



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Efecto del biofloc sobre el estado de salud y resistencia a
enfermedades del camarón blanco del Pacífico
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIANA AGUILERA RIVERA

TUTORES PRINCIPALES:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
(UMDI, SISAL-FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

DR. JORGE HERNÁNDEZ LÓPEZ
(CIBNOR- HERMOSILLO)

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
(CIAD-MAZATLÁN)

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES
(UAS-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ
(UAS-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

ASESORA EXTERNA:

M. EN C. KARLA SUSANA ESCALANTE HERRERA
(UMDI, SISAL-FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

CD. MX., Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Efecto del biofloc sobre el estado de salud y resistencia a enfermedades del camarón blanco del Pacífico
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIANA AGUILERA RIVERA

TUTORES PRINCIPALES:
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
(UMDI, SISAL-FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)
DR. JORGE HERNÁNDEZ LÓPEZ
(CIBNOR- HERMOSILLO)

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
(CIAD-MAZATLÁN)
DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES
(UAS-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)
DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ
(UAS-FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM)

ASESORA EXTERNA:
M. EN C. KARLA SUSANA ESCALANTE HERRERA
(UMDI, SISAL-FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM)

MÉXICO, CD. MX., Junio, 2018

COMITÉ DE TESIS

TUTORES:

- Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés (Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Sisal-Facultad de Ciencias)
- Dr. Jorge Hernández López (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste- Unidad Hermosillo)

COMITÉ TUTORAL:

- Dra. María Cristina Chávez Sánchez (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-Unidad Mazatlán)
- Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes (Unidad Académica Sisal-Facultad de Química)
- Dra. Alejandra Prieto Davó (Unidad Académica Sisal-Facultad de Química)

ASESORES EXTERNOS:

- M. en C. Karla Susana Escalante Herrera (Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Sisal-Facultad de Ciencias)

EQUIPO COLABORATIVO

- Lic. Adriana Paredes Medina (Laboratorio de Cría larvaria)
- Dr. Juan Carlos Maldonado Flores (Laboratorio de Nutrición)
- Dr. Edlin Castro Guerra (Cátedras CONACyT)
- Lic. Gabriela Palomino (Laboratorio de Alimento vivo)
- M. en C. Manuel Valenzuela (Área de Engorda de camarón)
- M. en C. Maribel Badillo (Laboratorio de Ecología)
- M. en C. Miguel Arévalo (Área de Reproducción de camarón)
- Lic. Patricia Balam (Laboratorio de Alimento vivo)

Dios, concédeme **Serenidad**
para aceptar las cosas que no
puedo cambiar, **Valor** para cambiar
las cosas que si puedo y
Sabiduría para distinguir la diferencia.

Reinhold Niebuhr

DEDICATORIA

A mis padres, por darme la vida,
por enseñarme a trabajar,
por guiar mis pasos, por sus consejos....
simplemente por ser mis padres.

A mi hermana, por ser mi apoyo,
mi ejemplo, mi amiga,
mi consejera; por todo su apoyo,
por cada risa y cada lágrima.

Muy en especial, a mi abuelito, Antonio,
por hacer que cada día valga la pena,
porque no todo es trabajo
y por hacer que tanto estudio
tenga su recompensa.

A Rodrigo, mi pareja, por guiar mis ideas
y por ayudarme a madurar y a
disfrutar cada momento como único,
simplemente por enseñarme a vivir.

A mis angelitos de cuatro patas:
A mi niña, Hanny, por inspirarme a estudiar
la carrera más noble de todas (MVZ), porque
a pesar de estar allá arriba, cuidas mis pasos.
A Cookie, por tu nobleza y tu alegría
cada vez que me miras y me escuchas.
A mi pequeño Oliver, por llegar a mi vida
y por elegir compartir tu luz y alegría
a mi lado.

Los amo infinito

AGRADECIMIENTOS

Tener una hoja en blanco implica un gran reto. Implica el pensar qué escribir, cómo escribirlo y a quien mencionar. Afortunadamente, tengo tanta gente a quien agradecer el haber formado parte de esta etapa de mi vida, que espero no omitir a nadie.

Primero que nada, quiero agradecerle a Dios el haberme permitido llegar a este momento tan importante a nivel personal y profesional, por haberme dado fuerzas para soportar la distancia y estar tan lejos de casa y de mi familia. Gracias Dios por darme la dicha de brindarme la oportunidad de hacer lo que me gusta, y más aún por guiar mis pasos a lo largo de este ciclo, por tomar las decisiones que había que tomar sin importar las consecuencias, pues al final del día cada experiencia ha dejado en mí una enseñanza de vida.

A mis padres, por haberme dado su apoyo y la fuerza para seguir adelante. Por estar siempre al pendiente de mí y por todos sus consejos. A mi mamá, Mercedes, por enseñarme que a veces hay que sacrificar nuestra zona de confort por hacer realidad nuestros sueños, implicando muchas veces el sacrificar momentos con la gente que queremos, porque a pesar de todo, la gente a la que amamos seguirá con nosotros pase lo que pase. A mi papá, Jaime, porque muy a su manera, siempre me dio palabras de aliento para seguir adelante y por no dejarme rendir durante todo este proceso.

A mi hermana, Maribel, por ser mi ejemplo por seguir en el área académica, por enseñarme que el transmitir el conocimiento es cuestión de pasión y no de obligación. Porque muchas veces, a pesar de que no haya descanso y mientras hagamos lo que nos gusta, no importa el tiempo invertido y las horas que se lleven sin dormir.

A Rodrigo, por soportar mis cambios de humor, mis berrinches, mis altibajos. Pero más que todo, por elegirme como compañera y hacer este camino más llevadero, agradable y reconfortante. ¡Gracias por compartir esta aventura y por hacerme parte de tu vida, a pesar de que tardaste en llegar...Te amo!

A los amigos que estuvieron y están desde hace cuatro años: Ana Kiel, Sra. Luisa, Manuel Amaral, José Luis Horta, Kory, Héctor, Jess, Alfredo, Edén, Daniel Arceo, Mirna, Karlita, Ale Prieto, Claudia Durruty, Manuel Valenzuela, Jennie, Omar Sánchez, Linda *brasiliensis*, Rodrigo *vannamei*, Andrea Campos, Javi, Daniel Toxtega, Yess, Diego Ruíz, Diego Vázquez y Claudia Remes.

A mis compañeros de doctorado, por las risas y por compartir esta misma historia, llena de alegrías, quejas y consejos: Edén, Natalia Calvo, Stefanini, Giulia, Héctor, Quetzalli, Roberto, Pedrito, Efraín, Iris, Martín y José.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología (UNAM) y al equipo colaborativo que hizo y hace más venidero todos los asuntos relacionados con las cuestiones administrativas: Dra. Gloria Villaclara Fatjó, Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez, M. en C. Diana Juárez Bustos, Guadalupe Godoy Medina, Gabriela Almaraz Mejía, Biol. Yazmín Valenzuela Velázquez y Chantal Ruíz Guerrero. Al Consejo Nacional de Ciencia y de Tecnología (CONACyT) (Ciencias Básica 167670) por el apoyo y financiamiento otorgados para la realización de este trabajo de investigación.

A mis tutores y miembros de comité de tesis, que a lo largo de estos cuatro años dedicaron una parte de su tiempo para fortalecer mi formación y guiar mis decisiones: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, Dr. Jorge Hernández López, Dra. Alejandra Prieto Davó, Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, Dra. María Cristina Chávez Sánchez y M. en C. Karla Susana Escalante Herrera.

A todo el equipo del Programa Camarón: M. en C. Miguel Arévalo (reproducción de camarones), M. en C. Manuel Valenzuela (engorda y mantenimiento de camarones), Lic. Gabriela Palomino (alimento vivo), Lic. Adriana Paredes (levantamiento larvario), Lic. Patricia Balam (alimento vivo), Dr. Juan Carlos Maldonado (nutrición acuícola), M. en C. Maribel Badillo (procesamiento de muestras histológicas) y a todos los estudiantes que forman parte de este grupo, especialmente al M. en C. Edén Magaña Gallegos, Roberto Martínez, Rodrigo González Zúñiga y Linda González Zúñiga.

A todos los profesores que, dentro y fuera de Sisal, me transmitieron sus enseñanzas y siempre estuvieron dispuestos ante cualquier conflicto académico: Dra. Alejandra Prieto Davó (escritura de artículos científicos y asesoría técnica en los métodos relacionados con la microbiología y biología molecular), Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes (asesoría en el montaje del reto bacteriano, qPCR y procesamiento de datos relacionados con estrés oxidativo), M. en C. Karla Susana Escalante Herrera (asesoría en técnicas de laboratorio relacionadas con biología molecular y microbiología), Dr. Edlin Castro Guerra (asesoría en el manejo de datos y métodos estadísticos), M. en C. Korynthia López Aguiar (asesoría en el procesamiento de muestras de agua para la determinación de nutrientes), Dra. Rossana Rodríguez Canul (infraestructura del CINVESTAV para la estandarización de los retos bacterianos), Dra. Maite Mascaró (asesoría en el uso de métodos estadísticos), Dra. Cristina Pascual (asesoría en cuanto a la discusión de resultados relacionados con el sistema inmunológico) y Dr. Gerard Cuzon (asesoría en los diseños experimentales).

¡Ya estuvo!

RESUMEN

En los últimos años, los sistemas de cultivo biofloc (BFT) han adquirido gran importancia en el sector acuícola, no solo por los beneficios que aporta a los organismos acuáticos a nivel nutricional, sino por disminuir de manera significativa el riesgo de brotes de enfermedades virales y bacterianas que afectan de manera constante a los cultivos tradicionales de camarón. En este estudio, se evaluó el efecto del BFT sobre el estado de salud y tolerancia a enfermedades de juveniles de *L. vannamei*. Para ello, se llevaron a cabo dos estudios: el primero de ellos se centró en un reto bacteriano con 6 diferentes densidades bacterianas (10^3 - 10^8 UFC) usando una cepa patógena de *V. harveyi* que fue inoculada a camarones previamente cultivados en BFT, esto con el propósito de encontrar la densidad más adecuada que permitiera observar la evolución progresiva de la enfermedad a lo largo de 10 días de monitoreo. Además, se analizó la expresión de genes relacionados con el sistema inmune para ver el efecto de la densidad bacteriana sobre dicha expresión. Los resultados obtenidos indicaron que, de acuerdo con la densidad bacteriana, la expresión de los genes aumentó o disminuyó; además de que con 10^6 UFC fue posible que la evolución de la enfermedad se diera de manera paulatina. En el segundo estudio, se comparó la resistencia a enfermedades de juveniles de *L. vannamei* previamente cultivados en BFT y agua clara e inoculados con la misma cepa de *V. harveyi* (estandarizada durante el primer estudio). Después de 10 días de reto bacteriano se evaluaron indicadores metabólicos, inmunológicos y signos de enfermedad en los camarones. En la mayoría de los casos, dichos indicadores aumentaron de manera significativa por efecto del sistema de cultivo (mayor en BFT que en agua clara), mas no por el efecto de la cepa patógena utilizada en el reto bacteriano. Además, solamente los camarones cultivados en agua clara mostraron signos compatibles con una vibriosis. Los resultados obtenidos en ambos estudios sugieren que el BFT ayuda a prevenir el desarrollo de enfermedades, esto gracias a que ayuda a mejorar la respuesta inmune de los camarones, haciéndolos así más resistentes a enfermedades.

ABSTRACT

During the last years, the biofloc rearing system (BFT) have acquired a significant importance in the aquaculture sector by its nutritional benefits and for help to reduce significantly the viral and bacterial diseases, which affect constantly the traditional shrimp farming. In this study, the effect of BFT on health status and disease resistance in juveniles of *L. vannamei* was evaluated. In this case, two studies were carried out: the first study was a bacteria challenge with six different bacteria densities (from 10^3 to 10^8 CFU) and using a pathogenic strain of *V. harveyi* that was inoculated in shrimp previously reared in BFT. The objective of this study was to determinate the adequate bacteria density that allowed to observe the progressive evolution of the disease for 10 days. According to the bacteria density, up or down-regulation of immune response-related genes was observed. Furthermore, with 10^6 CFU was possible to observe the progressive evolution of disease. For the second study, disease resistance in juveniles of *L. vannamei* previously reared in BFT or in a traditional clear seawater system and then inoculated with the same pathogen strain of *V. harveyi* was evaluated. After 10 days of the bacteria challenge, metabolic and immunological performance, besides of signs of disease were analyzed. In most cases, these performances increased significantly by the effect of the rearing system (higher in BFT than clear seawater), and not by the effect of the bacteria challenge. Furthermore, only shrimp reared in clear seawater showed a typical vibriosis. The results obtained in both studies suggests that the BFT helps to prevent diseases outbreaks because it benefits the shrimp immune response, which are more resistant to diseases.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| DEDICATORIA | 5 |
| AGRADECIMIENTOS | 6 |
| RESUMEN..... | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 12 |
| LISTA DE GRÁFICAS..... | 14 |
| LISTA DE TABLAS | 16 |
| CAPÍTULO 1..... | 18 |
| Introducción, antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos | 18 |
| Introducción | 19 |
| Antecedentes..... | 20 |
| Justificación..... | 33 |
| Hipótesis | 34 |
| Objetivos | 34 |
| CAPÍTULO 2..... | 35 |
| Determinación de la carga bacteriana de <i>V. harveyi</i> CAIM1792 para producir una respuesta inmune eficiente en el camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> | 35 |
| Materiales y métodos..... | 36 |
| Resultados..... | 44 |
| Discusión..... | 49 |
| Conclusiones..... | 53 |
| CAPÍTULO 3..... | 54 |
| Respuesta inmune del camarón blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> previamente cultivado en BFT y agua clara y posteriormente infectado con <i>Vibrio harveyi</i> | 54 |
| Materiales y métodos..... | 55 |
| Resultados..... | 63 |
| Discusión..... | 74 |
| Conclusiones..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 4..... | 82 |
| Discusión general, conclusión y recomendaciones para estudios futuros | 82 |
| Discusión general..... | 83 |
| Conclusión | 87 |
| Recomendaciones para estudios futuros..... | 88 |
| Referencias | 89 |
| ANEXOS..... | 108 |
| Anexo 1: Caracterización fenotípica de <i>Vibrio harveyi</i> CAIM1792 | 109 |
| Anexo 2. Extracción de ARN (Técnica de Trizol)..... | 111 |
| Anexo 3: Preparación de la solución fijadora de Davidson (alcohol-formalina-ácido acético)..... | 112 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Distribución de los organismos <i>L. vannamei</i> previamente cultivados en BFT e inoculados con <i>V. harveyi</i> CAIM1792. | 38 |
| FIGURA 2. Análisis de las curvas de disociación de los genes β -actina (A), <i>a2M</i> (B), <i>proFO</i> (C), <i>pen3a</i> (D) y <i>Hc</i> (E) de <i>L. vannamei</i> por qPCR. | 41 |
| FIGURA 3. Análisis de las curvas de eficiencia de los genes β -actina (A), <i>a2M</i> (B), <i>proFO</i> (C), <i>pen3a</i> (D) y <i>Hc</i> (E) de <i>L. vannamei</i> por qPCR. | 42 |
| FIGURA 4. Signos observados durante el tiempo de exposición de <i>L. vannamei</i> en los tratamientos 10^7 y 10^8 UFC mL ⁻¹ de <i>V. harveyi</i> CAIM1792. (A) Melanización con necrosis (flechas continuas) y coloración pálida en músculo (flechas discontinuas) con expansión de cromatóforos; (B) coloración rojiza y necrosis en urópodos. | 44 |
| FIGURA 5. PCA de la expresión relativa de los genes <i>Hc</i> , <i>a2-M</i> , <i>proFO</i> y <i>pen3a</i> en <i>L. vannamei</i> no infectados (Control) e infectados con <i>V. harveyi</i> CAIM1792 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC mL ⁻¹). | 46 |
| FIGURA 6. Distribución de los organismos <i>L. vannamei</i> previamente cultivados en BFT o AC e inoculados con <i>V. harveyi</i> CAIM1792. | 57 |
| FIGURA 7. Análisis de la curva de disociación del gen <i>SOD</i> de <i>L. vannamei</i> por qPCR. | 60 |
| FIGURA 8. Análisis de la curva de eficiencia del gen <i>SOD</i> de <i>L. vannamei</i> por qPCR. | 61 |
| FIGURA 9. Signos observados durante el tiempo de exposición de <i>L. vannamei</i> en el tratamiento AC/INOC. (A) camarón con pleópodos rojizos; (B) zona de melanización acompañada de coloración rojiza en músculo y expansión de cromatóforos; (C) hepatopáncreas con atrofia y coloración rojiza; (D) urópodos con coloración rojiza y necrosis. | 63 |
| FIGURA 10. Tejidos de hepatopáncreas en juveniles de <i>L. vannamei</i> del tratamiento AC/INOC. (A) infiltración hemocítica o inflamación (50 μ m); (B) nódulos hemocíticos melanizados (50 μ m); (C) degeneración hidrópica (20 μ m) y (D) atrofia tubular (50 μ m). Tejidos de hepatopáncreas en juveniles de <i>L. vannamei</i> previamente cultivados en BFT. (E) muestra tomada del tratamiento BFT/INOC (50 μ m) y (F) muestra tomada del tratamiento BFT/Control (20 μ m). | 72 |

FIGURA 11. Efecto producido por los factores SC, RB e interacción SC/RB sobre indicadores metabólicos e inmunológicos de juveniles de *L. vannamei* previamente cultivados en AC (A) y BFT (B) y posteriormente infectados experimentalmente con la cepa patógena *V. harveyi* CAIM1792. SC=Sistema de cultivo; RB=Reto bacteriano; AC=Agua clara; BFT=Biofloc. 85

FIGURA 12. (A) Crecimiento de colonias de *V. harveyi* CAIM1792 en agar TCBS. (B) Morfología de colonias de la cepa de *V. harveyi* CAIM1792 en agar TCBS. 108

