/S0096392508010057>

- Kim, C. H. Seo, Y. M., & Paik, I. K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*, *90*(1), 75–82. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00732>
- Klemm, P., & Schembri, M. A. (2000). IJ M Bacterial adhesins: function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, *290*(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80102-2](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2)
- Knipe, H., Temperton, B., Lange, A., Bass, D., & Tyler, C. R. (2021). Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, *13*(1), 324–352. <https://doi.org/10.1111/raq.12477>
- Kongnum, K., & Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, *32*(1), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.008>
- Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *140*(2–3), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.004>
- Kua, B. C., Iar, A., Siti Zahrah, A. ., Irene, J. ., Norazila, J. ., Nik Haiha, N. Y. ., Fadzilah, Y. ., Mohammed, M. ., Siti Rokhaiya, B. ., Omar, M. ., & Teoh, T. P. (2016). Current status of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of farmed shrimp in Malaysia. *Proceedings of the ASEAN Regional Technical Consultation on EMS/AHPND and Other Transboundary Diseases for Improved Aquatic Animal Health in Southeast Asia*, 55–59. <http://hdl.handle.net/10862/3090> <https://repository.seafdec.org.ph/handle/10862/3090>
- Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, *12*(3), 1867–1880. <https://doi.org/10.1111/raq.12414>
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K., & Sarkar, U. K. (2016). Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, *24*(4), 342–368. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841>
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. Te, Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R.,

- Chang, S. H., Yeh, M. De, Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H. o., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 1006–1014. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.008>
- Lakshmi, B., Viswanath, B., & Sai Gopal, D. V. R. (2013). Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *Journal of Pathogens*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/424123>
- Lamari, F., Sadok, K., Bakhrouf, A., & Gatesoupe, F. J. (2014). Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on *Artemia nauplii*. *Aquaculture International*, 22(2), 699–709. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9699-5>
- Lee, C. L., Chang, C. C., Kuo, H. W., & Cheng, W. (2020). Pectin of cacao pod husk, an efficient immunostimulant for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 107(PA), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.026>
- Lee, P. T., Lee, M. C., Ho, Y. T., Liao, Z. H., Huang, H. T., Ho, Y. S., & Nan, F. H. (2020). Polysaccharides from the green alga *caulerpa racemosa* (Agardh, 1873) improve the immune response and antioxidant status in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (*dendrobranchiata, penaeidae*). *Crustaceana*, 93(6), 611–632. <https://doi.org/10.1163/15685403-bja10045>
- Leonel Ochoa-Solano, J., & Olmos-Soto, J. (2006). The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food Microbiology*, 23(6), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.004>
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M. H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A. A., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2007). Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathogens*, 3(9), 1229–1239. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030126>
- Li, P., Burr, G. S., Gatlin, D. M., Hume, M. E., Patnaik, S., Castille, F. L., & Lawrence, A. L. (2007). Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *Journal of Nutrition*, 137(12), 2763–2768. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2763>
- Li, W. (2021). Dscam in arthropod immune priming: What is known and what remains unknown. *Developmental and Comparative Immunology*, 125(May), 104231. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104231>

- Li, Y., Liu, H., Dai, X., Li, J., & Ding, F. (2018). Effects of dietary inulin and mannan oligosaccharide on immune related genes expression and disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 76, 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.034>
- Li, Y., Yuan, W., Zhang, Y., Liu, H., & Dai, X. (2021). Single or combined effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharide and inulin on growth performance, gut microbiota, and immune response in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 39(2), 741–754. <https://doi.org/10.1007/s00343-020-9083-z>
- Lightner, D. V., & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1–4), 201–220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)
- Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L., & Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1031–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>
- 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 and Shellfish Immunology*, 41(2), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.028>
- 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 and Shellfish Immunology*, 28(5–6), 837–844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.012>
- Liu, L., Xiao, J., Zhang, M., Zhu, W., Xia, X., Dai, X., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2018). A *Vibrio owensii* strain as the causative agent of AHPND in cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153(January), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.02.005>
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., & Shao, Z. (2017). Genetic diversity and population structure of the *Bacillus cereus* group bacteria from diverse marine environments. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00817-1>
- Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S., Rodríguez, C., Moriñigo, M. A., & de La Banda, I. G. (2014). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens*

- Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(1), 295–309. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9844-0>
- Lowry, O. H., Rosebroug, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Luan, L. Q., Vu, N. T., Nghia, N. T., & Thao, N. H. P. (2021). Synergic degradation of yeast β -glucan with a potential of immunostimulant and growth promotor for tiger shrimp. *Aquaculture Reports*, 21, 100858. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100858>
- Luangtrakul, W., Boonchuen, P., Jaree, P., & Kumar, R. (2021). Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009463>
- Luna Gonzalez, A., Moreno Herrera, J. T., Campa Cordova, A. I., Gonzalez Ocampo, H. A., Fierro Coronado, J. A., Alvarez Ruiz, P., & Bueno Ibarra, M. A. (2013). Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5), 898–907. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-10>
- Luo, Z., Guo, J., Hao, S., Zhang, Z., Tang, H., Wu, H., & Jiang, J. (2019). The © Israeli Journal of an interdisciplinary online University of Hawaii at Manoa Discontinuous Administration of β -glucan is Effective for Preventing Immune Fatigue in *Litopenaeus vannamei*. *AquacultureHub, IJA_71.201*.
- Mai, H. N., Aranguren Caro, L. F., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2021). Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Molecular and Cellular Probes*, 57 (February), 101710. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101710>
- Maningas, M. B. B., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T., & Aoki, T. (2008). Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Molecular Immunology*, 45(5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.09.016>
- Maralit, B. A., Jaree, P., Boonchuen, P., Tassanakajon, A., & Somboonwiwat, K. (2018).

- Differentially expressed genes in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* AHPND (VP(AHPND)) and VP(AHPND) toxin. *Fish & Shellfish Immunology*, 81, 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.054>
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80412-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80412-2)
- Medzhitov, R., & Janeway, C. J. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, 89–97.
- Ming, L., Zhang, Q., Yang, L., & Huang, J. A. (2015). Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4), 5806–5811.
- Ministerio de Producción Comercio Exterior, I. y P. (2023). Comercio Exterior. In *Boletín en cifras, comercio exterior*. <https://doi.org/10.2307/j.ctvngmx.18>
- Mirbakhsh, M., Mahjoub, M., Afsharnasab, M., Kakoolaki, S., Sayyadi, M., & Hosseinzadeh, S. (2021). Effects of *Bacillus subtilis* on the water quality, stress tolerance, digestive enzymes, growth performance, immune gene expression, and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the early hatchery period. *Aquaculture International*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00758-7>
- Mohammadi, G., Rafiee, G., El Basuini, M. F., Abdel-Latif, H. M. R., & Dawood, M. A. O. (2020). The growth performance, antioxidant capacity, immunological responses, and the resistance against *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed Pistacia vera hulls derived polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 106(June), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.064>
- Mohan, K., Padmanaban, A. M., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Muralisankar, T., & Santhanam, P. (2016). Effect of dietary *Ganoderma lucidum* polysaccharides on biological and physiological responses of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 464, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.046>

- Mohney, L. L., Lightner, D. V., & Bell, T. A. (1994). An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), 116–125. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00811.x>
- Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164(1–4), 351–358. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00199-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00199-9)
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van Der Knaap, W. P. W., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1–3), 89–107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8)
- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Gueguen, Y., & Bachère, E. (2003). Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 27(4), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00102-7)
- Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., & Bachère, E. (2002). Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European Journal of Biochemistry*, 269(11), 2678–2689. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x>
- Mustafa, A., Buentello, A., Gatlin, D., Lightner, D., Hume, M., & Lawrence, A. (2019). Dietary supplementation of galactooligosaccharides (GOS) in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system and its effects on gut microflora, growth, stress, and immune response. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 40(6), 662–675. <https://doi.org/10.1080/15321819.2019.1675694>
- NavinChandran, M., Iyapparaj, P., Moovendhan, S., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2014). Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.004>
- Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 313–322. <https://doi.org/10.1128/jb.104.1.313-322.1970>

- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, *431*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>
- Ng, T. H., Chiang, Y. A., Yeh, Y. C., & Wang, H. C. (2014). Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. *Developmental and Comparative Immunology*, *46*(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.002>
- Nimrat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2011). Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, *169*(3–4), 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.07.003>
- Ninawe, A. S., & Selvin, J. (2009). Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges A.S. Ninawe et al. *Critical Reviews in Microbiology*, *35*(1), 43–66. <https://doi.org/10.1080/10408410802667202>
- Noriega-Orozco, L., Acedo-Félix, E., Higuera-Ciapara, I., Jiménez-Flores, R., & Cano, R. (2008). Pathogenic and non pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *49*(3–4), 60–67.
- 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. <https://doi.org/10.3354/dao02776>
- Ochoa-Álvarez, N. A., Casillas-Hernández, R., Magallón-Barajas, F. J., Ramirez-Orozco, J. M., & Carbajal-Millan, E. (2021). Protector effect of beta-glucans from shrimp pond-related yeasts in *Penaeus vannamei* rearing under white spot syndrome virus presence. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *49*(1), 18–28. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue1-fulltext-2514>
- Ock Kim, Y., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Abdullah Al-Ghanim, K., Al-Misned, F., Ahmed, Z., Kwon, J. T., Won Na, S., & Kim, H. J. (2020). Growth promoting activity of *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus subtilis* isolated from the shrimp gut. *Journal of King Saud University - Science*, *32*(2), 1641–1646. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.023>
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., & Pitones, V. (2020). *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of Microbiology*,

202(3), 427–435. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>

- Omarza Franklin. (2000). © Situación de la problemática por la presencia del virus mancha blanca (WSSW) en el cultivo del Litoral ecuatoriano durante 1999. In *Instituto Nacional de Pesca. Boletín Técnico y Científico: Vol. V* (Issue 2).
- Owens, L., De Beer, S., & Smith, J. (1991). Lymphoidal parvovirus-like particles in Australian penaeid prawns. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11, 129–134. <https://doi.org/10.3354/dao011129>
- Pan, S., Jiang, L., & Wu, S. (2018). Stimulating effects of polysaccharide from *Angelica sinensis* on the nonspecific immunity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 74(December 2017), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.067>
- Peña-navarro, N., Castro-vásquez, R., Vargas-leitón, B., & Dolz, G. (2020). Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. *Aquaculture*, 523(August 2019), 735190. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735190>
- Pham, D., Ansquer, D., Chevalier, A., Dauga, C., Peyramale, A., Wabete, N., & Labreuche, Y. (2014). Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris* shrimp hatcheries in New Caledonia. *Aquaculture*, 432, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.031>
- Phung, L. T., Phuong, T. T. M., Phung, N. K., & Nicolas, M. (2020). Isolation of *Bacillus* strains inhibition disease resistance of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease on the Shrimp in Can Gio, Vietnam. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 736(6). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/6/062003>
- Phyllis T, J. (1987). a Review of Fixed Phagocytic and pinocytotic cell of Decapod crustaceans, with remarks on hemocytes. *Fisheries (Bethesda)*, 11(c), 679–704.
- Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., & Miandare, H. K. (2017). Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 65–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.030>
- Prabawati, E., Hu, S. Y., Chiu, S. T., Balantyne, R., Risjani, Y., & Liu, C. H. (2022). A synbiotic containing prebiotic prepared from a by-product of king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* and probiotic, *Lactobacillus plantarum* incorporated in diet to

- improve the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 120(November 2021), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.11.031>
- Prayitno, S. B., & Latchford, J. W. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*, 132(1–2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00374-W](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00374-W)
- Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizuete, K., Sonnenholzner, S., Alexis, F., & Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus* sensu stricto (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 549(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>
- Rasko, D. A., & Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 117–128. <https://doi.org/10.1038/nrd3013>
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., & Rhodes, C. P. (1985). Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. *International Review of Cytology*, 97(C), 183–350. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62351-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62351-7)
- Rattanavichai, W., & Cheng, W. (2015). Dietary supplement of banana (*Musa acuminata*) peels hot-water extract to enhance the growth, anti-hypothermal stress, immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2), 415–426. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.011>
- Reiber, C. L., & McGaw, I. J. (2009). A review of the open and closed circulatory systems: New terminology for complex invertebrate circulatory systems in light of current findings. *International Journal of Zoology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/301284>
- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (1998). Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167(3–4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00305-6)
- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Muñoz, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species

- (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Bajarña, L., Betancourt, I., Rodríguez, J., Bayot, B., & Reyes, A. (2021). Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabollicus*). *Microbiome*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01043-8>
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Ringø, Einar, & Gatesoupe, F. J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: A review. *Aquaculture*, 160(3–4), 177–203. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00299-8)
- Roberfroid, M. B. (1999). Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Concepts in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J. Nutr*, 129(March), 1398–1401.
- Rodríguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., De Blas, I., Alday, V., & Calderón, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *Journal of Fish Diseases*, 26(8), 439–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00483.x>
- Rodríguez, J., Espinosa, Y., Echeverría, F., Cárdenas, G., Román, R., & Stern, S. (2007). Exposure to probiotics and β -1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. *Aquaculture*, 273(4), 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.042>
- Rodríguez, J., Ruiz, J., Maldonado, M., & Echeverría, F. (2012). Immunodetection of hemocytes, penaeidins and α 2-macroglobulin in the lymphoid organ of white spot syndrome virus infected shrimp. *Microbiology and Immunology*, 56(8), 562–571. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00476.x>
- Rowley, A. F. (2016). The Immune System of Crustaceans. In *Encyclopedia of Immunobiology* (Vol. 1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12005-3>
- Rusaini, & Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(3), 367–377.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.011>