LISTA DE GRÁFICAS

- GRÁFICA 1.** Promedio \pm Desviación estándar obtenidas para la expresión relativa de los genes *proFO* (a), *a2M* (b), *pen3a* (c) y *Hc* (d) en *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 UFC mL⁻¹). 47
- GRÁFICA 2.** Efecto del factor SC dado por el ANOVA bifactorial de 2 x 2 y seguido de la prueba de Tukey para la variable PROT (mg g⁻¹) en juveniles de *L. vannamei*. Letras indican diferencias significativas entre tratamientos. SC=Sistema de cultivo; BFT=Biofloc; AC=Agua clara. 65
- GRÁFICA 3.** Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable SOD (U mg⁻¹ prot) en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo. 66
- GRÁFICA 4.** Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable CAT (U mg⁻¹ prot) en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo. 67
- GRÁFICA 5. Gráfica de los datos obtenidos para la variable *Hc* (mmol L⁻¹) en juveniles de *L. vannamei* para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano. 68
- GRÁFICA 6.** Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *SOD* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo. 68
- GRÁFICA 7.** Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *a2M* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo. 69
- GRÁFICA 8.** Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *proFO* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. Letras primas indican diferencias significativas por el factor RB. SC= Sistema de cultivo; RB= Reto bacteriano. 69

GRÁFICA 9. Gráfica de los datos obtenidos para el gen *Hc* en juveniles de *L. vannamei*, para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano. 70

GRÁFICA 10. Gráfica de los datos obtenidos para el gen *pen3a* en juveniles de *L. vannamei*, para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano. 70

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1.** Secuencias de nucleótidos utilizadas para amplificar los genes *a2M*, *proFO*, *Hc* y *pen3a* de *L. vannamei* por qPCR. 40
- TABLA 2.** Días de observación de juveniles *L. vannamei* no inoculados (Control) e inoculados con la cepa *V. harveyi* CAIM1792 a diferentes densidades (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 CFU), los cuales presentaron lesiones en el cuerpo con diferentes grados de severidad. La severidad de las lesiones fue clasificada de acuerdo con la siguiente escala: G0= sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; y G4=lesiones severas, letal (Lightner, 1996). 45
- TABLA 3.** Grupos homogéneos usando la prueba de *t* con corrección de Bonferroni para la expresión relativa de los genes relacionados con respuesta inmune (*proFO*, *a2M*, *pen3a* y *Hc*) en juveniles de *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 CFU mL⁻¹). 47
- TABLA 4.** Mortalidad diaria en juveniles de *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 CFU). 48
- TABLA 5.** Secuencias de nucleótidos utilizadas para amplificar el gen *SOD* de *L. vannamei* por qPCR. 60
- TABLA 6.** Días de observación en juveniles de *L. vannamei* con evidencia de lesiones en diferentes grados de severidad y de acuerdo con el sistema de cultivo (BFT, AC) y reto bacteriano (INOC, Control). La severidad de las lesiones fue clasificada en la siguiente escala: G0=sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; y G4=lesiones severas, letal (Lightner, 1996). 64
- TABLA 7.** Promedio \pm Error estándar de metabolitos (CHOL, GLU, AGs, PROT) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores. NA= análisis no aplicable. 65
- TABLA 8.** Promedio \pm Error estándar de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores. 66

TABLA 9. Promedio \pm Error estándar de hemocianina (Hc) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores. 67

TABLA 10. Promedio \pm Error estándar de la expresión relativa de los genes *SOD*, *Hc*, *proFO*, *a2M* y *pen3a* en *L. vannamei*. Superíndices con letra indican diferencias significativas por el factor SC. Superíndices con letra prima indican diferencias significativas por el factor RB. Valor de significancia de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores. SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano. 70

Tabla 11. Mortalidad diaria, tasa de supervivencia y número de camarones con lesiones histopatológicas en hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* de acuerdo con SC (BFT, AC) o RB (Control, INOC). La severidad de los hallazgos histopatológicos fue clasificada con la siguiente escala: G0= sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; and G4=lesiones severas, letal (Lightner,1996). SC= Sistema de Cultivo; RB= Reto Bacteriano. 73

TABLA 12. Características fisiológicas de la cepa de *V. harveyi* CAIM1792. (+) fermentación positiva; (-) fermentación negativa. 109

CAPÍTULO 1

**Introducción, antecedentes,
justificación, hipótesis y objetivos**

Introducción

Durante los últimos años, la demanda mundial en el consumo de camarón generado a partir de la acuicultura ha ido en aumento (CONAPESCA, 2014). Por ello, se ha prestado gran interés en implementar programas de mejoramiento genético y en mejorar la calidad de los alimentos para obtener organismos más saludables (Leyva-Ordáz *et al.*, 2010). No obstante, las enfermedades son un problema que afecta al cultivo de camarón, debido a las altas mortalidades generadas en los cultivos y a las pérdidas económicas que esto conlleva. Algunos ejemplos de esta problemática se representan claramente entre los años 1992 a 2000 por efecto del virus de la mancha blanca (de sus siglas en inglés, WSSV) (Valderrama & Anderson, 2015) y entre los años 2009 a 2013 a consecuencia de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (de sus siglas en inglés, AHPND) (anteriormente llamado síndrome de la mortalidad temprana ó EMS) (Tran *et al.*, 2013).

En este sentido, los sistemas de cultivo biofloc (BFT) no solo ofrecen beneficios a nivel nutricional (Crab, 2010; Panjaitan, 2010; Otoshi *et al.*, 2011) y reproductivo (Emerenciano, 2012), sino que además son una alternativa que mantiene un equilibrio microbiano entre el agua y los organismos acuáticos. Por dicha razón, los animales cultivados bajo estas condiciones pudieran ser menos propensos a enfermedades (Avnimelech, 2015). En este sentido, el estudio del sistema inmune permite comprender la capacidad de los organismos para mantener su integridad biológica mediante la diferenciación de lo “propio” y lo “extraño” (Hernández-López *et al.*, 2011).

Dentro de las enfermedades bacterianas, el género *Vibrio* tiene un lugar importante en la acuicultura, ya que a pesar de tratarse de bacterias nativas del agua (Baffone *et al.*, 2003; Denner *et al.*, 2002; Heidelberg *et al.*, 2002; Potasman *et al.*, 2002; Urakawa *et al.*, 2000), son clasificadas como oportunistas, ya que aprovechan cualquier desequilibrio en el ambiente (*e.g.* variaciones de temperatura, salinidad o deficiencia de oxígeno en el agua) para producir inmunosupresión en los camarones y hacerlos más propensos a brotes de enfermedades en cualquier etapa de su desarrollo (Thompson *et al.*, 2010).

Antecedentes

Producción mundial y nacional

Durante los últimos 10 años, China ha sido el país líder en la producción mundial de camarón, seguido de países del sureste de Asia (Tailandia, Vietnam, Indonesia, Bangladesh, Malasia, Filipinas, Myanmar y Taiwán), la India y países de América, donde México es considerado uno de los productores más importante en este rubro (Valderrama & Anderson, 2015).

En nuestro país, los Estados de Sinaloa y Sonora son quienes producen la mayor cantidad de camarón de cultivo (CONAPESCA, 2014). Sin embargo, esta industria se ha desarrollado en menor proporción en el Caribe y Golfo de México, donde representa una fuente importante de empleo para las comunidades rurales de la zona (Gullian *et al.*, 2010). Aunque el Estado de Yucatán no es considerado como un productor importante de camarón, del 2013 al 2014, la producción en esta zona, junto con los Estados de Baja California, Colima, Guerrero, Jalisco, Quintana Roo y Tabasco, aumentó de 4,296 a 5,296 ton (CONAPESCA, 2014).

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) es una de las especies que conforman el mayor porcentaje de captura de camarón en el Pacífico Mexicano. Su captura se realiza desde la Bahía de Topolobampo hasta las costas de Chiapas (Parra-Covarrubias, 1997). Es una de las especies más estudiadas y comercializadas en acuicultura (Treece, 2000), por lo que existe una amplia gama de información sobre resultados favorables obtenidos sobre su domesticación, reproducción y nutrición (Akiyama, 1989; McIntosh *et al.*, 1999; Taw *et al.*, 2002; Ricque-Marie *et al.*, 2004; Cruz-Suárez *et al.*, 2009; Andriantahina *et al.*, 2012; Argüello-Guevara & Molina-Poveda, 2013; Robledo *et al.*, 2014). Esta especie ha sido introducida por algunas granjas productoras de camarón de la Península de Yucatán, obteniendo también niveles de producción favorables gracias a su resistencia a factores estresantes y a su alta productividad (Arena *et al.*, 2003; Gaxiola *et al.*, 2006).

***Vibrio* en acuicultura**

Las bacterias del género *Vibrio* pertenecen a la familia *Gammaproteobacteria*, son bacterias Gram negativas, móviles (con 1 a 2 flagelos polares), mesófilas, quimioorganotróficas, con metabolismo fermentativo facultativo; heterotróficas y con un tamaño de 1 a 3 μm (Thompson *et al.*, 2004). De manera natural, los vibrios se encuentran en estuarios, costas, sedimentos y sistemas de cultivo (Heidelberg *et al.*, 2000; Urakawa *et al.*, 2000; Denner *et al.*, 2002; Potasman *et al.*, 2002; Baffone *et al.*, 2003), por lo que forman parte de la microbiota de corales (Rosenberg & Ben-Haim, 2002), peces (Huys *et al.*, 2001), moluscos (Sawabe *et al.*, 2003), crustáceos (Vandenberghé *et al.*, 2003) y zooplancton (Heidelberg *et al.*, 2002). Al aislarlas en condiciones de laboratorio, son capaces de crecer en agar marino o en medios selectivos como TCBS, y la mayoría son oxidasa-positivo (Thompson *et al.*, 2004).

Entre las funciones benéficas que estas bacterias desempeñan en el ambiente marino se encuentran la degradación de materia orgánica, su papel como fuente de ácidos grasos poliinsaturados esenciales, la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos y la regulación de las comunidades bacterianas en el agua (Cavallo & Stabili, 2004; Thompson *et al.*, 2004). A pesar de estos beneficios, los vibrios son considerados bacterias oportunistas, ya que ante algunas condiciones son capaces de provocar enfermedades, entre las que se incluyen la vibriosis (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006, 2010), erosión bacteriana del caparazón, síndrome de Zoea II (Lightner & Pantoja, 1996), bolitas blancas (Vandenberghé *et al.*, 1999), enfermedad de las patas rojas (Alapide-Tendencia & Dureza, 1997), vibriosis luminiscente (Ruby *et al.*, 1980; Lightner *et al.*, 1992; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006), síndrome de los rojos vivos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010, 2012), síndrome de verano (Goarant *et al.*, 2004, 2006), síndrome del 93 (Saulnier *et al.*, 2000) y el recientemente descubierto EMS/AHPND (Tran *et al.*, 2013). Todas estas enfermedades afectan en mayor o menor grado el crecimiento, supervivencia y reproducción de los camarones (Cavallo & Stabili, 2004).

Tanto en medio natural como en los sistemas acuícolas, las variables medioambientales juegan un papel importante en la incidencia y prevalencia de

vibrios. En este sentido, la salinidad es una condicionante idónea para el desarrollo y persistencia de diferentes especies de *Vibrio* (incluyendo a las cepas patógenas), quienes en general toleran salinidades de hasta 30 ppm (Ching & Portal, 1998; Lipp *et al.*, 2002; Martínez, 2007). El efecto de la salinidad tiende a ser mayor en época de secas, ya que la alta evaporación provocada por las altas temperaturas ocasiona un incremento directo en la concentración de sales en el agua (Barange & Perry, 2009). De esta manera, en esta época del año la tendencia a brotes de enfermedades por bacterias de este género es mucho mayor que el resto del año (Sechi *et al.*, 2000; Kushmaro *et al.*, 2001; Harvell *et al.*, 2002; Rosenberg & Ben-Haim, 2002).

Los trabajos dedicados al estudio poblacional de este género bacteriano mencionan que, además de la salinidad, la temperatura es la principal variable medioambiental que tiene un efecto importante sobre la distribución, patogenicidad y resistencia de vibrios marinos, tanto en vida libre como en un sistema acuícola (Thompson *et al.*, 2004; Takemura *et al.*, 2014). Su crecimiento es mayor en ambientes cálidos y su incidencia y prevalencia más persistente en los meses más calurosos del año, tolerando rangos de temperatura de hasta 30°C (Lipp *et al.*, 2002; Cavallo & Stabili, 2004). En aguas con una temperatura menor a los 20°C se encuentra una menor densidad de estas bacterias y a 10°C su presencia en la columna de agua es mínima, ya que se mantienen en el sedimento o inactivas en el plancton en Estado Viable No Cultivable (VBNC), de donde reemergen cuando las condiciones son de nuevo favorables (González *et al.*, 1999; Hervio-Heath *et al.*, 2002; Ramamurthy *et al.*, 2014).

Aunque en menor proporción, los gradientes de pH hacen más susceptibles a los camarones a una infección bacteriana, ya que valores mayores o menores al pH óptimo (entre 7.5 y 8.5) pueden tener serias consecuencias en el metabolismo, crecimiento, supervivencia, capacidad osmótica y capacidad de respuesta inmune de estos animales (Cheng & Chen, 2001; Li & Jiann-Chu, 2008; Subramanian *et al.*, 2014). Por ejemplo, valores ácidos (menores a 5) pueden inhibir la absorción de Na⁺ y Cl⁻ y estimular la salida por difusión pasiva de esos iones a través de las branquias, afectando además la capacidad del organismo para transferir oxígeno. En el caso de valores de pH básicos

(mayores a 10) se puede observar una inhibición en la excreción de NH_4 y un aumento en la excreción de CO_2 (Cheng & Chen, 2001; Wood, 2001; Álvarez-Borrego, 2007; Subramanian *et al.*, 2014;).

Otros factores bióticos que también pueden tener un efecto sobre la presencia de *Vibrio* son los florecimientos de fitoplancton que se presentan durante la temporada de secas (Lear, 1963; Seki, 1965; Baumann *et al.*, 1971; Compagnucci, 2012) y la presencia de zooplancton (Kaneko & Colwell, 1973; Goarant *et al.*, 2006), ya que ambas comunidades planctónicas funcionan como un reservorio de esta bacteria en el agua (Kaneko & Colwell, 1973; Eiler *et al.*, 2006; Nelapati *et al.*, 2012). De igual manera, la concentración de clorofila α podría propiciar la presencia de vibrios durante los meses cálidos del año (primavera y verano) (Phillips *et al.*, 2007; de Magny *et al.*, 2008; Oberbeckmann *et al.*, 2012).

Se ha observado que el desequilibrio de alguna de estas variables en los ambientes naturales es consecuencia del aumento en la frecuencia y fuerza de fenómenos meteorológicos (fenómeno de El Niño o La Niña, tormentas tropicales o eventos de sequía) (Barange & Perry, 2009), los cuales tienen un impacto sobre la aparición, distribución y patogenicidad de enfermedades infecciosas que afectan a los organismos acuáticos (Cook, 1992; Chen & Cheng, 1995; Harvell *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2005; Barange & Perry, 2009; Baker-Austin *et al.*, 2012). Aunque los camarones silvestres se encuentran expuestos a estos cambios, la mayoría de las veces las infecciones por *Vibrio* son asintomáticas. No obstante, el deterioro en la calidad del agua en los sistemas de cultivo acuícolas está relacionado a otros factores, tales como las altas densidades de siembra que muchas veces se manejan en los estanques, un exceso en la tasa de alimentación, o el uso inadecuado de fertilizantes o antibióticos (Barange & Perry, 2009; Cuéllar-Anjel *et al.*, 2010), provocando brotes importantes de enfermedades en los camarones cultivados. Además, dado que en los sistemas tradicionales se maneja recambio de agua, el daño entre el sistema de producción acuícola y el ambiente costero puede verse reflejado en un aumento de concentración de nutrientes (P y N), la entrada de contaminantes (metales pesados,

pesticidas, agroquímicos, químicos industriales y coliformes), patógenos y predadores (Rodríguez, 2000; Boyd, 2001). Por ello, es importante el monitoreo constante de las variables mencionadas y la implementación de programas para la eliminación de desechos generados en las granjas, evitando así la presencia de enfermedades en los animales y el deterioro de los cuerpos de agua naturales.

Sistemas BFT como alternativa en acuicultura

Una de las dificultades que más han persistido en la acuicultura es la presencia de enfermedades, principalmente las causadas por agentes virales y bacterianos, siendo en este último caso el género *Vibrio* el más problemático. Como se discutió con anterioridad, las variables medioambientales en el agua son primordiales para el óptimo desarrollo de los organismos acuáticos; y para el caso específico de los camarones bajo condiciones de cultivo, la calidad de agua es vital para evitar la incidencia y prevalencia de enfermedades.

Teniendo en cuenta estos factores, en la década de los 70's surge una nueva alternativa de cultivo, la cual es denominada con el nombre de "biofloc" (BFT), y fue diseñada con el objetivo de mantener la calidad del agua en los estanques, reducir los problemas de eutrofización causados por las descargas generadas por las granjas de camarón (Avnimelech, 1999) y obtener valores de producción superiores a los de las técnicas de cultivo tradicionales (Panjaitan, 2010).

El BFT es un sistema con nulo o mínimo recambio de agua, con aireación continua y mezcla permanente de la misma, favoreciendo de esta manera el desarrollo de productores primarios (algas) que promueven la formación de materia orgánica que será consumida por microorganismos heterotróficos (bacterias, hongos, protozoarios), quienes usarán a las heces, exoesqueletos, restos de animales muertos y alimento no consumido como sustrato, formando de esta manera flóculos que servirán como fuente de alimento rico en proteína nativa que será consumida por los camarones (Avnimelech, 2015).

Una de las virtudes más importante de estos sistemas de cultivo radica en el papel que juegan sobre la nutrición de los camarones, ya que se ha demostrado que son una excelente fuente de proteína microbiana, lo que disminuye los costos de adquisición de alimento comercial. Otra de sus ventajas es la presencia de “factores de crecimiento” que no solamente se relacionan con la producción de proteína microbiana, sino también con la presencia de ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos, siendo estos últimos los que juegan un rol importante en la síntesis de membranas celulares, el crecimiento y actividad del sistema inmune de los camarones (Cruz-Ricque *et al.*, 1987).

Las ventajas del BFT no solamente se limitan a nivel nutricional, sino también desde el punto de vista de bioseguridad, por lo que son considerados una excelente alternativa para mantener la calidad de agua y disminuir la presencia de patógenos que desencadenan enfermedades en los animales, además de pérdidas económicas importantes por las altas mortalidades generadas (Crab *et al.*, 2012). Por lo tanto, se evita el uso de antibióticos, que lejos de ser eficaces pueden llegar a provocar que los patógenos desarrollen mecanismos de resistencia (Defoirdt *et al.*, 2011).

De acuerdo con Lightner (2005) “*la bioseguridad es una práctica de exclusión de patógenos de los sistemas de cultivo acuáticos para la prevención de determinadas enfermedades en regiones o países*”. A este respecto, son diversas las investigaciones que avalan la presencia de moléculas o sustancias en el BFT que presentan este efecto, por lo que puede ser considerado como un sistema que cubre los requerimientos en cuanto a bioseguridad se refiere, evitando así la presencia y propagación de enfermedades en los cultivos. Además, sus características ayudan a mantener la calidad de agua y minimizan los impactos generados por esta actividad sobre los cuerpos de agua naturales. De igual manera, cabe destacar que la ausencia de recambio de agua en el BFT representa un ahorro en el consumo de este elemento, disminuyendo su uso hasta en un 30% (Crab *et al.*, 2012).

Para mantener una óptima calidad de agua, el BFT tiene la capacidad de controlar las concentraciones de N que de manera natural se generan en un sistema acuícola, esto como consecuencia del alimento no consumido, materia orgánica en

descomposición o heces, lo cual genera desechos nitrogenados tóxicos para los organismos acuáticos y que incluyen al Nitrógeno Amoniacal Total (TAN) compuesto por amoniaco (NH_3) y amonio (NH_4) para los organismos acuáticos. Para contrarrestar este efecto, se puede estimular el crecimiento de bacterias mediante la fertilización de los estanques con fuentes de carbono, entre las que se incluyen la melaza, harina de trigo, harina de tapioca, glicerol, acetato y glucosa (Hari *et al.*, 2004; Crab *et al.*, 2010a, 2010b; Rajkumar *et al.*, 2015). Las bacterias del BFT tienen la función de transformar los TAN que pudieran acumularse en el estanque en nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3), obteniendo como producto final proteína microbiana que sirva como alimento para los camarones (Avnimelech, 1999; Schneider *et al.*, 2006; Crab *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2009; Crab *et al.*, 2012).

Los microorganismos presentes en el BFT tienen la capacidad de impedir la comunicación entre células bacterianas, fenómeno conocido como *quorum sensing*, el cual consiste en la producción y liberación de autoinductores, los cuales aumentan en concentración cuando la densidad bacteriana también lo hace, provocando la expresión de genes relacionados con procesos de simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, motilidad, esporulación y formación de biopelículas (Miller & Bassler, 2001). Este efecto ha sido probado exitosamente en infecciones experimentales con *V. harveyi* en *Artemia franciscana*, encontrando menor toxicidad de la bacteria y mayor supervivencia de los organismos como efecto de los componentes extracelulares presentes de manera natural en el BFT, aunque hasta la fecha no se conoce con certeza cómo estos mecanismos son llevados a cabo (Crab *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se ha probado el efecto de materiales de reserva (poli- β -hidroxibutiratos) producidos por algunas bacterias nativas del BFT (*Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Alcaligenes* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) sobre el control de infecciones bacterianas (Defoirdt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010; Avnimelech, 2015), esto gracias a que estimulan la formación de una barrera protectora a nivel intestinal, evitando así el establecimiento y desarrollo de bacterias patógenas en el organismo (Hari *et al.*, 2004; Yilmaz *et al.*, 2005; Avnimelech, 2015). Estos materiales se pueden encontrar de manera comercial, aunque su

aplicación es limitada por sus altos costos. Por ello, su producción natural en el BFT resulta favorable, no solo en términos económicos, sino también por tener organismos más saludables y más resistentes a las enfermedades (Defoirdt *et al.*, 2007; Halet *et al.*, 2007; De Schryver *et al.*, 2010; Nhan *et al.*, 2010).

Otra de las cualidades de estos sistemas en cuanto a bioseguridad se refiere es su efecto de tipo probiótico (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014), ya que se ha demostrado la presencia de bacterias con estas propiedades, entre las que se incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Paenibacillus* y *Weisella* (Avilés-Gómez, 2011). A comparación de un sistema de cultivo tradicional, donde debe hacerse una inversión en la compra de estos productos y debe seguirse una correcta forma de aplicación para su óptimo funcionamiento, el BFT tiene la virtud de producirlos y tenerlos disponibles permanentemente en el agua, reduciendo de manera significativa la introducción y esparcimiento de enfermedades (Crab *et al.*, 2010a). También se ha reportado la presencia de otros géneros bacterianos (*Bacillus cereus*, *Paenibacillus* spp. y la cepa *Bacillus* S11) que han demostrado disminuir el efecto patógeno de algunas cepas de *V. harveyi* y *V. vulnificus* en larvas y juveniles de *P. monodon*, disminuyendo de manera importante las mortalidades y mejorando de manera significativa la respuesta inmune de estos animales, principalmente la actividad fagocítica y el sistema proFO (Rengpipat *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006).

A pesar de todas las ventajas que el BFT ofrece para la acuicultura, aún existen limitantes que impiden que esta tecnología de cultivo sea utilizada por la mayoría de las granjas productoras de camarón. Entre estas limitantes se encuentran el alto costo de inversión, el alto suministro de energía que se requiere para utilizar aireadores de forma permanente, el riesgo de perder los cultivos a causa de fallas en el suministro de energía (lo que equivale a no tener aireadores funcionando en los estanques), la complejidad que pudiera llegar a representar su operación en las granjas (de ahí la importancia de tener personal capacitado), el riesgo de intoxicación en los camarones por un aumento en los niveles de nutrientes y metales pesados en el agua (Samocha *et al.*, 2017).

Sistema inmunológico en camarones

Hablar del sistema inmune de camarones es un tema que requiere entender una serie de procesos que son totalmente distintos a los que se llevan a cabo durante los mecanismos de defensa de un organismo vertebrado. Una de sus características principales es la ausencia de anticuerpos y memoria inmunológica (Pascual *et al.*, 2006). Otra diferencia entre los camarones y los organismos vertebrados es la presencia de un sistema circulatorio abierto por donde circula la hemolinfa (análogo de la sangre en los vertebrados), la cual es responsable de transportar nutrientes, oxígeno, hormonas y componentes del sistema inmune (Almanza-Abud *et al.*, 2008). A través de la hemolinfa es posible identificar la presencia de células circulantes llamadas hemocitos, mismos que son producidos en el tejido hematopoyético (Battistella *et al.*, 1996), y que, de acuerdo con la presencia o ausencia de gránulos en su interior se clasifican en granulares, semi-granulares y hialinos (Martin & Graves, 1985).

El exoesqueleto y la mucosidad branquial e intestinal del camarón son la primera barrera de defensa que evitan la entrada de patógenos al interior del organismo, además de protegerlo de agentes externos que pudieran causar algún daño mecánico (Bachère *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando estas barreras logran ser penetradas, la respuesta inmune en su interior se activa. Uno de los mecanismos que participan en dicha respuesta es el sistema de coagulación, donde a través de la actividad de la enzima transglutaminasa (TGasa) se favorece la formación de coágulos (gelificación del plasma) para evitar la pérdida de hemolinfa o la entrada de patógenos a través de posibles heridas. Además, dichos coágulos ayudan a inmovilizar e inactivar bacterias para permitir que los efectores del sistema inmune almacenados en los hemocitos lleven a cabo su mecanismo de respuesta (Bachère *et al.*, 2004).

Entre dichos mecanismos de inmovilización e inactivación se incluye a la fagocitosis, en la cual se forman fagosomas o vesículas que envuelven al patógeno para que los hemocitos liberen los radicales libres que los degraden. Dichos radicales libres incluyen al oxígeno molecular (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxilos (OH^-) y oxígeno molecular (O_2) (Ji *et al.*, 2009). Aunque estos radicales tienen un efecto

microbicida altamente oxidante, pueden provocar daño a las células propias del camarón (Campa-Córdova *et al.*, 2005), por lo que estos cuentan con un sistema de defensa antioxidante llevado a cabo por las enzimas super óxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Durante la activación de este mecanismo de defensa, la SOD acelera la dismutación del O_2^- a O_2 y H_2O_2 ; sin embargo, el H_2O_2 es altamente dañino, por lo que la catalasa acelera la conversión de este radical a H_2O y O_2 (Holmblad & Söderhäll, 1999; Orbea *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2007). Al llevarse a cabo esta reacción, el sistema de defensa antioxidante puede prevenir un daño en los tejidos sanos del camarón (Tavares-Sánchez *et al.*, 2004).

Si el patógeno se encuentra en mayor cantidad y supera la capacidad fagocítica del organismo, los hemocitos se acumulan para formar cápsulas, las cuales evitan la diseminación del patógeno y lo mantienen aislado para liberar moléculas efectoras, logrando así su eliminación. No obstante, cuando la formación de estas cápsulas no es suficiente, los hemocitos continúan acumulándose y forman nódulos o quistes para conservar al microorganismo en aislamiento, lo cual a simple vista es observado a través de la presencia de zonas de melanización (manchas color café oscuro) en la zona afectada. Esta melanización es el producto final del sistema profenoloxidasa (proFO), considerado uno de los componentes más importantes de la respuesta inmune de los camarones (Cerenius & Söderhäll, 2004).

Para que se lleve a cabo el reconocimiento de los patógenos, el sistema inmune del camarón cuenta con Proteínas con Patrón de Reconocimiento Específico (PRPs) afines a fracciones específicas de la pared celular o Proteínas Moleculares Presentes Específicamente en los Microorganismos (PAMPs) de bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos (Janeway Jr & Medzhitov, 2002; Barracco *et al.*, 2014). Durante un proceso infeccioso causado por bacterias, el reconocimiento y la unión entre dichas proteínas y la bacteria provocan la activación de la respuesta inmune a nivel celular (fagocitosis, formación de nódulos, encapsulación) y humoral (respuestas enzimáticas llevadas a cabo por el sistema proFO. Este mecanismo de defensa está compuesto por una serie de procesos enzimáticos, donde la proFO es liberada de los hemocitos hacia el plasma, para que la Enzima Activadora de la profenoloxidasa (EAproFO) la active en

fenoloxidasa (FO). Ya en el plasma, la FO cataliza la oxidación de monofenoles a difenoles, y la oxidación de difenoles a quinonas (Gillespie *et al.*, 1997; Yu & Kanost, 2002), teniendo como producto final la formación de melanina, pigmento que inhibe la actividad de los patógenos a través de su oxidación, además de ayudar a la cicatrización de heridas a nivel del exoesqueleto (Johansson *et al.*, 2000).

En el caso de una enfermedad bacteriana, la melanina se une a la superficie de las bacterias, aumentando la adhesión de los hemocitos en éstas para favorecer la formación de nódulos que permitan contrarrestar la infección. Sin embargo, aunque el sistema proFO logre eliminar al patógeno en cuestión, el camarón debe tener la capacidad de detener dicha respuesta para evitar daños en células y tejidos sanos por acción de las enzimas que intervienen en esta reacción (Barracco *et al.*, 2014). Para ello, su sistema inmune cuenta con inhibidores de proteasas (Li *et al.*, 2013; Karunasagar *et al.*, 2014) que se encargan de atrapar estas enzimas mediante su unión con receptores específicos, para después formar vesículas que permitan su eliminación. Uno de los inhibidores de proteasas más importantes en camarón es la alfa-2 macroglobulina (α 2M), que además de tener un efecto inmunomodulatorio, también ha demostrado tener un papel importante sobre el sistema de coagulación del camarón, donde ayuda a prevenir la lisis de los coágulos por parte de las proteasas bacterianas producidas por *V. harveyi* (Chaikeeratisak *et al.*, 2012; Baucheun *et al.*, 2014).

Por otra parte, los mecanismos de acción microbicida llevados a cabo por el sistema inmune del camarón se relacionan con la presencia de péptidos antimicrobianos (PAMs), entre los que se incluyen a las peneidinas. Estas proteínas tienen la capacidad de desestabilizar la membrana celular de bacterias Gram positivas o de aglutinar a bacterias Gram negativas (*Vibrio* en particular) para facilitar el proceso de opsonización, fagocitosis y encapsulación del patógeno, llevando así a la eliminación del mismo (Bachère *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2004).

Inmunología y nutrición

El alimento es la manera en la cual los camarones reciben el aporte de nutrientes que requieren para su óptimo crecimiento. A través de su paso por el tracto digestivo, el alimento es degradado en componentes primarios, tales como aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos, vitaminas y minerales, mismos que pueden ser procesados, absorbidos o almacenados en los tejidos (Al-Mohanna & Nott, 1987; Lucas, 1993).

Uno de los nutrientes más importantes que el camarón recibe a través del alimento son las proteínas, las cuales son hidrolizadas en péptidos y finalmente en aminoácidos, mismos que pueden ser oxidados para la obtención de energía o ser destinados a diferentes rutas metabólicas, entre las que se incluyen la síntesis de glucógeno, de enzimas digestivas y de proteínas del sistema inmunológico (Pascual *et al.*, 2006). Entre las proteínas que conforman al sistema inmunológico se encuentran las del sistema proFO, lectinas, lipoproteínas de reconocimiento, proteínas de coagulación, péptidos antimicrobianos, reguladores de la respuesta inmune y la hemocianina (Bachere *et al.*, 1995; Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000; Adachi *et al.*, 2003). Por esta razón, cualquier deficiencia nutricional podría afectar la respuesta inmune del camarón, haciéndolo más propenso a diversos tipos de enfermedades (Sánchez *et al.*, 2001).

La evaluación de la condición nutricional e inmunológica es considerada una herramienta fundamental para determinar el buen estado de salud de los camarones cultivados (Merchie *et al.*, 1998; Bachere, 2000; López *et al.*, 2003). Diversos estudios se han enfocado en estudiar el efecto que tienen ambas condiciones sobre el camarón y en algunos casos se ha sugerido que las variaciones nutricionales que estos organismos pudieran llegar a presentar tienen repercusiones importantes sobre la cascada de reacciones inmunológicas del sistema proFO en machos adultos de *L. setiferus* (Sánchez *et al.*, 2001). Estas variaciones a nivel nutricional e inmunológico también han sido comprobadas, en este caso, por la exposición de los animales a temperaturas extremas (Pascual *et al.*, 2003).

Con base a la importancia que tiene el factor nutricional sobre el estado de salud de los camarones, la proteína que el BFT produce de manera natural a través de los microorganismos heterotróficos que en él se desarrollan (Magaña-Gallegos *et al.*, 2018) juega un papel importante en el óptimo estado de salud de dichos organismos. De ahí la importancia de proponer estudios como los que se describen en el presente trabajo de investigación.

Justificación

Uno de los principales problemas que enfrenta la producción de organismos acuáticos son las mortalidades causadas por factores relacionados a las malas condiciones medioambientales, el manejo deficiente en los cultivos y los brotes de enfermedades. Debido a lo anterior, el mantenimiento de la calidad del agua en los estanques, las buenas prácticas de manejo y el uso de alimentos de buena calidad son la base para la solución de dichas problemáticas.

Por ende, el presente trabajo de investigación busca aportar información con relación al efecto que los sistemas BFT tienen sobre el estado de salud de los camarones cultivados bajo estas condiciones, haciendo a estos más resistentes a las enfermedades que de manera constante afectan a la actividad acuícola. Para ello, se llevó a cabo un reto bacteriano con camarones cultivados previamente en BFT y agua clara, los cuales fueron inoculados con la bacteria *V. harveyi* CAIM 1792 y mantenidos en observación durante un periodo de 10 días.

Aunque ya existen algunos estudios y casos de éxito sobre el uso del BFT para prevenir enfermedades en acuicultura, la integración de las modificaciones que se producen metabólica, inmunológica y molecularmente ante la presencia de infecciones por vibrios patógenos ha sido poco abordada. Así, los resultados obtenidos en este estudio buscan demostrar que el BFT es una alternativa para evitar la introducción y propagación de enfermedades en los cultivos, previniendo además las pérdidas económicas que esta problemática genera para el sector acuícola a nivel mundial.

Hipótesis

Los camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados en BFT tendrán un sistema inmunológico más eficiente, por lo que su mecanismo de respuesta a posibles brotes infecciosos será más eficaz que el de camarones cultivados bajo condiciones de agua clara.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del BFT sobre el mejoramiento del estado de salud y tolerancia a enfermedades del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en comparación a los camarones cultivados bajo condiciones de agua clara.

Objetivos específicos:

- Identificar los mecanismos de respuesta inmune a nivel genético de camarones cultivados en BFT a diferentes densidades bacterianas de la cepa patógena *Vibrio harveyi* CAIM1792 (Capítulo 2).
- Evaluar el efecto inmunológico del BFT sobre juveniles de *Litopenaeus vannamei*, mediante una infección experimental con la cepa patógena *Vibrio harveyi* CAIM1792 (Capítulo 3).

CAPÍTULO 2

**Determinación de la carga
bacteriana de *V. harveyi* CAIM1792
para producir una respuesta inmune
eficiente en el camarón blanco del
Pacífico *Litopenaeus vannamei***

Materiales y métodos

- **Origen de los organismos**

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* del área de Engorda de camarón de la UMDI-Sisal, Facultad de Ciencias (Sisal, Yucatán, México) cultivados previamente en estanques circulares cubiertos de geomembrana (capacidad de 20,000 L y 1 m de profundidad), donde fueron mantenidos bajo condiciones de cultivo BFT durante un periodo de 3 meses. Se tuvo una densidad de siembra de 35 camarones/m², un recambio mínimo de agua, desarrollo de un medio heterotrófico (cianobacterias, protozoarios, nemátodos, rotíferos y copépodos), aireación constante, alimentación *ad libitum* con pellet comercial (35% de proteína cruda) (Malta Cleyton, Culiacán, Sinaloa, México) y fertilización orgánica con melaza (Emerenciano *et al.*, 2013a). Las variables medioambientales durante este periodo de cultivo se mantuvieron dentro de los rangos permisibles (OD= 5.17 mg L⁻¹; temperatura=27.8°C; pH=7.16; salinidad=38 ppm).