- Saavedra-Olivos, K. Y., Peralta-Ortiz, T., Ordinola-Zapata, A., Sandoval-Ramayoni, J. E., Vieyra-Peña, E. G., Zapata-Cruz, M. A., Hidalgo-Mogollón, A., Morán-Ávila, B., Mendoza-Neyra, O. A., Mendoza-Dioses, M. E., & Campoverde-Peña, S. Y. (2018). Detection of a protein associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Litopenaeus vannamei* under semi-intensive farming in Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 29(1), 328–338. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., & Lee, Y. K. (1999). Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 10(3), 107–110. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00027-8)
- 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 and Shellfish Immunology*, 59, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.022>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.010>
- Sapcharoen, P., & Rengpipat, S. (2013). Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* (BP11 and BS11) on the growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(6), 946–954. <https://doi.org/10.1111/anu.12040>
- Sarathi, M., Ahmed, V. P. I., Venkatesan, C., Balasubramanian, G., Prabavathy, J., & Hameed, A. S. S. (2007). Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271(1–4), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.002>
- Schniederberend, M., Williams, J. F., Shine, E., Shen, C., Jain, R., Emonet, T., & Kazmierczak, B. I. (2019). Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathogens*, 15(11), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008149>

- Senok, A. C., Ismaeel, A. Y., & Botta, G. A. (2005). Probiotics: Facts and myths. *Clinical Microbiology and Infection*, *11*(12), 958–966. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01228.x>
- Sha, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., & Wang, L. (2016). Interaction between *Lactobacillus pentosus* HC-2 and *Vibrio parahaemolyticus* E1 in *Litopenaeus vannamei* in vivo and in vitro. *Aquaculture*, *465*, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.007>
- Shao, M. Y., Zhang, Z. F., Kang, K. H., Chen, Z. T., & Kim, J. M. (2004). The study on the cytology and histochemistry of lymphoid organ spheroids in *Penaeus chinensis*. *Aquaculture*, *240*(1–4), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.027>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x>
- Shockey, J. E., O'Leary, N. A., de la Vega, E., Browdy, C. L., Baatz, J. E., & Gross, P. S. (2009). The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(5), 668–673. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.010>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126987>
- Sivakamavalli, J., & Vaseeharan, B. (2013). Purification, characterization and functional analysis of a novel β -1, 3-glucan binding protein from green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *35*(3), 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.017>
- Smith, V. J., & Dyrinda, E. A. (2015). Antimicrobial proteins: From old proteins, new tricks. *Molecular Immunology*, *68*(2), 383–398. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.08.009>

- Smith, V. J., & Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Research*, 233(2), 295–303. <https://doi.org/10.1007/BF00238297>
- Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G., & Bachère, E. (2005). Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(10), 841–851. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.02.004>
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 40(1), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>
- Song, Y. L., & Hsieh, Y. T. (1994). Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*, 18(3), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0145-305X(94)90012-4)
- Song, Y. L., & Li, C. Y. (2014). Shrimp immune system - Special focus on penaeidin. *Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.6119/JMST-013-0813-1>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.03610-14>
- Sritunyalucksana, K., & Soderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1–3), 53–69. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00411-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00411-7)
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food*

- Microbiology*, 24(6), 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>
- Sun, Y., Wang, G., Peng, K., Huang, Y., Cao, J., Huang, W., Chen, B., & Hu, J. (2019). Effects of dietary xylooligosaccharides on growth performance, immunity and *Vibrio alginolyticus* resistance of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(1), 358–365. <https://doi.org/10.1111/are.13911>
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 123–135. <https://doi.org/10.3354/dao061123>
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., & Matoć, S. (2010). Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296–307.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H. O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., & Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (Sparus aurata, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture*, 280(1–4), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.020>
- T.A. Bell, D. L. (1989). Handbook of normal penaeid shrimp histology. In *Aquaculture* (Vol. 76, Issues 3–4). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90090-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90090-2)
- Tassanakajon, A., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., & Supungul, P. (2011). Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. *Marine Biotechnology*, 13(4), 639–657. <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9381-8>
- Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., & Tang, S. (2018). Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., Flegel, T. W., & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69–87.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>