- **Diseño experimental**

Se tomaron 35 camarones (15.88±1.93 g) y se transportaron a un laboratorio de bioensayo (Mérida, Yucatán) donde fueron aclimatados durante un periodo de cinco días. Durante este tiempo, el agua de los camarones en BFT fue diluida de manera gradual hasta tener un agua clara sin la materia particulada y microbiota que caracterizan a este sistema de cultivo. De esta manera, se descartó el efecto de los componentes del BFT durante el reto bacteriano, observando solamente el desempeño de los camarones para responder por sí mismos ante el reto bacteriano por el efecto previo de la condición de cultivo de donde provenían. Las unidades experimentales (24 acuarios de plástico con capacidad de 3 L c/u) fueron llenadas con agua previamente esterilizada con luz UV y desinfectada con cloro, manteniéndola aireada permanentemente y a una temperatura promedio de 28°C, con recambio del 5% al día y con un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Posteriormente, 24 camarones en estadio de intermuda (Corteel *et al.*, 2012) fueron colocados de manera individual en los acuarios, donde fueron aclimatados durante tres días para observar su estado de salud. El alimento fue removido 24 horas previas al reto bacteriano (RB) para mantener

a los camarones en ayuno y evitar el crecimiento de bacterias por el aumento de materia orgánica en el agua (Saulnier *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013).

- **Signos de enfermedad observados antes y durante el reto bacteriano**

Durante el periodo de aclimatación, los camarones fueron monitoreados para observar su condición de salud (Día 0). Dicha condición fue relacionada con la coloración normal, estructura de los apéndices, comportamiento, ausencia de muda y de mortalidades de los camarones en cada acuario. Durante el reto bacteriano, los camarones continuaron siendo monitoreados para detectar lesiones y mortalidades por el efecto de la cepa patógena de *Vibrio* utilizada durante el RB, mismas que fueron evidenciadas de acuerdo con la metodología reportada por Bonami *et al.* (1997). De acuerdo con su grado de severidad (G), las lesiones observadas fueron clasificadas de G0 a G4, donde: G0=ausencia de daño; G1=poco daño, menos severo; G2=daño moderado, severo; G3=daño moderado a severo, muy severo; y G4=daño severo, letal (Lightner, 1996).

- **Preparación del inóculo bacteriano**

Se utilizó *V. harveyi* cepa CAIM1792, la cual fue adquirida en el CIAD - Unidad Mazatlán, donde fue aislada entre los años 2005-2008 a partir de lesiones presentes en *L. vannamei* infectados con el síndrome de los rojos vivos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2010). Una alícuota de la cepa fue sembrada en 10 mL de Caldo Tripticasa Soya (TSB) + 2.5% NaCl (MDA-LAB®, Tlalnepantla, Estado de México, México) y se incubó durante 24 horas a 30°C. Se ajustó la densidad óptica del caldo bacteriano hasta obtener un valor de absorbancia de 0.1 a 625 nm (GENESYS 100V®, Thermo Scientific Inc, Maltham, MA, EUA), equivalente a 0.5 McFarland (10^8 UFC mL⁻¹). A continuación, se hicieron diluciones seriadas hasta obtener diferentes alícuotas con una densidad de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC mL⁻¹. Cada dilución fue sembrada en TCBS para estimar la densidad de siembra utilizada para el RB. Para confirmar la pureza de la cepa, se hizo su caracterización fenotípica y perfil fisiológico (ANEXO 1).

- **Reto bacteriano**

Los camarones fueron inoculados en el tercer segmento abdominal con 100 μL de inóculo bacteriano (INOC) a una densidad bacteriana de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 UFC mL^{-1} . Otro grupo de camarones fueron utilizados como control e inoculados con 100 μL de TSB estéril + NaCl al 2.5%. De acuerdo con la metodología propuesta por Wang *et al.* (2014), se utilizaron 4 camarones por tratamiento (Figura 1). Después de 10 días del RB, se tomaron muestras de músculo de las réplicas de cada tratamiento para analizar la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.

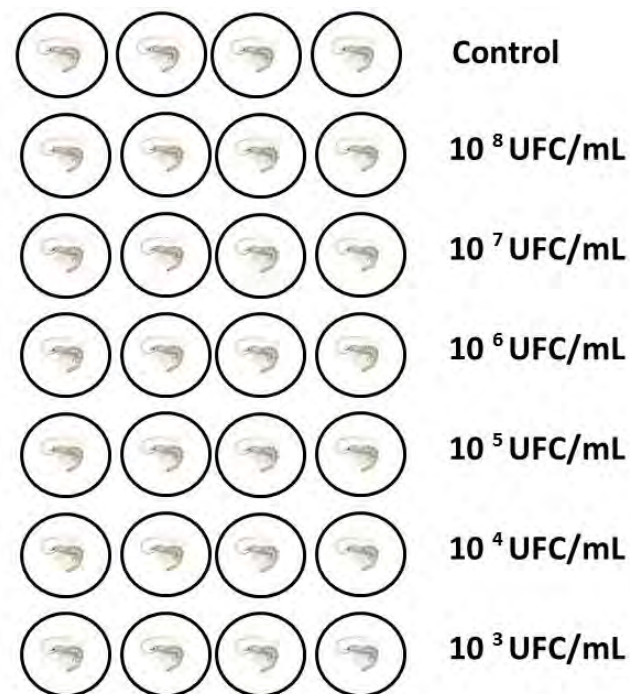


FIGURA 1. Distribución de los organismos *L. vannamei* previamente cultivados en BFT e inoculados con *V. harveyi* CAIM1792.

- **Calidad de agua**

Todos los acuarios utilizados en el RB fueron colocados en un baño maría con un calentador ajustado a 27°C para mantener el agua del interior de cada acuario a una temperatura similar. La aireación en cada acuario fue implementada con piedras aireadoras. La temperatura y oxígeno disuelto (OD) fueron monitoreados utilizando un multiparámetro (YSI mod. PRO20, Yellow Spings, Ohio, EUA) y mantenidas en valores aproximados de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y $6.29\text{-}6.54$ mg L^{-1} , respectivamente. La salinidad fue determinada con ayuda de un refractómetro (MASTER-S/Mill α , ATAGO, Washington,

EUA) y mantenida a 35 ppm, mientras que el pH fue medido utilizando un kit comercial (pH test kit BlueDevil[®], Mission Hills, CA, EUA), manteniendo un valor constante de 7.4. El NO₂ y TAN fueron determinados de acuerdo con Hernández-López & Vargas-Albores, 2003) y mantenidos en valores aproximados de 0.04-0.06 mg L⁻¹ and 0.36-0.38 mg L⁻¹, respectivamente.

- **Medidas de bioseguridad**

Las redes, mangueras, jeringas y material utilizados fueron lavados y desinfectados con cloro, en una concentración de 300 g L⁻¹ durante 30 minutos. El material de desecho procedente de las tinas fue depositado en un contenedor de 20 L y sometido a un tratamiento con cloro durante 24 horas, para posteriormente ser eliminado. Los restos de organismos muertos fueron incinerados por servicio externo en el Laboratorio Central Regional de Mérida (Mérida, Yucatán), perteneciente a SAGARPA.

- **Toma de muestras**

Se colectaron muestras de músculo que fueron preservadas y almacenadas a -80°C en una solución estabilizadora de ARN (RNAlater[®], Sigma-Aldrich, R0901) para el posterior análisis de expresión de los genes *hemocianina (Hc)*, *alfa2-macroglobulina (a2M)*, *profenoloxidasas (proFO)* y *peneidina-3a (pen3a)* relacionados con la respuesta inmune de camarones.

- **Aislamiento de ARN y obtención de cDNA complementario**

Se utilizaron 100 mg de músculo conservado en RNAlater[®] para la extracción de ARN (ANEXO 2), el cual fue cuantificado a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop[®] (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) y posteriormente tratado con DNasa I libre de RNasa[®] (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) para eliminar posible contaminación por ADN. El cDNA fue generado a un volumen de reacción de 10 µL compuesto por 4 µg de ARN, buffer RT 10X, dNTP Mix 25X (10 mM), Primers Random RT 10X y transcriptasa reversa (Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich[®], Spruce St Louis, MO, EUA). La reacción fue hecha a 37°C durante 80 minutos.

- **qPCR de genes de respuesta inmune**

La expresión de mRNA de los genes *a2M*, *proFO*, *Hc* y *pen3a* fue medida por qPCR. Con base a los datos de cDNA publicados para *L. vannamei*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen a analizar (Tabla 1), utilizando el software OligoPerfect® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA), pues los oligonucleótidos reportados previamente por otros autores (Wang *et al.*, 2007) no amplificaron los productos de PCR. Todos los oligonucleótidos diseñados fueron elaborados por Sigma-Aldrich® (Toluca, México).

| Gen | Secuencia Forward/Reverse | Tamaño (pb) |
|--------------|--|-------------|
| <i>a2M</i> | 5'-GTTTCCATCACCGCCTCA-3' 5'-ACCTTATCCTGCGGTGCCA-3' | 227 |
| <i>proFO</i> | 5'-ACCGTACAAGGAAGAGGAAC-3' 5'-TCTCGCAGGTCGTTGTTGAT-3' | 222 |
| <i>Hc</i> | 5'-GTCTTAGTGGTTCTTGGGCTTGTC-3' 5'-GGTCTCCGTCCTGAATGTCTCC-3' | 124 |
| <i>pen3a</i> | 5'-CTGGTCTTCTTGCCTCCTT-3' 5'-ATATCCCTTTCCACGTGAC-3' | 121 |

TABLA 1. Secuencias de nucleótidos utilizadas para amplificar los genes *a2M*, *proFO*, *Hc* y *pen3a* de *L. vannamei* por qPCR.

La reacción de qPCR fue hecha en un termociclador fluorométrico IQ5 (BIO-RAD®, Philadelphia, PA, EUA), utilizando SYBR Green Supermix (BIO-RAD®, Filadelfia, PA, EUA). La amplificación fue llevada a cabo en placas de 96 pozos con un volumen de reacción de 15 µL, el cual se conformó por 7.5 µL de IQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad, Hércules, California, EUA), 0.5 µL de cada juego de oligonucleótidos, 4.5 µL de agua libre de pirógenos y 2 µL de cDNA. El perfil térmico del qPCR se programó a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (40 ciclos para el primer de *Hc*) de 95°C por 30 segundos y 60°C por 30 segundos.

Para cada oligonucleótido se incluyó un control negativo, omitiendo la adición de cDNA. Las curvas de disociación (Figura 2) y eficiencia (Figura 3) para cada gen fueron preparadas utilizando cDNA específico para *L. vannamei* a una concentración de cDNA conocida (1 µg µL⁻¹), a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas 1:5 (1, 0.2, 0.04, 0.008

y $0.0016 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) para los genes β -actina, α 2-M, *proFO* y *pen3a*; y 1:2 (1, 0.5, 0.25, 0.125 y $0.0625 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) para el gen *Hc*. Cada muestra fue analizada por duplicado, utilizando el gen β -actina como control interno (Wang et al., 2007).

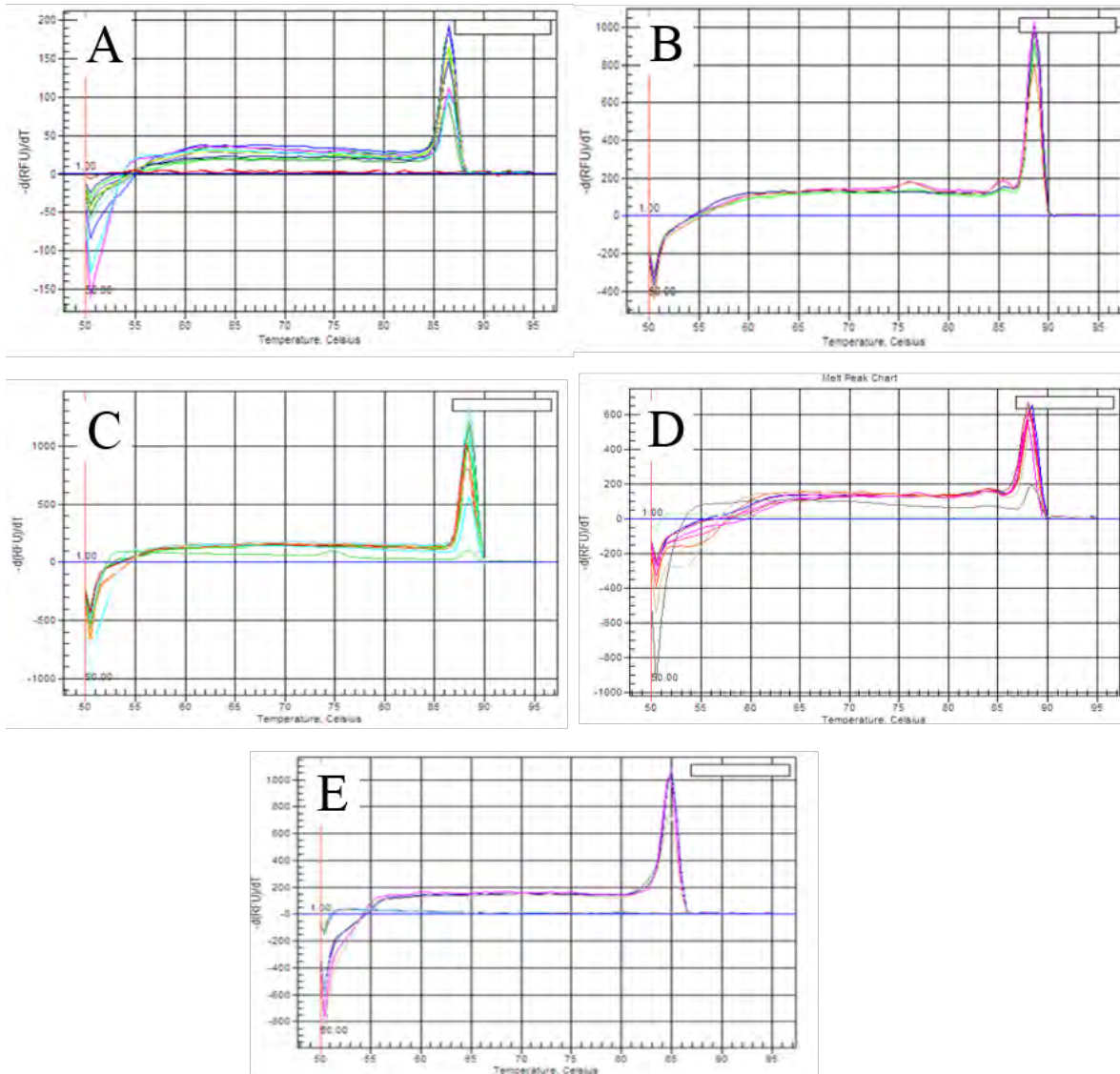


FIGURA 2. Análisis de las curvas de disociación de los genes β -actina (A), α 2M (B), *proFO* (C), *pen3a* (D) y *Hc* (E) de *L. vannamei* por qPCR.

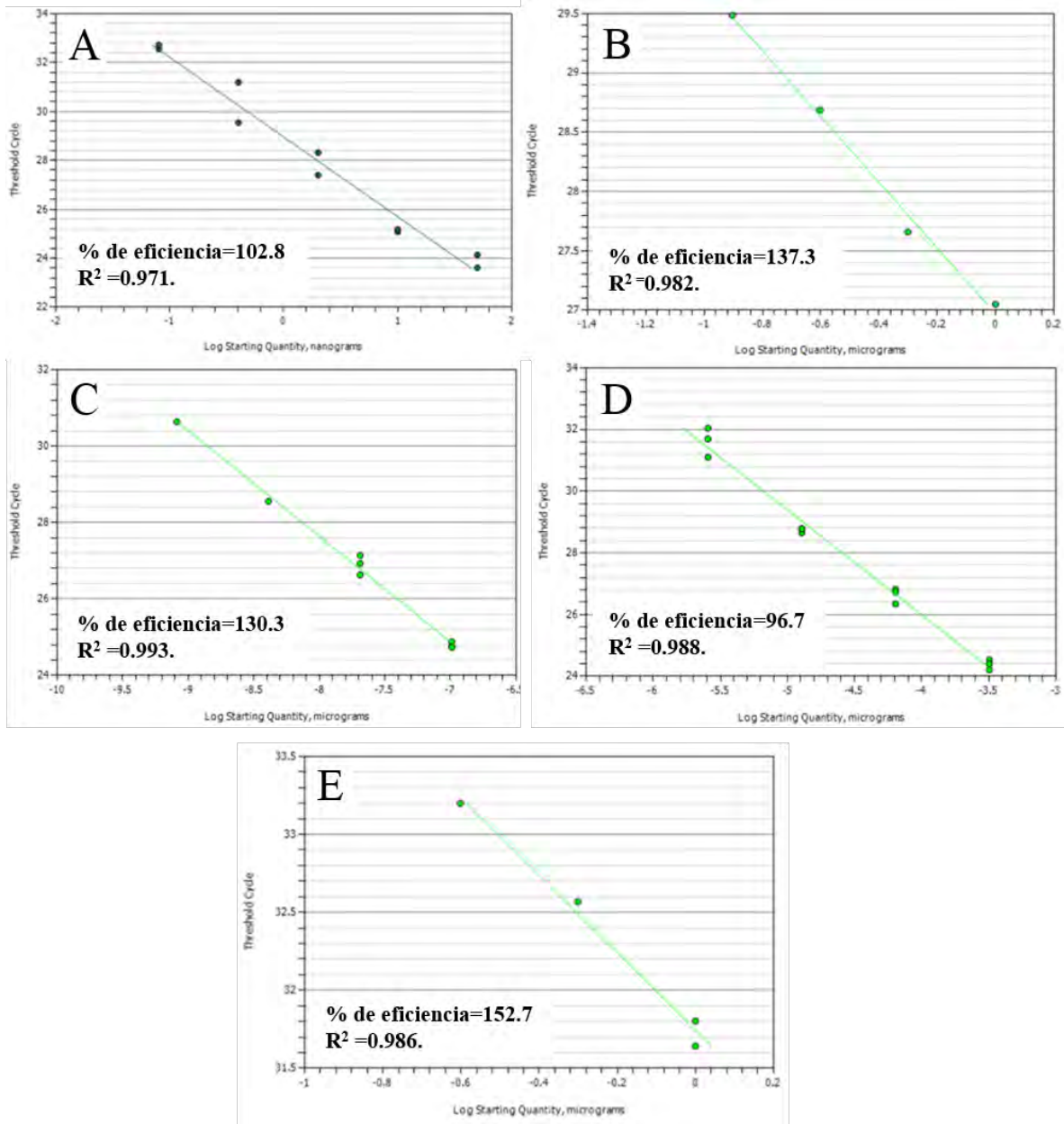


FIGURA 3. Análisis de las curvas de eficiencia de los genes β -actina (A), a2M (B), proFO (C), pen3a (D) y Hc (E) de *L. vannamei* por qPCR.

La expresión relativa de cada gen analizado fue calculada con la fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$, donde Ct es el valor correspondiente al número del ciclo en el cual se generó la fluorescencia. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gen\ de\ referencia}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{promedio\ de\ los\ controles\ del\ tratamiento\ a\ analizar}$$

- **Supervivencia**

Durante los 10 días del estudio se registró el número de mortalidades presentadas en cada tratamiento. El porcentaje de supervivencia se determinó a partir de la diferencia entre los organismos sembrados al inicio y al final del experimento:

$$\% \text{ Supervivencia} = \left(\frac{\text{Número final}}{\text{Número inicial}} \right) \times 100$$

- **Análisis estadístico**

La expresión relativa de los genes fue evaluada utilizando análisis multivariado. Una vez que los datos obtenidos fueron normalizados, se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para visualizar la contribución de los cuatro genes evaluados en los grupos subyacentes por efecto de las diferentes densidades bacterianas. Se utilizó una ANOVA multivariado de una vía para confirmar la hipótesis de diferencias significativas entre tratamientos, esto con base en permutaciones (PERMANOVA). El valor de p fue estimado después de 9999 permutaciones. Se utilizó una prueba de *t* con corrección de Bonferroni con un valor de $\alpha = 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron hechos con PRIMER-e v. 7 + PERMANOVA *add-on* (Clarke & Gorley, 2015). Se generaron gráficas de promedios y desviación estándar para visualizar el comportamiento de cada tratamiento utilizando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2017).

Resultados

- **Signos de enfermedad observados antes y durante el reto bacteriano**

La observación de coloración típica en el cuerpo y hepatopáncreas, comportamiento normal y apéndices completos confirmaron el estado de salud óptimo de los camarones de cada tratamiento antes del RB (Día 0) (Tabla 2). Sin embargo, a partir del Día 3 y 4 del RB se observaron signos de enfermedad en los camarones inoculados con 10^8 y 10^7 UFC mg L⁻¹ de *V. harveyi*. Entre las lesiones observadas se identificaron camarones con letargia, melanización, expansión de cromatóforos, zonas del músculo con palidez y necrosis en urópodos y músculo (principalmente en la porción donde la bacteria fue inoculada), todas ellas con diferentes grados de severidad (G1, G2 y G3) (Figura 4, Tabla 2). En el día 9 del RB se observaron algunos camarones con letargia pertenecientes al tratamiento 10^6 (Tabla 3).

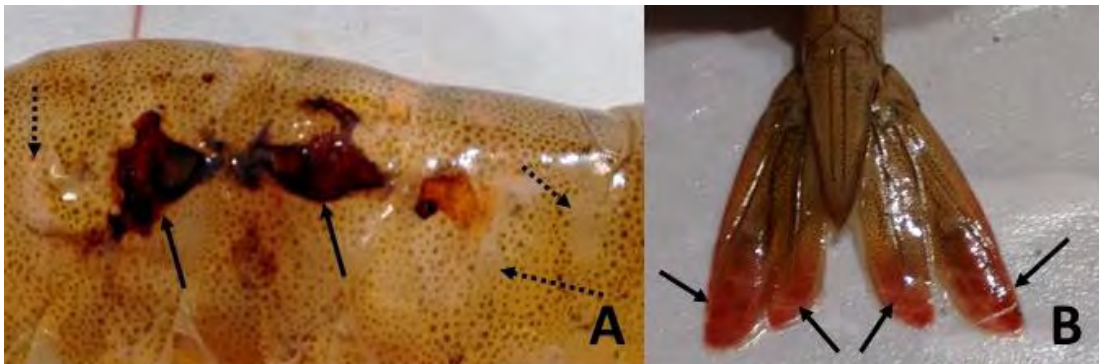


FIGURA 4. Signos observados durante el tiempo de exposición de *L. vannamei* en los tratamientos 10^7 y 10^8 UFC mL⁻¹ de *V. harveyi* CAIM1792. (A) Melanización con necrosis (flechas continuas) y coloración pálida en músculo (flechas discontinuas) con expansión de cromatóforos; (B) coloración rojiza y necrosis en urópodos.

| Densidad bacteriana | Días de observación | | | | | | | | | | | Número total de camarones con lesiones | | |
|---------------------|---------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--|---------------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | | |
| Control | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 | |
| 10 ³ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 | |
| 10 ⁴ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 | |
| 10 ⁵ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 | |
| 10 ⁶ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 1 / 6 (G1) | 2 / 6 (G1) | 2 / 6 | |
| 10 ⁷ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 1 / 6 (G1) | 2 / 6 (G1) | 3 / 6 (G1) | 3 / 6 (G1) | 2 / 6 (G1) | 2 / 6 (G2) | 2 / 6 (G2) | 4 / 6 (G3) | 6 / 6 |
| 10 ⁸ | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 1 / 6 (G1) | 1 / 6 (G1) | 2 / 6 (G2) | 2 / 6 (G2) | 3 / 6 (G2) | 4 / 6 (G2) | 2 / 6 (G2) | 2 / 6 (G3) | 4 / 6 (G3) | 5 / 6 (G3) | 6 / 6 |

TABLA 2. Días de observación de juveniles *L. vannamei* no inoculados (Control) e inoculados con la cepa *V. harveyi* CAIM1792 a diferentes densidades (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ CFU), los cuales presentaron lesiones en el cuerpo con diferentes grados de severidad. La severidad de las lesiones fue clasificada de acuerdo con la siguiente escala: G0= sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; y G4=lesiones severas, letal (Lightner, 1996).

- **Expresión de genes de respuesta inmune por qPCR**

Los valores obtenidos en el Componente Principal 1 (CP1) y el CP2 (76.3% de la varianza total) mostraron un efecto de las diferentes densidades bacterianas de *V. harveyi* sobre el aumento o disminución de la expresión de los genes *proFO*, *Hc*, *pen3a* y *a2M* (Figura 5). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (PERMANOVA, pseudo-*F* = 20.77, *gl*_{num} = 6, *gl*_{den} = 19, *p* < 0.05).

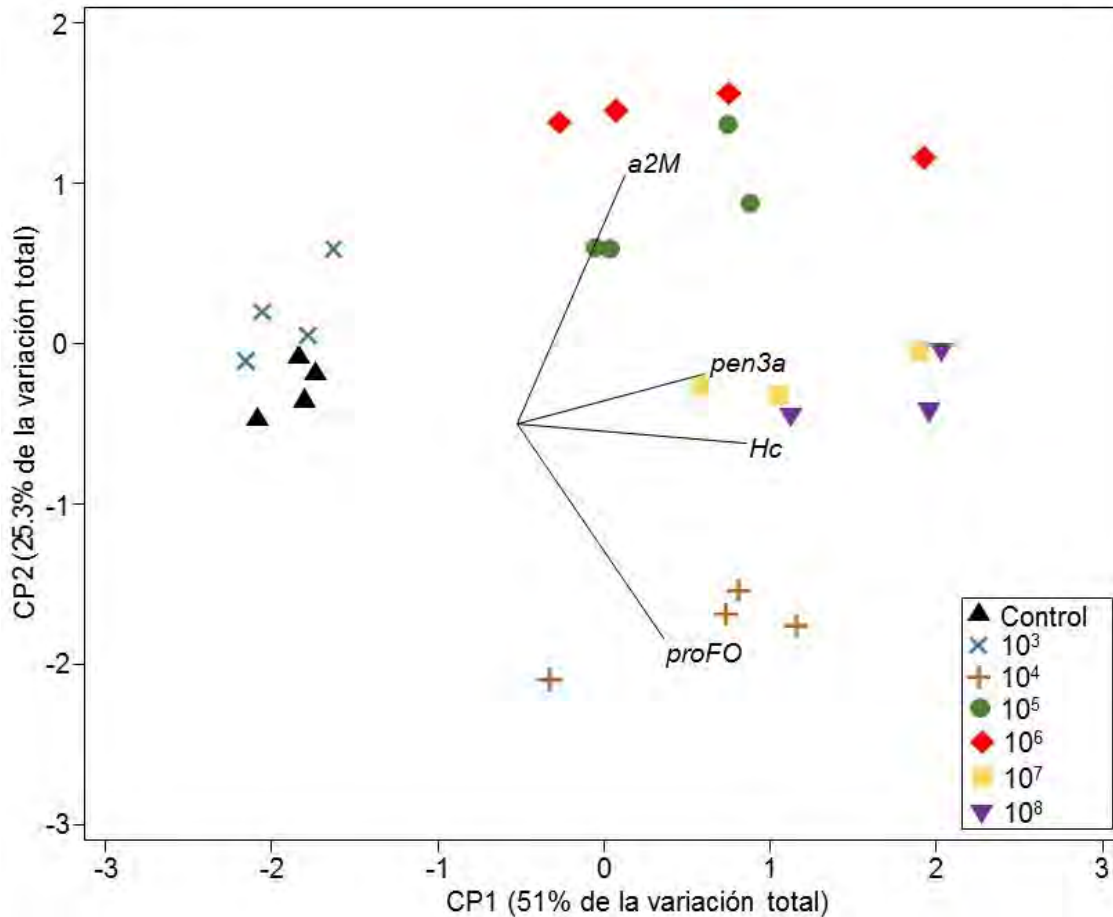
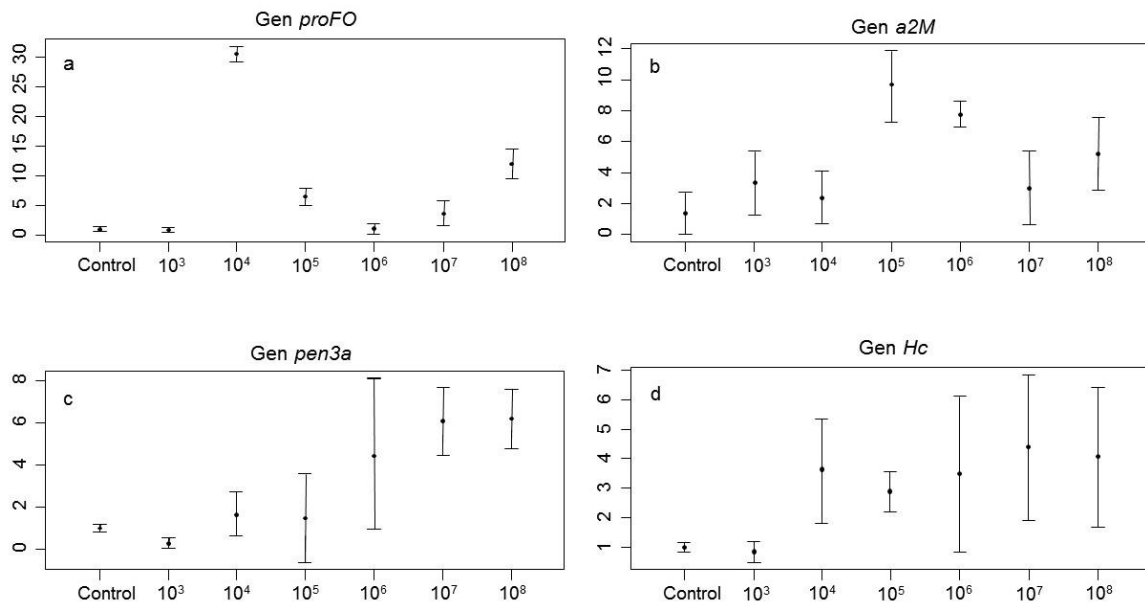


FIGURA 5. PCA de la expresión relativa de los genes *Hc*, *a2-M*, *proFO* y *pen3a* en *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC mL⁻¹).

Para el grupo Control y el tratamiento 10^3 , la prueba de comparación no detectó diferencias significativas en ninguno de los genes evaluados en el presente estudio, a pesar de la pequeña diferencia representada en el CP2 (Figura 5, Tabla 3, Gráfica 1). Por otro lado, la expresión del gen *proFO* fue afectada solamente con la densidad bacteriana de 10^4 (Tabla 4, Gráfica 1), mientras que en los tratamientos 10^5 y 10^6 se observó un alto número de transcritos del gen *a2M* (Gráfica 1). Finalmente, los transcritos de los genes *pen3a* y *Hc* observados en el estudio, se relacionaron a los tratamientos 10^7 y 10^8 (Gráfica 1). Después de la prueba de *t* con corrección de Bonferroni, no se encontraron diferencias significativas entre las densidades bacterianas de 10^5 , 10^6 , 10^7 y 10^8 (Tabla 4).



GRÁFICA 1. Promedio \pm Desviación estándar obtenidas para la expresión relativa de los genes *proFO* (a), *a2M* (b), *pen3a* (c) y *Hc* (d) en *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ UFC mL⁻¹).

| Tratamiento | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-----------------|---------|---------|---------|
| Control | * | | |
| 10 ³ | * | | |
| 10 ⁴ | | * | |
| 10 ⁵ | | | * |
| 10 ⁶ | | | * |
| 10 ⁷ | | | * |
| 10 ⁸ | | | * |

TABLA 3. Grupos homogéneos usando la prueba de *t* con corrección de Bonferroni para la expresión relativa de los genes relacionados con respuesta inmune (*proFO*, *a2M*, *pen3a* y *Hc*) en juveniles de *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ CFU mL⁻¹).

- **Supervivencia**

Solamente se observaron mortalidades en los camarones de los tratamientos 10⁷ y 10⁸ UFC (tasa de supervivencia =75%). En el primer caso, la primera mortalidad se obtuvo en el día 7, mientras que para el segundo caso las mortalidades se presentaron a partir del día 5. El resto de los camarones que sobrevivieron en ambos tratamientos se encontraron moribundos (Tabla 5). Los tratamientos restantes no evidenciaron mortalidades (tasa de supervivencia=100%) (Tabla 4).

| Densidad bacteriana | Mortalidad diaria | | | | | | | | | | | Tasa de supervivencia (%) a los 10 días | |
|---------------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10 ³ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10 ⁴ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10 ⁵ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10 ⁶ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 10 ⁷ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | | 75 |
| 10 ⁸ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | | 75 |

TABLA 4. Mortalidad diaria en juveniles de *L. vannamei* no infectados (Control) e infectados con *V. harveyi* CAIM1792 (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸ CFU).

Discusión

Durante este estudio se elaboró un PCA para identificar discrepancias entre los tratamientos y la expresión de genes analizados (*proFO*, *Hc*, *pen3a* y *a2M*) y se demostró que la ausencia de bacteria (grupo Control) o la mínima cantidad de ésta (10^3 UFC) no produjo una sobreestimulación de ninguno de los genes evaluados en ambos tratamientos. Sin embargo, la tendencia en el aumento de la expresión relativa de los genes cuando la cantidad de inóculo bacteriano fue mayor, confirma la idea de que los mecanismos de respuesta inmune de los camarones cultivados en BFT tienen un umbral de respuesta, el cual en ocasiones es más eficiente para prevenir enfermedades. Una vez que este umbral es rebasado, la presencia de enfermedades y mortalidades es observada, sin importar la respuesta inmune que se haya activado para atacar al patógeno.

Para el reto bacteriano llevado a cabo en este estudio se eligió una cepa del género *Vibrio* porque su efecto patógeno y virulento produce brotes de enfermedades y mortalidades de importancia en la acuicultura mundial. En estudios previos se hizo la caracterización de ECPs producidos por la cepa de *V. harveyi* CAIM1792 y se determinó que su actividad proteolítica y citotóxica fueron sus factores más virulentos (Soto-Rodríguez et al., 2012). Esta actividad proteolítica está relacionada con la producción de serín proteasas (Soto-Rodríguez et al., 2010), las cuales son responsables del daño producido a nivel histológico y en la superficie del exoesqueleto (Cipriani et al., 1980; Harris & Owens, 1999). Por esta razón, el daño observado en el tejido hepatopancreático (datos mostrados en el Capítulo 3), la melanización y necrosis de la cutícula (este estudio) de los camarones inoculados con la densidad bacteriana más alta, fueron consecuencia del efecto de los ECPs producidos por la cepa utilizada en el reto bacteriano.

En retos bacterianos con cepas de *V. harveyi* reportados en otros estudios, la densidad que produjo un efecto patógeno bajo condiciones de cultivo tradicional fue de 10^2 a 10^7 para *P. monodon* (Karunasagar et al., 1994; Lavilla-Pitogo et al., 1998; Le Groumellec et al., 1995; Liu et al., 1996; Prayitno & Latchford, 1995) y de 10^6 a 10^7 para *L. vannamei* (Robertson et al., 1998). Mientras tanto, en este estudio, los valores de

densidad en los cuales la cepa patógena utilizada causó un efecto patógeno importante bajo condiciones previas de cultivo BFT estuvieron entre 10^7 y 10^8 UFC. En dichas densidades, la aparición de signos fue en un tiempo de exposición relativamente corto (Día 7 y 5, respectivamente), mientras que con la densidad de 10^6 la signología de la enfermedad se manifestó de forma paulatina en la fase final del reto bacteriano (Día 9).