- Thomas, A., Sudheer, N. S., Kiron, V., Bright Singh, I. S., & Narayanan, R. B. (2016). Expression profile of key immune-related genes in *Penaeus monodon* juveniles after oral administration of recombinant envelope protein VP28 of white spot syndrome virus. *Microbial Pathogenesis*, 96, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.05.002>
- Thompson, F., Brian, A., & Swing, J. (2006). The Biology of Vibrios. In F. L. Thompson, B. Austin, & J. Swings (Eds.), *The Biology of Vibrios*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555815714>
- Thompson, J., Gregory, S., Plummer, S., Shields, R. J., & Rowley, A. F. (2010). An in vitro and in vivo assessment of the potential of *Vibrio* spp. as probiotics for the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1177–1187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04743.x>
- Toledo, A., Castillo, N. M., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). *Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión*. 30(2).
- Totsika, M. (2016). Benefits and Challenges of Antivirulence Antimicrobials at the Dawn of the Post-Antibiotic Era. *Drug Delivery Letters*, 6(1), 30–37. <https://doi.org/10.2174/2210303106666160506120057>
- 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. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Trejo-Flores, J. V., Luna-González, A., Álvarez-Ruiz, P., Escamilla-Montes, R., Peraza-Gómez, V., Diarte-Plata, G., Esparza-Leal, H. M., Campa-Córdova, Á. I., Gámez-Jiménez, C., & Rubio-Castro, A. (2016). Protective effect of Aloe vera in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 465, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.033>
- Tseng, D. Y., Ho, P. L., Huang, S. Y., Cheng, S. C., Shiu, Y. L., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(2), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.003>

- Tsing, A., Arcier, J. M., & Brehélin, M. (1989). Hemocytes of Penaeid and Palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53(1), 64–77. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90075-X](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90075-X)
- Valenzuela-Castillo, A., Mendoza-Cano, F., Enríquez-Espinosa, T., Grijalva-Chon, J. M., & Sánchez-Paz, A. (2017). Selection and validation of candidate reference genes for quantitative real-time PCR studies in the shrimp *Penaeus vannamei* under viral infection. *Molecular and Cellular Probes*, 33, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.02.005>
- Van De Braak, C. B. T., Botterblom, M. H. A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W. B., Rombout, J. H. W. M., & Van Der Knaap, W. P. W. (2002). The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 13(4), 293–309. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0409>
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A. O., & Faggio, C. (2020). Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1), 16–42. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1643288>
- Van Gerven, N., Waksman, G., & Remaut, H. (2011). Pili and flagella: Biology, structure, and biotechnological applications. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 103). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00005-4>
- Vargas-Albores, F., & Yepiz-Plascencia, G. (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, 191(1–3), 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00416-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00416-6)
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 655–671. <https://doi.org/10.1128/mubr.64.4.655-671.2000>
- Vidya Sagar Reddy, G., & Ch, V. (2021). Efficacy of β -glucan from *Debaryomyces hansenii* as an immunostimulant in *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture International*, 29(4), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00678-6>
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., & Novoa, B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219(1–4), 43–56. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00515-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00515-X)

- Villena, A. J. (2003). Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13(1), 111–140. <https://doi.org/10.1023/A:1026304212673>
- Wang, H., Wang, C., Tang, Y., Sun, B., Huang, J., & Song, X. (2018). *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 494(May), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.020>
- Wang, P., & Granado, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6977–6982. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6977>
- Wang, R., Lee, S. Y., Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2001). Properties of the prophenoloxidase activating enzyme of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *European Journal of Biochemistry*, 268(4), 895–902. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01945.x>
- Wang, X. W., & Wang, J. X. (2013). Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(4), 981–989. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.008>
- Wang, Y. C., Hu, S. Y., Chiu, C. S., & Liu, C. H. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. *Fish and Shellfish Immunology*, 84(November 2018), 1050–1058. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.017>
- Wang, Yanbo, & Gu, Q. (2010). Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Marine Biology Research*, 6(3), 327–332. <https://doi.org/10.1080/17451000903300893>
- Wang, Yin, Al Farraj, D. A., Vijayaraghavan, P., Hatamleh, A. A., Biji, G. D., & Rady, A. M. (2020). Host associated mixed probiotic bacteria induced digestive enzymes in the gut of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2479–2484. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.010>
- Wangman, P., Longyant, S., Taengchaiyaphum, S., Senapin, S., Sithigorngul, P., & Chaivisuthangkura, P. (2018). PirA & B toxins discovered in archived shrimp