Existen estudios que se han centrado en comprender el efecto del BFT sobre el estado de salud de los organismos acuáticos y todos ellos han demostrado que este sistema de cultivo es capaz de prevenir mortalidades por el efecto protector que tiene sobre los camarones durante alteraciones medioambientales (Cardona *et al.*, 2015), brotes de enfermedades (Bachère *et al.*, 2004; Vogan *et al.*, 2002) o durante condiciones normales de crecimiento (Kim *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016). El consorcio de microorganismos que se desarrollan de manera natural en el BFT está relacionado con la presencia de compuestos activos (carotenoides, vitaminas, minerales, proteínas, lípidos y antioxidantes) que no solamente tienen un efecto nutricional en los camarones, sino que también participan como moduladores de la respuesta inmune (Cardona *et al.*, 2015). Además, el control en el aumento de la densidad de bacterias con posible potencial patógeno a través de la inhibición del *quorum sensing*, previniendo así la expresión de factores de virulencia producidos por dichos patógenos (Crab *et al.*, 2010b; De Schryver *et al.*, 2008).

El estudio de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune en un proceso infeccioso y bajo condiciones naturales o experimentales con virus o bacterias permite evaluar los mecanismos de defensa contra enfermedades en camarones. A pesar de que los altos niveles de expresión de estos genes son mayores en muestras tomadas de hepatopáncreas y hemocianina (Deepika *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010), se ha demostrado que otros tejidos también pueden ser utilizados para evaluar esta expresión, ya que los camarones presentan un sistema circulatorio abierto que permite la filtración y adhesión entre los hemocitos y los tejidos (Burge *et al.*, 2007; Gai *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2012), especialmente por la migración de estas células durante un proceso infeccioso (Shanthi & Vaseeharan, 2012). Los tejidos que pueden llegar a presentar transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune son pleópodos, intestino, branquias, músculo, órgano linfoide y ovario (Gai *et al.*, 2008;

Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2014), lo cual confirma que, para el presente estudio, fue correcto seleccionar al tejido muscular para el análisis de la expresión de genes de sistema inmune.

Aunque no hay un modelo o esquema de clasificación de los mecanismos de respuesta inmune en crustáceos (Muñoz *et al.*, 2002), los efectores relacionados con esta respuesta son activados para inhibir el daño producido por las proteasas sintetizadas por los patógenos (Baucheun *et al.*, 2014). Uno de los efectores activados durante una infección natural o experimental es el sistema proFO (Vogan *et al.*, 2002). Durante este estudio, los niveles de expresión del gen proFO tuvieron un patrón de aumento cuando el inóculo bacteriano aumentaba, observado así el mayor número de transcritos de este gen a una densidad de 10^4 . Este resultado indica que, durante la primera fase de una infección bacteriana (con un nivel bajo de patógeno), el mecanismo de respuesta inmune que responde a este estímulo está relacionado con el reconocimiento de patógenos, la síntesis de melanina y el proceso de cicatrización de heridas (Bachère *et al.*, 2004; Rodriguez & Le Moullac & Haffner, 2000).

Una vez que el patógeno es removido del sistema y que la infección es controlada, los inhibidores de proteasas detienen la actividad del sistema proFO a través del entrapamiento de la EAprFO, previniendo así la activación de la proFO (Tassanakajon *et al.*, 2012). Aunque en el presente estudio no se hizo la determinación de proFO y a2M a nivel molecular, si fue posible observar una relación inversa de ambas moléculas a nivel génico en los tratamientos expuestos a las densidades de 10^5 y 10^6 UFC, ya que mientras los transcritos de *proFO* disminuyeron, los de *a2M* aumentaron. La efectividad del gen *a2M* en ambas densidades bacterianas pudo haber tenido un beneficio en la condición de salud de los camarones, lo cual fue demostrado a través de la ausencia de signos de enfermedad y mortalidades durante el reto bacteriano. Estos resultados confirman estudios previos con *P. monodon*, donde los altos niveles de transcritos del gen *a2M* estuvieron relacionados con el encapsulamiento de bacterias dado por la formación de coágulos, además de evitar la fibrinólisis de éstos por efecto de *V. harveyi*, previniendo así la diseminación de la bacteria en el organismo (Karunasagar *et al.*, 1994).

Es interesante mencionar que, durante el análisis llevado a cabo con el PCA, el CP1 (51% de la variación total) fue explicado por los genes *Hc* y *pen3a*, los cuales tuvieron un alto número de transcritos en los tratamientos 10^7 y 10^8 . A pesar de ello, los camarones de ambos tratamientos presentaron signos de enfermedad y mortalidades, pues la cantidad de inóculo bacteriano fue mayor que la capacidad de la respuesta inmune para contrarrestar la infección. El alto nivel de expresión relativa del gen *Hc* pudiera estar relacionado con la proteína microbiana producida de manera natural en el BFT (Crab *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2009; Xu & Pan, 2013; Correia *et al.*, 2014). Además, en su forma molecular, esta hemoproteína está relacionada con la producción de melanina (con efecto microbicida contra patógenos), en la aceleración del proceso de esclerotización de la cutícula para proteger al animal contra depredadores y patógenos (Decker & Rimke, 1998) y en la inhibición del crecimiento de virus, bacterias y hongos (Lee *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2014).

Por otro lado, la *pen3a* es activada como parte de la segunda fase de la respuesta inmunológica del camarón durante un evento infeccioso (Muñoz *et al.*, 2002; de Lorgeril *et al.*, 2008) y aunque su actividad no tiene un efecto importante contra bacterias Gram negativas (incluyendo *Vibrio*), se ha visto que pueden participar en la eliminación de dichas bacterias a través del proceso de fagocitosis (Barracco *et al.*, 2014). En ambos casos, la alta transcripción de ambos genes no tuvo un efecto positivo sobre la respuesta inmunológica que permitiera contrarrestar la infección.

Conclusiones

En este capítulo fue posible establecer que la densidad bacteriana de 10^6 UFC permite observar el efecto gradual de la cepa *V. harveyi* CAIM1792 sobre el estado de salud de los camarones sin producir mortalidades masivas y espontáneas, tal y como sucedió con las densidades de 10^7 y 10^8 UFC. Con base a los resultados obtenidos fue posible comparar en el siguiente capítulo de este trabajo de investigación el efecto que la cepa de *V. harveyi* produce sobre diferentes indicadores metabólicos, inmunológicos y génicos evaluados en camarones previamente cultivados en BFT y agua clara.

De manera adicional, fue posible observar que, de acuerdo con la densidad bacteriana a la cual los camarones previamente cultivados en BFT son expuestos, su respuesta inmune reacciona de diversas formas para contrarrestar el efecto que el patógeno pudiera producir sobre su estado de salud. No obstante, la eficiencia de los mecanismos de respuesta inmune puede disminuir cuando la densidad de inóculo bacteriano supera valores de 10^7 o 10^8 UFC.

CAPÍTULO 3

**Respuesta inmune del camarón
blanco del Pacífico *Litopenaeus*
vannamei previamente cultivado en
BFT y agua clara y posteriormente
infectado con *Vibrio harveyi***

Materiales y métodos

- **Origen de los organismos**

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* del área de Engorda de camarón de la UMDI-Sisal, Facultad de Ciencias (Sisal, Yucatán, México) cultivados en estanques circulares cubiertos de geomembrana (capacidad de 20,000 L y 1 m de profundidad) bajo dos condiciones: BFT y agua clara (AC), durante un periodo de cuatro meses. En el BFT se mantuvo una densidad de siembra de 35 camarones /m² (peso inicial de 8.48 g, tasa de crecimiento semanal de 1.94 g), recambio mínimo de agua para reponer el volumen perdido por efecto de la evaporación, aireación constante, alimentación *ad libitum* con alimento comercial (35% de proteína cruda) (Malta Cleyton, Culiacán, Sinaloa, México) y fertilización con melaza (Emerenciano et al., 2013b) para favorecer el desarrollo de un medio heterotrófico (cianobacterias, protozoarios, nemátodos, rotíferos y copépodos). Las variables medioambientales durante este periodo de cultivo se mantuvieron dentro de los rangos permisibles (OD= 5.50 mg L⁻¹; temperatura=26.7°C; pH=7.33; salinidad=38 ppm).

En el cultivo de AC se mantuvo una densidad de siembra de 25 camarones / m² (peso inicial de 7.64 g, tasa de crecimiento semanal de 1.17 g), un recambio diario de agua de ~25%, y el mismo esquema de alimentación que en el cultivo de BFT. Las variables medioambientales durante este periodo de cultivo también se mantuvieron dentro de los rangos permisibles (OD= 5.90 mg L⁻¹; temperatura=26.8°C; pH=7.83; salinidad=37 ppm).

- **Diseño experimental**

Se tomaron 35 camarones previamente cultivados en BFT (20.17±0.27 g) y AC (19.34±1.85 g) y se transportaron a un laboratorio de bioensayo (Mérida, Yucatán), donde fueron aclimatados durante un periodo de cinco días. Durante este tiempo, el agua de los camarones en BFT fue diluida de manera gradual hasta tener un agua clara sin la materia particulada y microbiota que caracterizan a este sistema de cultivo. De esta manera, se descartó el efecto de los componentes del BFT durante el reto

bacteriano, observando solamente el desempeño de los camarones para responder por sí mismos ante el reto bacteriano por el efecto previo de la condición de cultivo de donde provenían. Las unidades experimentales (24 acuarios de plástico con capacidad de 3 L c/u) fueron llenadas con agua previamente esterilizada con luz UV y desinfectada con cloro, manteniéndola aireada permanentemente, con una temperatura promedio de 28°C, recambio del 5% diario y con un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Posteriormente, 12 camarones en estadio de intermuda (Corteel *et al.*, 2012) fueron colocados de manera individual en los acuarios donde fueron aclimatados durante tres días. 24 horas antes del reto bacteriano (RB), el alimento fue removido para mantener a los camarones en ayuno y evitar el crecimiento de bacterias por el aumento de materia orgánica en el agua (Saulnier *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013).

- **Signos de enfermedad observados antes y durante el reto bacteriano**

Durante el periodo de aclimatación, los camarones fueron monitoreados para observar su condición de salud (Día 0). Dicha condición fue relacionada con la coloración normal, estructura de los apéndices, comportamiento, ausencia de muda y de mortalidades de los camarones en cada acuario. Durante el reto bacteriano, los camarones continuaron siendo monitoreados para detectar lesiones y mortalidades por el efecto de la cepa patógena de *Vibrio* utilizada durante el RB. Las lesiones fueron documentadas de acuerdo con la metodología propuesta por Bonami *et al.* (1997). El grado de severidad de las lesiones observadas fueron clasificadas de G0 a G4, donde: G0=ausencia de daño; G1=poco daño, menos severo; G2=daño moderado, severo; G3=daño moderado a severo, muy severo; y G4=daño severo, letal (Lightner, 1996).

- **Preparación del inóculo bacteriano**

Para el reto bacteriano se utilizó *V. harveyi* cepa CAIM1792 descrita en el capítulo anterior (Capítulo 2). Una alícuota de la cepa fue sembrada en 10 mL de TSB + 2.5% NaCl (MDA-LAB®, Tlalnepantla, Estado de México, México) y se incubó durante 24 horas a 30°C. Se ajustó la densidad óptica del caldo bacteriano hasta obtener un valor de absorbancia de 0.1 a 625 nm (GENESYS 100V®, Thermo Scientific Inc, Maltham, MA, EUA), equivalente a 0.5 McFarland (10^8 UFC mL⁻¹). A continuación, se hicieron

diluciones seriadas hasta obtener una densidad de 10^6 UFC mL⁻¹. La suspensión fue sembrada en agar TCBS para estimar la densidad de siembra utilizada para el RB.

- **Reto bacteriano**

Los camarones fueron inoculados en el tercer segmento abdominal con 100 µL de inóculo bacteriano (INOC) a una densidad bacteriana de 1.7×10^6 UFC mL⁻¹, mientras que otros seis camarones en las mismas condiciones previas de cultivo fueron inoculados como grupo control con 100 µL de TSB estéril + NaCl al 2.5%. De acuerdo con la metodología propuesta por Phuoc *et al.* (2009), se utilizaron 6 camarones por tratamiento (Figura 6). Después de 10 días post infección, se tomaron diferentes tejidos de los camarones de los cuatro tratamientos para evaluar el efecto del sistema de cultivo (SC), reto bacteriano (RB) o interacción de ambos factores sobre biomarcadores metabólicos y de salud.



FIGURA 6. Distribución de los organismos *L. vannamei* previamente cultivados en BFT o AC e inoculados con *V. harveyi* CAIM1792.

- **Calidad de agua y medidas de bioseguridad**

El manejo de la calidad de agua para mantener las variables medioambientales en condiciones óptimas (temperatura, OD, salinidad, pH, NO₂ y TAN) y las medidas de bioseguridad establecidas durante el RB fueron hechas con base a los protocolos descritos en el capítulo anterior (Capítulo 2). Las variables monitoreadas se

mantuvieron en los rangos permisibles en los acuarios de todos los tratamientos (temperatura= 28.1-28.3°C, OD= 6.15-6.26 mg L⁻¹, salinidad= 35 ppt, pH= 7.6, NO₂= 0.02-0.07 mg L⁻¹, TAN= 0.22-0.43 mg L⁻¹).

- **Toma de muestras**

Se extrajeron 400 µL de hemolinfa, los cuales fueron tomados del seno ventral (entre los pereiópodos y pleópodos) con la ayuda de una jeringa de insulina con agua de 30G x 13 mm precargada con 400 µL de anticoagulante SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM EDTA.Na₂, pH 7.3). Se almacenaron porciones de músculo y hepatopáncreas a -80°C, una porción de músculo fue conservada en una solución estabilizadora de ARN (RNAlater®, Sigma-Aldrich, R0901) y otra más se almacenó junto con una porción más de hepatopáncreas en un histocassette que fue conservado en solución Davidson (ANEXO 3), de acuerdo con la metodología establecida por Lightner & Pantoja (1996).

- **Parámetros evaluados**

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

- **Metabolitos en hepatopáncreas:** Los hepatopáncreas conservados previamente a -80°C fueron homogenizados en frío con 500 µL de agua libre de pirógenos. Las muestras fueron centrifugadas a 16,170 x g durante 20 minutos a 4°C (IEC, Centra® MP4R, Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, EUA). El sobrenadante obtenido fue colectado y de éste se hicieron diluciones 1:100 para la determinación de metabolitos. Las proteínas totales (PROT) fueron determinadas por la técnica de Bradford (1976), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (EMD Biosciences, Inc., La Jolla, CA, EUA) y haciendo la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm (Appliskan®, Thermo Scientific Inc, Maltham, MA, EUA). Para la determinación de glucosa (GLU), colesterol (CHOL) y acilglicéridos (AGs) se utilizaron kits comerciales (RANDOX®, Tlalnepantla, Estado de México) (Hernandez-Lopez & Vargas-Albores, 2003). Para estos tres casos, la absorbancia fue leída a 490 nm (Appliskan®, Thermo Scientific Inc, Maltham, MA, EUA) y las concentraciones fueron calculadas a partir de una solución estándar.

- **Enzimas antioxidantes:** La SOD y catalasa (CAT) fueron extraídas de las muestras de músculo preservadas previamente a -80°C. La SOD fue cuantificada utilizando un kit comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de enzima requerida para inhibir la actividad de xantina al 50% en 20 minutos. Para la actividad de CAT, se hizo una adaptación en microplaca utilizando la técnica de Hadwan & Abed (2016), incubando las muestras en buffer fosfato (pH 7.4) en dos microplacas de 96 pozos. Posteriormente, a una placa se le agregó H₂O₂ y se dejó incubando durante 3 minutos, adicionando posteriormente molibdato de amonio en ambas placas para detener la reacción. Para ambas enzimas, la absorbancia fue medida a 450 nm (Beckman Coulter® model DTX 880, Brea, California, EUA).
- **Hemocianina:** La medición de hemocianina (Hc) fue hecha con las muestras de hemolinfa extraídas (Pascual *et al.*, 2003), utilizando un espectrofotómetro Genesys® 100V (Thermo Scientific Inc, Maltham, MA, EUA) y haciendo la lectura a una longitud de onda de 335 nm.
- **Extracción de ARN y obtención de cDNA complementario:** Se hizo la extracción de ARN de las muestras de músculo conservadas en RNAlater® (TRIZOL®, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) (ANEXO 2). El ARN fue cuantificado a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) y posteriormente tratado con DNasa I libre de RNasa® (ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA) para eliminar posible contaminación por ADN. El cDNA fue generado a un volumen de reacción de 10 µL compuesto por 4 µg de ARN, buffer RT 10X, dNTP Mix 25X (10 mM), Primers Random RT 10X y transcriptasa reversa (Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich®, Spruce St Louis, MO, EUA). La reacción fue llevada a cabo a 37°C durante 80 minutos.
- **qPCR de los genes de Hc, $\alpha 2M$, proFO, pen3a y SOD:** La expresión de mRNA de los genes *a2M*, *proFO*, *Hc* y *pen3a* fue medida por qPCR, utilizando los oligonucleótidos descritos en el Capítulo 2. Además, con base a los datos de cDNA publicados para *L. vannamei*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *SOD* (Tabla 5), utilizando el software OligoPerfect® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA), pues los oligonucleótidos reportados previamente por otros autores (Wang *et al.*,

2007) no amplificaron los productos de PCR. Los oligonucleótidos diseñados fueron elaborados por Sigma-Aldrich® (Toluca, México). La reacción de qPCR fue hecha con base al protocolo descrito para los genes *a2M*, *proFO* y *pen3a* descritos en el Capítulo 2.

| Gen | Secuencia Forward/Reverse | Tamaño (pb) |
|------------|---|-------------|
| <i>SOD</i> | 5'- AGCTTACATCTCCATCCTGG - 3' 5'- ATCTGAGGACTGACTGTGC - 3' | 189 |

TABLA 5. Secuencias de nucleótidos utilizadas para amplificar el gen *SOD* de *L. vannamei* por qPCR.

Al igual que como se describió con los genes diseñados en el Capítulo 2, se incluyó un control negativo para la evaluación del gen *SOD*, omitiendo la adición de cDNA. Las curvas de disociación (Figura 7) y eficiencia (Figura 8) para dicho gen fueron preparadas utilizando cDNA específico para *L. vannamei* a una concentración de cDNA conocida ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas 1:5 (1, 0.2, 0.04, 0.008 y $0.0016 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Cada muestra fue analizada por duplicado, utilizando el gen β -actina como control interno (Wang *et al.*, 2007).

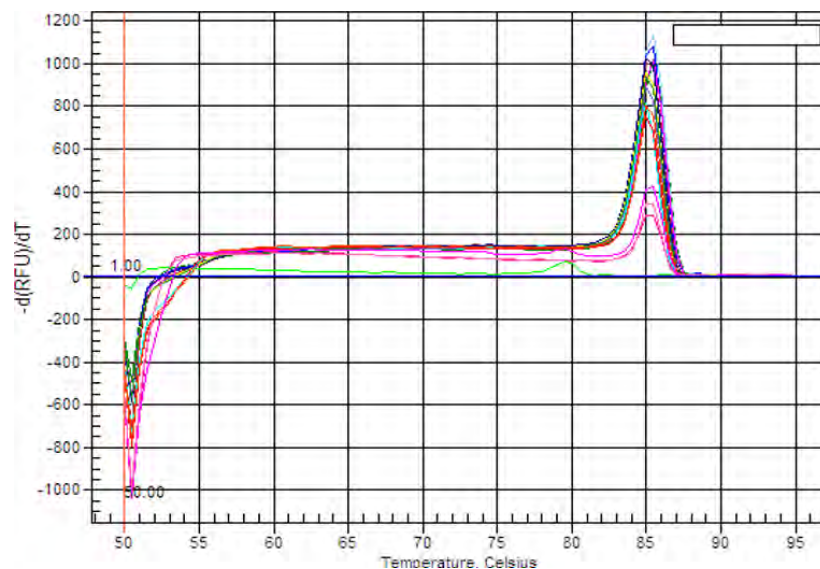


FIGURA 7. Análisis de la curva de disociación del gen *SOD* de *L. vannamei* por qPCR.

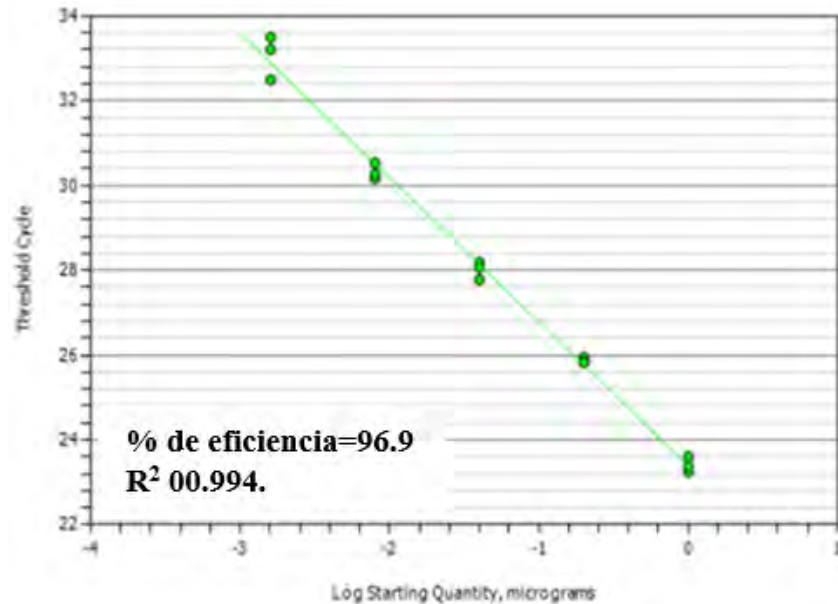


FIGURA 8. Análisis de la curva de eficiencia del gen *SOD* de *L. vannamei* por qPCR.

- **Análisis histopatológico**

Los hepatopáncreas que fueron fijados previamente en solución Davidson fueron deshidratados y embebidos en parafina (KEDEE®, KD-BM, Guangdong, China) utilizando el siguiente esquema de procesamiento:

- Dos baños separados (1 hora cada uno) de alcohol etílico al 70%.
- Dos baños separados (1 hora cada uno) de alcohol etílico al 80%.
- Dos baños separados (1 hora cada uno) de alcohol etílico al 96%.
- Dos baños separados (1 hora cada uno) de alcohol etílico absoluto.
- Dos baños separados (1 hora cada uno) de xileno.
- Dos baños separados (1 hora cada uno) de parafina.

Los bloques de parafina obtenidos fueron cortados con un micrótopo a 4 micras (Leica® RM2125RT, Nussloch, Alemania), de acuerdo a la metodología reportada por Lightner & Pantoja (1996) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina & eosina, con el objetivo de identificar lesiones a nivel microscópico (Olympus™ CH30, Melville, NY). Las lesiones identificadas fueron clasificadas en G0 a G4, donde: G0=sin lesiones; G1=pocas lesiones, menos severas; G2= lesiones moderadas, severas; G3= lesiones moderadas a severas, muy severas; G4= lesiones severas; letal (Lightner, 1996).

- **Supervivencia**

Durante los 10 días del estudio se registró el número de mortalidades presentadas en cada tratamiento. El porcentaje de supervivencia se determinó a partir de la diferencia entre los organismos sembrados al inicio y al final del experimento:

$$\% \text{ Supervivencia} = \left(\frac{\text{Número final}}{\text{Número inicial}} \right) \times 100$$

- **Análisis estadístico**

Antes del análisis se confirmó que los datos obtenidos cumplieran con el supuesto de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Cochran). Una vez hecho esto, se aplicó un ANOVA bifactorial de 2 x 2 para determinar la interacción entre sistema de cultivo (BFT vs. AC) y el reto bacteriano (INOC vs. Control). Se aplicó una prueba de Tukey cuando el efecto obtenido fue significativo. Se aplicó una prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney) cuando los datos no fueron normales u homogéneos. En todos los casos, se trabajó con un nivel de significancia de $p=0.05$, con el fin de determinar diferencias significativas entre tratamientos. Para determinar la exactitud de los resultados obtenidos en este estudio, se hizo un análisis de poder estadístico para estimar el valor de β (probabilidad de cometer error tipo II), considerando un tamaño de efecto considerable (20% de diferencia entre promedios) (Cohen, 1988). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete bioinformático STATISTICA® v10 para Windows (StatSoft Inc., 2011). Las gráficas utilizadas para ilustrar diferencias o interacciones entre factores fueron generadas a través del lenguaje de programación R (R Core Team, 2017). El poder estadístico de la prueba fue determinado con el programa G*Power v3 para Windows (Franz *et al.*, 2007).

Resultados

- **Signos de enfermedad observados antes y durante el reto bacteriano**

La observación de coloración típica en el cuerpo y hepatopáncreas, comportamiento normal y apéndices completos confirmaron el estado de salud óptimo de los camarones de cada tratamiento antes del RB (Día 0) (Tabla 6). Sin embargo, durante el RB se observaron signos de enfermedad en los camarones previamente cultivados en AC e inoculados con la cepa de *V. harveyi* CAIM1792. Entre las lesiones observadas se identificaron camarones con letargia, cuerpo flácido, necrosis en urópodos y músculo (principalmente en la porción donde la bacteria fue inoculada), pleópodos con coloración rojiza, expansión de cromatóforos, melanización y atrofia en hepatopáncreas, todas ellas con diferentes grados de severidad (G1, G2 y G3) (Figura 9, Tabla 6).

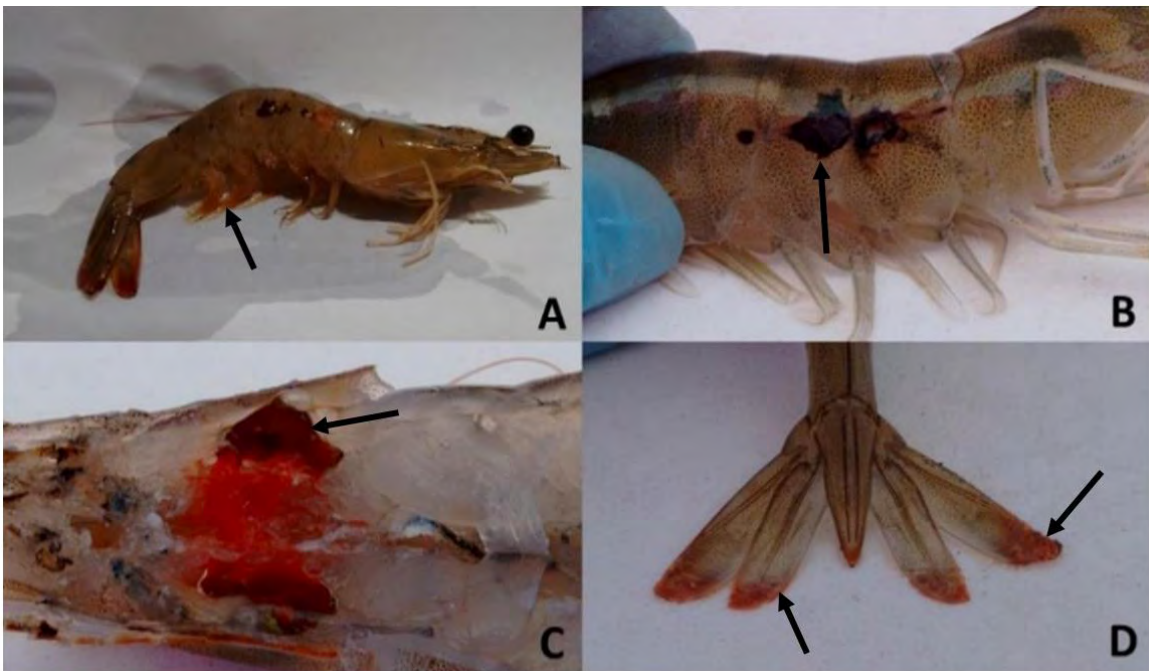


FIGURA 9. Signos observados durante el tiempo de exposición de *L. vannamei* en el tratamiento AC/INOC. (A) camarón con pleópodos rojizos; (B) zona de melanización acompañada de coloración rojiza en músculo y expansión de cromatóforos; (C) hepatopáncreas con atrofia y coloración rojiza; (D) urópodos con coloración rojiza y necrosis.

| Tratamiento | Días de observación | | | | | | | | | | | Número total de camarones con lesiones | |
|-------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|--|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| BFT/Control | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 |
| BFT/INOC | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 |
| AC/Control | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 / 6 |
| AC/INOC | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 0 (G0) | 5/6 (G0) | 5/6 (G0) | 3/6 (G0) | 2/6 (G0) | 1/6 (G0) | 1/6 (G1) | | 6/6 (G3) | 6 / 6 |
| | | | | | 1/6 (G1) | 1/6 (G1) | 1/6 (G2) | 4/6 (G2) | 5/6 (G2) | 5/6 (G2) | | | |

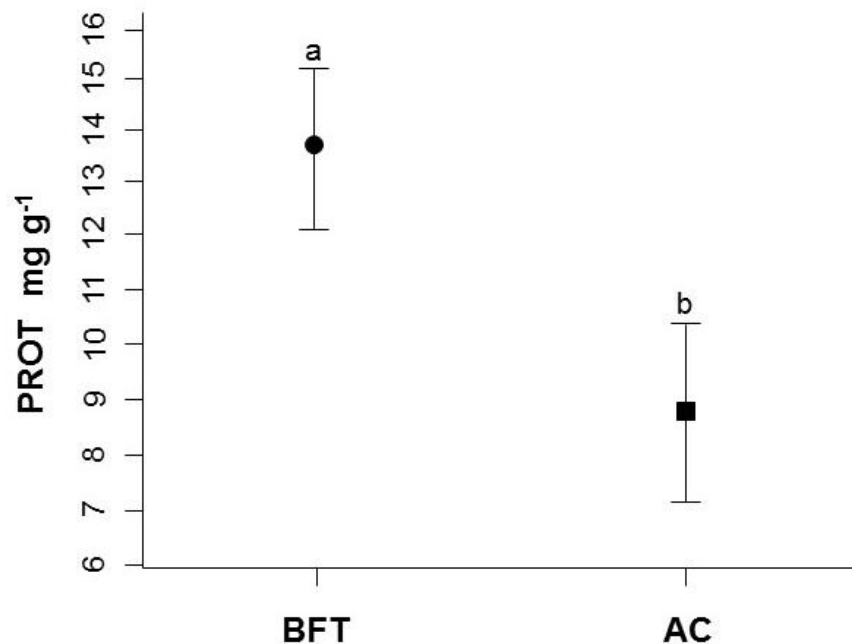
TABLA 6. Días de observación en juveniles de *L. vannamei* con evidencia de lesiones en diferentes grados de severidad y de acuerdo con el sistema de cultivo (BFT, AC) y reto bacteriano (INOC, Control). La severidad de las lesiones fue clasificada en la siguiente escala: G0=sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; y G4=lesiones severas, letal (Lightner, 1996).

- **Metabolitos en hepatopáncreas**

Para PROT, la actividad significativamente más elevada se obtuvo en los tratamientos de BFT ($p < 0.05$), mientras que los tratamientos en AC no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$) (Tabla 7). Esta relación se aprecia claramente en la Gráfica 2, donde se observan las diferencias significativas entre ambos sistemas de cultivo (BFT vs. AC). Para el caso de CHOL, GLU y AGs no se encontraron diferencias significativas por efecto de alguno de los factores evaluados ($p > 0.05$). El poder de la prueba obtenido para estas tres variables fue muy cercano a 1, indicando que la probabilidad de haber cometido Error Tipo II (β) fue tan baja que, por ende, se rechaza que el BFT no tiene la capacidad de modificar los niveles de CHOL, GLU y AGs de los camarones cultivados bajo estas condiciones, pese a la presencia de algún agente infeccioso (en este caso, *V. harveyi*). (Tabla 7).

| Metabolito | BFT/Control | BFT/INOC | AC/Control | AC/INOC | p | Poder de la prueba (1-β) | β |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|-----------|
| CHOL mg g ⁻¹ | 17.36±2.59 ^a | 16.32±2.69 ^a | 16.79±1.42 ^a | 16.56±1.41 ^a | * 0.689 | * 0.924 | * 0.076 |
| | | | | | ** 0.706 | ** 0.932 | ** 0.068 |
| | | | | | *** 0.530 | *** 0.990 | *** 0.010 |
| GLU mg g ⁻¹ | 13.93±2.35 ^a | 13.07±1.72 ^a | 13.87±1.01 ^a | 13.31±0.77 ^a | * 0.905 | * 0.979 | * 0.021 |
| | | | | | ** 0.357 | ** 0.977 | ** 0.023 |
| | | | | | *** 0.844 | *** 0.999 | *** 0.001 |
| AGs mg g ⁻¹ | 5.26±0.49 ^a | 4.99±0.37 ^a | 5.28±0.21 ^a | 5.15±0.15 ^a | * 0.573 | * 1.000 | * 0.000 |
| | | | | | ** 0.221 | ** 1.000 | ** 0.000 |
| | | | | | *** 0.676 | *** 1.000 | *** 0.000 |
| PROT mg g ⁻¹ | 15.98±3.30 ^a | 11.37±2.16 ^a | 9.39±1.55 ^b | 7.36±0.78 ^b | * 0.000 | NA | NA |
| | | | | | ** 0.196 | NA | NA |
| | | | | | *** 0.451 | NA | NA |

TABLA 7. Promedio ± Error estándar de metabolitos (CHOL, GLU, AGs, PROT) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de p<0.05. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores. NA= análisis no aplicable.



GRÁFICA 2. Efecto del factor SC dado por el ANOVA bifactorial de 2 x 2 y seguido de la prueba de Tukey para la variable PROT (mg g⁻¹) en juveniles de *L. vannamei*. Letras indican diferencias significativas entre tratamientos. SC=Sistema de cultivo; BFT=Biofloc; AC=Agua clara.

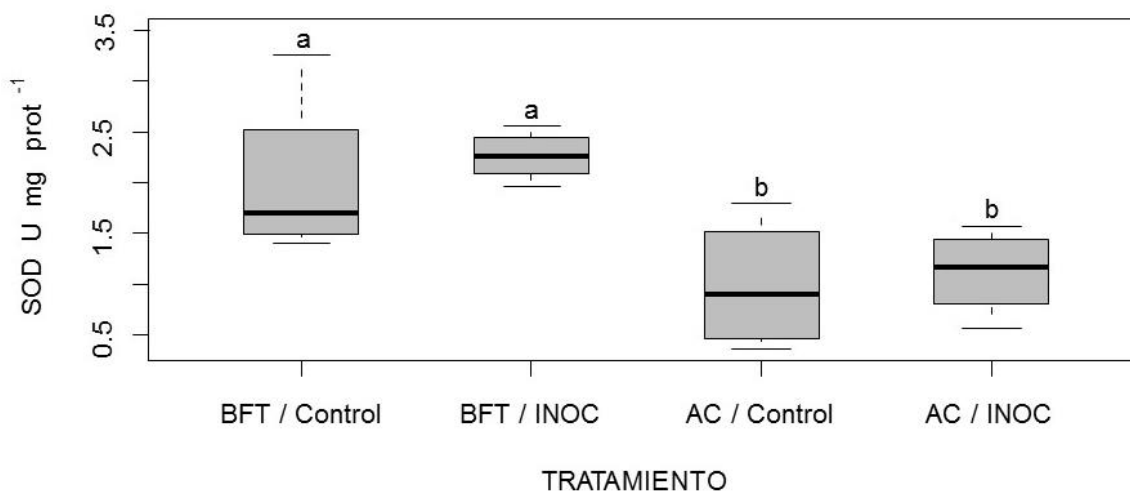
- **Enzimas antioxidantes**

Para las enzimas SOD y CAT, la actividad significativamente más elevada se obtuvo en los tratamientos en BFT (p<0.05), mientras que los tratamientos en AC no mostraron

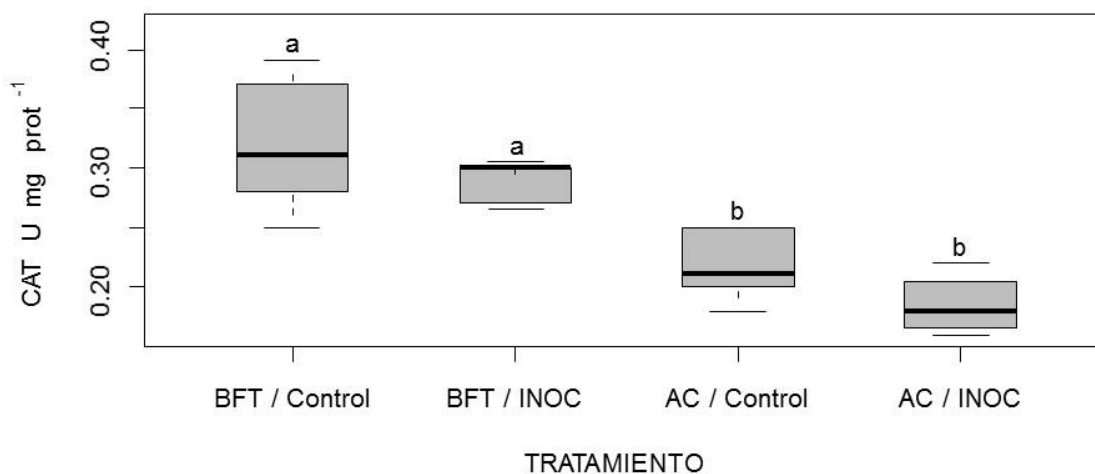
un efecto significativo ($p > 0.05$) (Tabla 8). Esta relación se aprecia claramente en las Gráficas 3 y 4, donde se observan las diferencias significativas entre ambos sistemas de cultivo (BFT vs. AC).

| Enzima antioxidante | BFT/Control | BFT/INOC | AC/Control | AC/INOC | p |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| SOD U mg ⁻¹ prot | 2.01±0.85 ^a | 2.26±0.25 ^a | 0.99±0.66 ^b | 1.12±0.43 ^b | * 0.003 |
| | | | | | ** 0.532 |
| | | | | | *** 0.844 |
| CAT U mg ⁻¹ prot | 0.32±0.06 ^a | 0.28±0.05 ^a | 0.22±0.03 ^b | 0.18±0.11 ^b | * 0.004 |
| | | | | | ** 0.263 |
| | | | | | *** 0.978 |

TABLA 8. Promedio ± Error estándar de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores.