- pathogenic *Vibrio campbellii* isolated long before EMS/AHPND outbreaks. *Aquaculture*, 497(April), 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.025>
- Wei, C., Wang, X., Li, C., Zhou, H., Liu, C., Mai, K., & He, G. (2021). Effects of dietary *Shewanella* sp. MR-7 on the growth performance, immunity, and intestinal microbiota of Pacific white shrimp. *Aquaculture Reports*, 19, 100595. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100595>
- Widanarni, W., Taufik, A., Yuhana, M., & Ekasari, J. (2019). Dietary mannan oligosaccharides positively affect the growth, digestive enzyme activity, immunity and resistance against *Vibrio harveyi* of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(4), 271–278. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_4_01
- Wilson, W., Lowman, D., Antony, S. P., Puthumana, J., Bright Singh, I. S., & Philip, R. (2015). Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.032>
- Wong, H. C., Liu, S. H., Ku, L. W., Lee, I. Y., Wang, T. K., Lee, Y. S., Lee, C. L., Kuo, L. P., & Shih, D. Y. C. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 63(7), 900–906. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.900>
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42177>
- Xu, B., Zhang, G., Wang, L., Sagada, G., Zhang, J., & Shao, Q. (2021). The influence of dietary β -1,3-glucan on growth performance, feed utilization, antioxidative and immune status of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, May, 1–12. <https://doi.org/10.1111/anu.13299>
- Yedery, R. D., & Reddy, K. V. R. (2009). Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolsaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish and Shellfish Immunology*, 27(2), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.009>

- Yen, N. T. P., Nhung, N. T., Van, N. T. B., Cuong, N. Van, Tien Chau, L. T., Trinh, H. N., Tuat, C. Van, Tu, N. D., Phu Huong Lan, N., Campbell, J., Thwaites, G., Baker, S., & Carrique-Mas, J. (2020). Antimicrobial residues, non-typhoidal *Salmonella*, *Vibrio* spp. and associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam). *Food Control*, 107(July 2019), 106756. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106756>
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Research*, 161(2), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.07.001>
- Young Lee, S., & Söüderhaäll, K. (2002). Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 12(5), 421–437. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0420>
- Yue, S., How, H., Dong, D., Jiasong, Z., Xiaohan, Y., Xian, L., & Xiefa, S. (2022). Comparative Life Cycle Assessment of Whiteleg Shrimp (*Penaeus 2 vannamei*) Cultured in Recirculating Aquaculture Systems (RAS), 3 Biofloc Technology (BFT) and Higher-Place Ponds (HPP) Farming 4 Systems in China.
- Zhang, Jian, Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., & Xu, D. (2012). Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.001>
- Zhang, Jiquan, Li, F., Wang, Z., & Xiang, J. (2007). Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Biotechnology*, 127(4), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.08.013>
- Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H., & Xie, L. (2012). A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “bacterial white tail disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *PLoS ONE*, 7(2), 19–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029961>
- Zhou, L., Li, H., Qin, J. G., Wang, X., Chen, L., Xu, C., & Li, E. (2020). Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity. *Aquaculture*, 518(August 2019), 734847. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734847>
- Zhou, Z., Ding, Z., & Huiyuan, L. V. (2007). Effects of dietary short-chain

fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296–301. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00099.x>

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 and Shellfish Immunology*, 33(4), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>

Zorriehzahra, M. J. (2015). Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2s), 64–72. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72>

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS OBTENIDOS EN EL DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Ramirez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizueté, K., Sonnenholzner, S., Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus sensu stricto* (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 549, 737826.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>

2. Ramírez, M., Debut, A., Alexis, F., & Rodríguez, J. Control of vibriosis in shrimp through the management of the microbiota and the immune system. *Bionatura*. Volume 7/Issue 2 / 1 /

<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.1>

ANEXOS

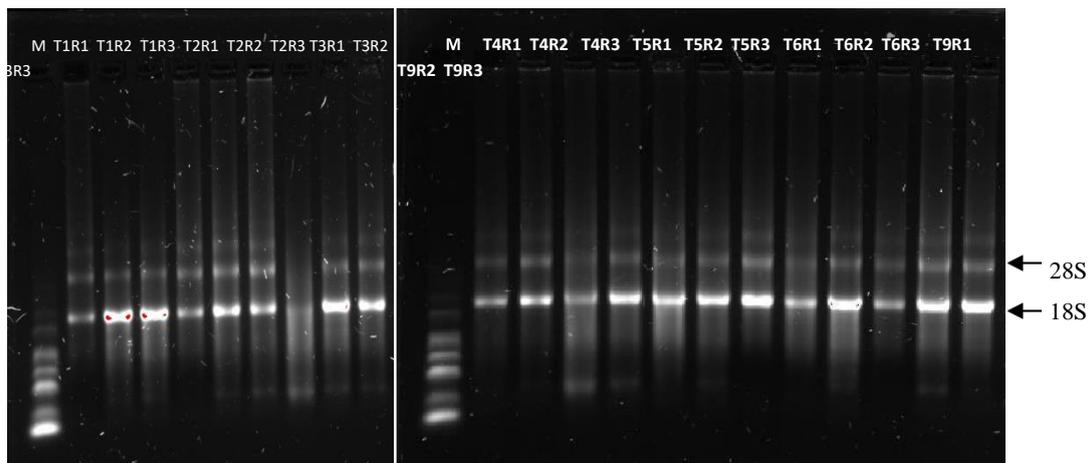
Anexo 1

Anexo 1

Cuantificación de las muestras de ARN de larvas de camarones *Penaeus vannamei* expuestos a diferentes tratamientos.

N°	Muestra	Concentración (ng/μL)	A260 (ABS)	A280 (ABS)	260/280	260/230
1	T1R1	185,8	4,645	2,285	2,03	0,70
2	T1R2	239,4	5,986	2,965	2,02	1,68
3	T1R3	243,6	6,091	3,028	2,01	1,37
4	T2R1	184,4	4,611	2,280	2,02	0,67
5	T2R2	259,5	6,488	3,200	2,03	1,37
6	T2R3	285,8	7,144	3,499	2,04	0,79
7	T3R1	390,5	8,976	4,306	2,03	1,66
8	T3R2	270,8	6,770	3,348	2,02	1,66
9	T3R3	258,8	6,470	3,193	2,03	1,45
10	T4R1	209,0	5,224	2,584	2,02	0,91
11	T4R2	187,5	4,687	2,317	2,02	0,74
12	T4R3	362,5	9,064	4,455	2,03	1,40
13	T5R1	311,8	7,794	3,852	2,02	1,49
14	T5R2	331,2	8,279	4,080	2,03	1,56
15	T5R3	277,9	6,946	3,429	2,03	1,33
16	T6R1	280,2	7,005	3,469	2,02	1,71
17	T6R2	216,2	5,406	2,669	2,03	1,12
18	T6R3	345,5	8,638	4,280	2,02	1,55
19	T9R1	377,7	8,973	4,652	2,03	1,28
20	T9R2	444,9	11,122	5,471	2,03	1,14
21	T9R3	270,5	6,763	3,326	2,03	1,60

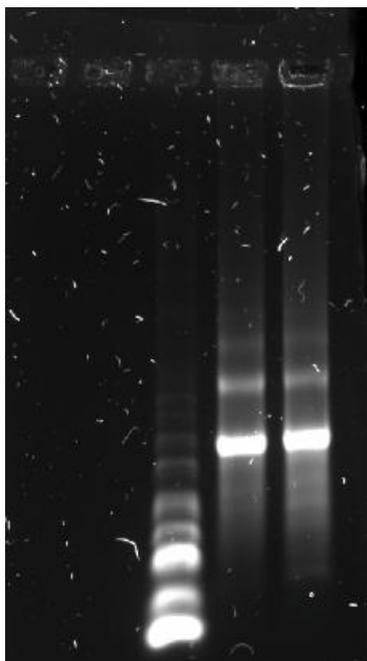
Anexo 2



Evaluación cualitativa de ARN de *Penaeus vannamei* expuestos a diferentes tratamientos en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe. M = marcador de peso molecular (RNA Millennium™ Markers, Invitrogen).

Anexo 3

Anexo 3



Repetición de muestras T9R1 y T3R1 al degradarse.

Muestra	T3R1	T9R1
260 nm/280 nm	2,03	2,03
260 nm/230 nm	1,66	1,28
Concentración (ng/μL)	390,5	387,7

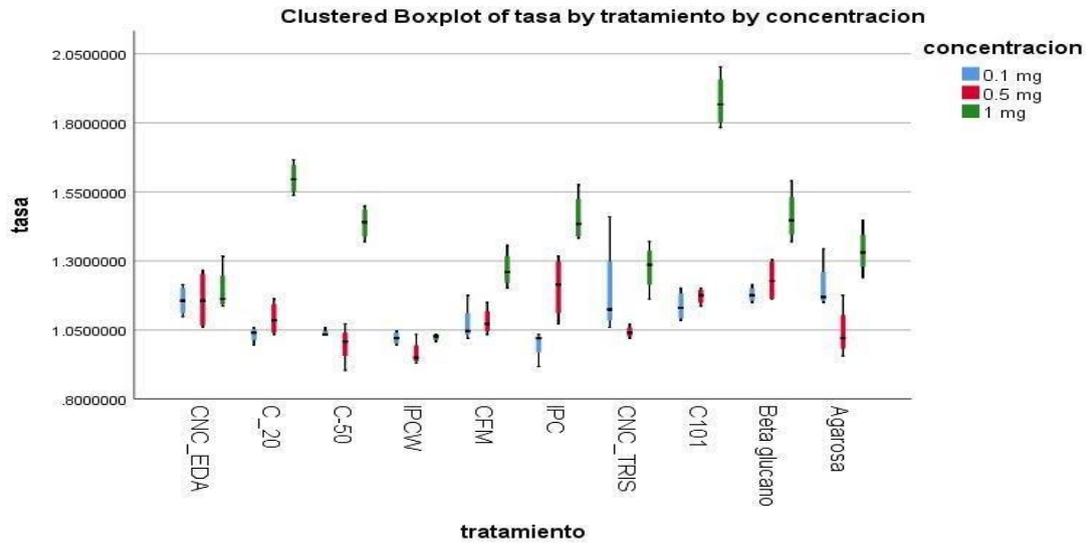
Anexo 4

Valores de expresión relativa de genes Crustina, ALFs y Peneidina-3^a ajustados a la expresión normal y estimaron por máxima verosimilitud (parámetro μ)

Gen	Tratamiento	Valor p Ajuste a Log-Normal	MLE de Parámetros Log-Normal		Esperanza	DE	CV
			u	s			
Crustina	1	0,542	-0,464	0,427	0,689	0,308	61,983
	2	0,888	0,115	0,389	1,210	0,489	32,150
	3	0,670	0,248	0,407	1,392	0,591	29,258
	4	0,489	0,145	0,818	1,615	1,575	50,624
	5	0,556	-0,144	0,326	0,913	0,306	35,670
	9	0,272	0,008	0,411	1,097	0,470	37,439
ALF	1	0,877	0,339	0,129	1,415	0,184	9,132
	2	0,777	0,074	0,428	1,180	0,529	36,281
	3	0,122	0,189	0,556	1,410	0,850	39,459
	4	0,141	-0,332	0,790	0,980	0,913	80,615
	5	0,896	-0,027	0,092	0,978	0,090	9,388
	9	0,457	-0,225	0,367	0,854	0,324	42,974
Pen-3a	1	0,331	0,404	0,443	1,652	0,769	26,794
	2	0,362	0,261	1,012	2,166	2,892	46,699
	3	0,861	0,576	0,354	1,894	0,692	18,701
	4	0,380	0,149	0,482	1,303	0,666	36,987
	5	0,989	-0,206	0,237	0,837	0,201	28,290
	9	0,750	0,060	0,193	1,082	0,210	17,807

Anexo 5

Fibras vegetales con código C a diferentes concentraciones, sin valores atípicos.



Anexo 6

Resumen estadístico de prueba de anión Superóxido (O_2^-) en camarones *Penaeus vannamei* con los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Muestra	Promedio	Error Estandar
T1	3	1,70431	0,0766246
T2	3	2,0406	0,0758783
T3	3	2,19598	0,19037
T4	3	2,37612	0,170121
T5	3	2,13867	0,133059
Control	3	1,27823	0,0328103

Anexo 7

Resumen estadístico de prueba de fenol oxidasa (PO) en camarones *Penaeus vannamei* con diferentes tratamientos.

Tratamientos	Fenol oxidasa (PO) base	Fenol Oxidasa(PO) estimulado	Error Estandar Fenol Oxidasa Base	Error Estandar Fenol Oxidasa Estimulado
T1	40,666	183,556	1,924	50,447
T2	46,333	115,444	0,384	3,632
T3	45,888	268,333	1,094	74,110
T4	48,333	188,556	2,666	56,136
T5	47,555	170,111	2,837	47,191
CONTROL	49,333	252,056	4,537	10,661