GRÁFICA 3. Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable SOD (U mg⁻¹ prot) en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo.



GRÁFICA 4. Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable CAT ($\text{U mg}^{-1} \text{prot}^{-1}$) en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo.

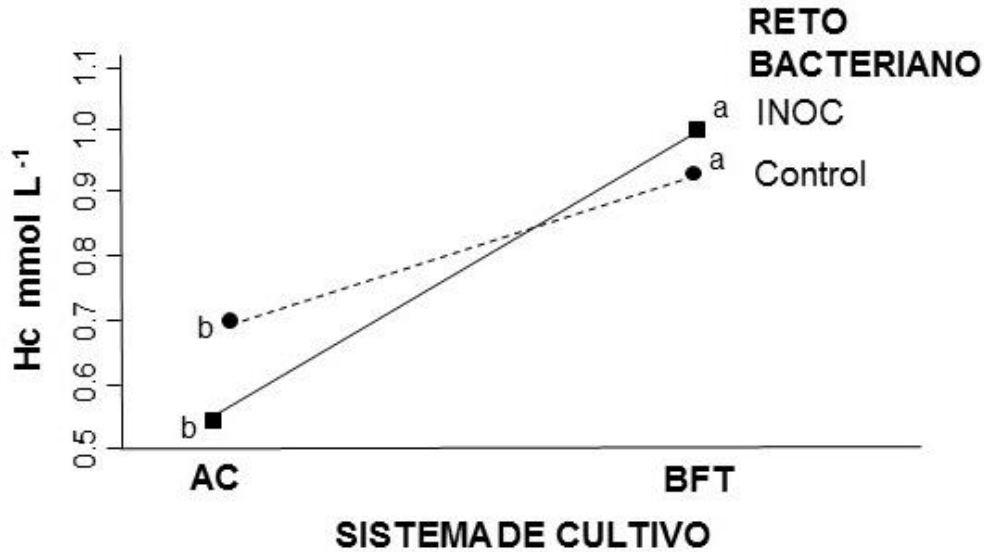
- **Análisis de hemolinfa**

En la Tabla 9 se observa que el ANOVA bifactorial de 2 x 2 demostró que la concentración de Hc en hemolinfa resultó afectada significativamente por la interacción entre los factores Sistema de Cultivo y Reto Bacteriano ($p < 0.05$).

La actividad significativamente más elevada se obtuvo en los tratamientos BFT/Control y BFT/INOC ($p < 0.05$), mientras que los tratamientos AC/Control y AC/INOC no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$). En la Gráfica 5 se observa la interacción entre los factores Sistema de Cultivo (BFT vs. AC) y Reto Bacteriano (Control vs. INOC).

| Indicador | BFT/Control | BFT/INOC | AC/Control | AC/INOC | p |
|-------------------------|-------------|------------|------------|------------|----------------------------------|
| Hc mmol L ⁻¹ | 0.93±0.06a | 1.07±0.05a | 0.69±0.11b | 0.56±0.09b | * 0.100 ** 0.878 *** 0.003 |

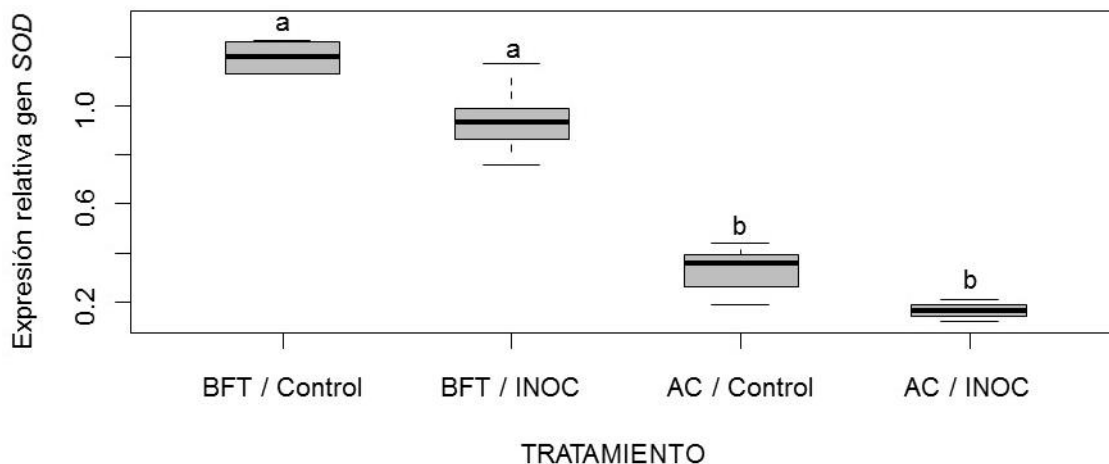
TABLA 9. Promedio ± Error estándar de hemocianina (Hc) en juveniles de *L. vannamei*. Superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos con un valor de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; ***=interacción entre ambos factores.



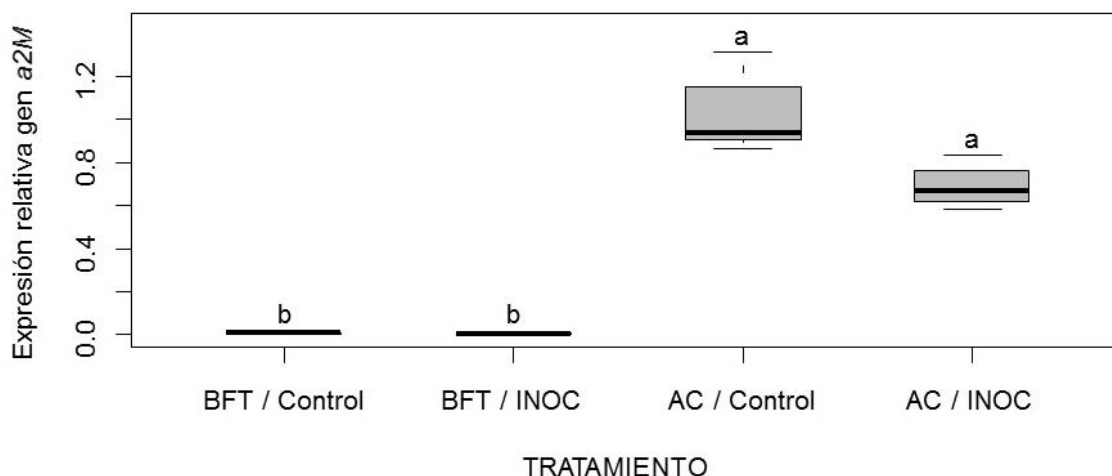
GRÁFICA 5. Gráfica de los datos obtenidos para la variable Hc (mmol L⁻¹) en juveniles de *L. vannamei* para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Retos Bacteriano.

- **Expresión de genes de respuesta inmune por qPCR**

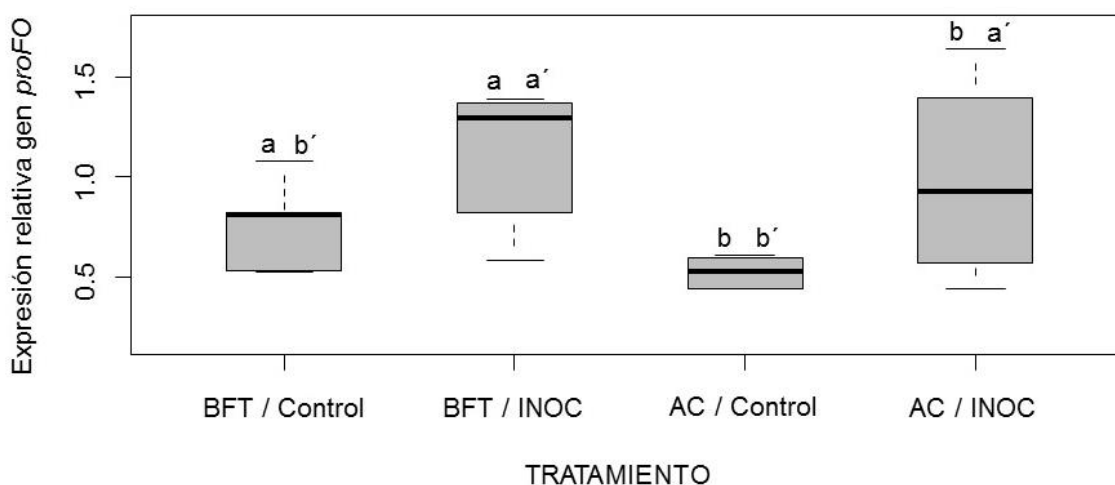
Para los genes *SOD*, *a2M* y *proFO*, la actividad significativamente más elevada se obtuvo en los tratamientos en BFT ($p < 0.05$), mientras que los tratamientos en AC no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$) (Gráfica 6, Gráfica 7, Gráfica 8 y Tabla 10). No obstante, para el gen *proFO* también se obtuvo una actividad significativamente elevada en los tratamientos INOC ($p < 0.05$), mientras que los tratamientos Control no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$).



GRÁFICA 6. Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *SOD* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo.

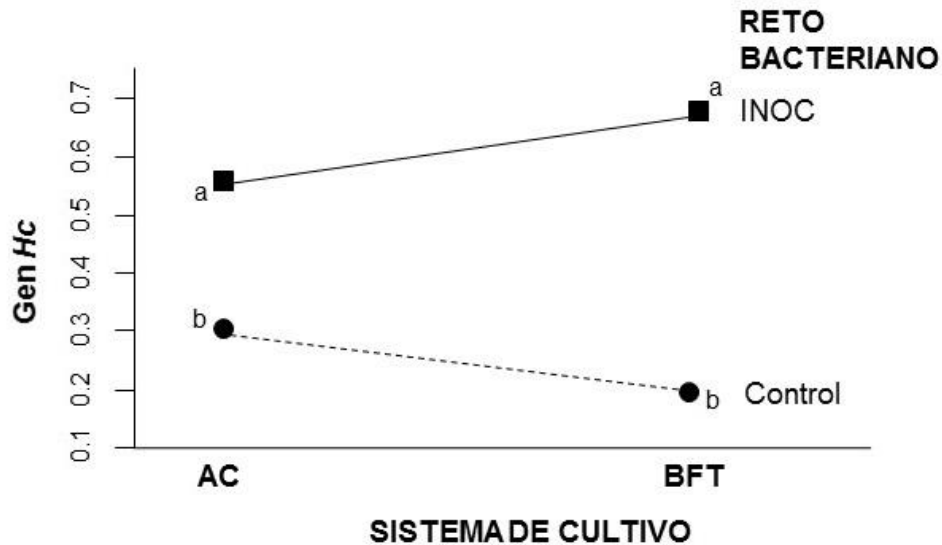


GRÁFICA 7. Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *a2M* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. SC= Sistema de cultivo.



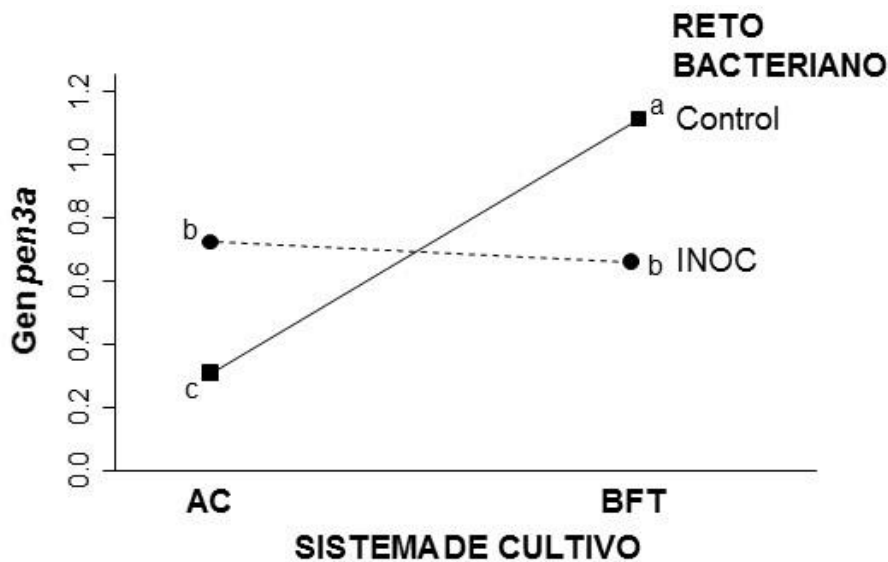
GRÁFICA 8. Diagrama de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos obtenidos para la variable gen *proFO* en juveniles de *L. vannamei*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por el factor SC. Letras primas indican diferencias significativas por el factor RB. SC= Sistema de cultivo; RB= Reto bacteriano.

Para el gen *Hc* se obtuvo una interacción significativa en la expresión de mRNA entre el factor Sistema de Cultivo y Reto Bacteriano ($p < 0.05$), teniendo los niveles de expresión más elevados en los camarones previamente cultivados en BFT y AC e inoculados con la cepa patógena de *V. harveyi*, mientras que los grupos control de ambos sistemas de cultivo fueron similares entre ellos, pero diferentes de los tratamientos infectados (Gráfica 9; Tabla 10).



GRÁFICA 9. Gráfica de los datos obtenidos para el gen *Hc* en juveniles de *L. vannamei*, para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano.

De manera similar, se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *pen3a* por la interacción entre ambos sistemas de cultivo y el reto bacteriano, donde el efecto significativo fue observado en el grupo control en BFT ($p < 0.05$), mientras que los valores más bajos se presentaron en el grupo control de los camarones previamente cultivados en agua clara (Gráfica 10; Tabla 10).



GRÁFICA 10. Gráfica de los datos obtenidos para el gen *pen3a* en juveniles de *L. vannamei*, para mostrar la interacción entre los factores SC (BFT, AC) y RB (Control, INOC). Línea continua representa al grupo inoculado con *V. harveyi* CAIM1792; línea discontinua representa al grupo control. BFT=Biofloc; AC=Agua clara; SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano.

| Gen | BFT/Control | BFT/INOC | AC/Control | AC/INOC | p |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--|
| <i>SOD</i> | 1.13±0.16 ^a | 0.94±0.21 ^a | 0.31±0.14 ^b | 0.16±0.08 ^b | * 0.000 ** 0.060 *** 0.835 |
| <i>a2M</i> | 0.01±0.01 ^a | 0.008±0.007 ^a | 1.02±0.24 ^b | 0.69±0.27 ^b | * 0.041 ** 0.088 *** 0.107 |
| <i>proFO</i> | 0.76±0.13 ^{a, b'} | 1.08±0.04 ^{a, a'} | 0.41±0.07 ^{b, b'} | 0.96±0.32 ^{b, a'} | * 0.021 ** 0.000 *** 0.214 |
| <i>Hc</i> | 0.17±0.06 ^b | 0.68±0.09 ^a | 0.30±0.06 ^b | 0.55±0.06 ^a | * 0.896 ** 0.096 *** 0.001 |
| <i>pen3a</i> | 1.13±0.13 ^a | 0.64±0.14 ^b | 0.32±0.15 ^c | 0.74±0.15 ^b | * 0.516 ** 0.650 *** 0.000 |

TABLA 10. Promedio ± Error estándar de la expresión relativa de los genes *SOD*, *Hc*, *proFO*, *a2M* y *pen3a* en *L. vannamei*. Superíndices con letra indican diferencias significativas por el factor SC. Superíndices con letra prima indican diferencias significativas por el factor RB. Valor de significancia de $p < 0.05$. *=factor sistema de cultivo; **=factor reto bacteriano; *=interacción entre ambos factores. SC=Sistema de Cultivo; RB=Reto Bacteriano.**

- **Análisis histopatológico**

Los camarones previamente cultivados en AC e inoculados con la cepa de *V. harveyi* mostraron daño en el tejido hepatopancreático en diferentes grados de severidad (G1, G2 y G3) (Tabla 11). Los hallazgos histopatológicos observados fueron nódulos hemocíticos melanizados, infiltración hemocítica, atrofia tubular y degeneración hidrópica (Figura 10). Por otro lado, los camarones cultivados previamente en BFT e inoculados con la bacteria, además de los grupos controles de ambas condiciones de cultivo no presentaron daño alguno en los hepatopáncreas (Tabla 11, Figura 10).

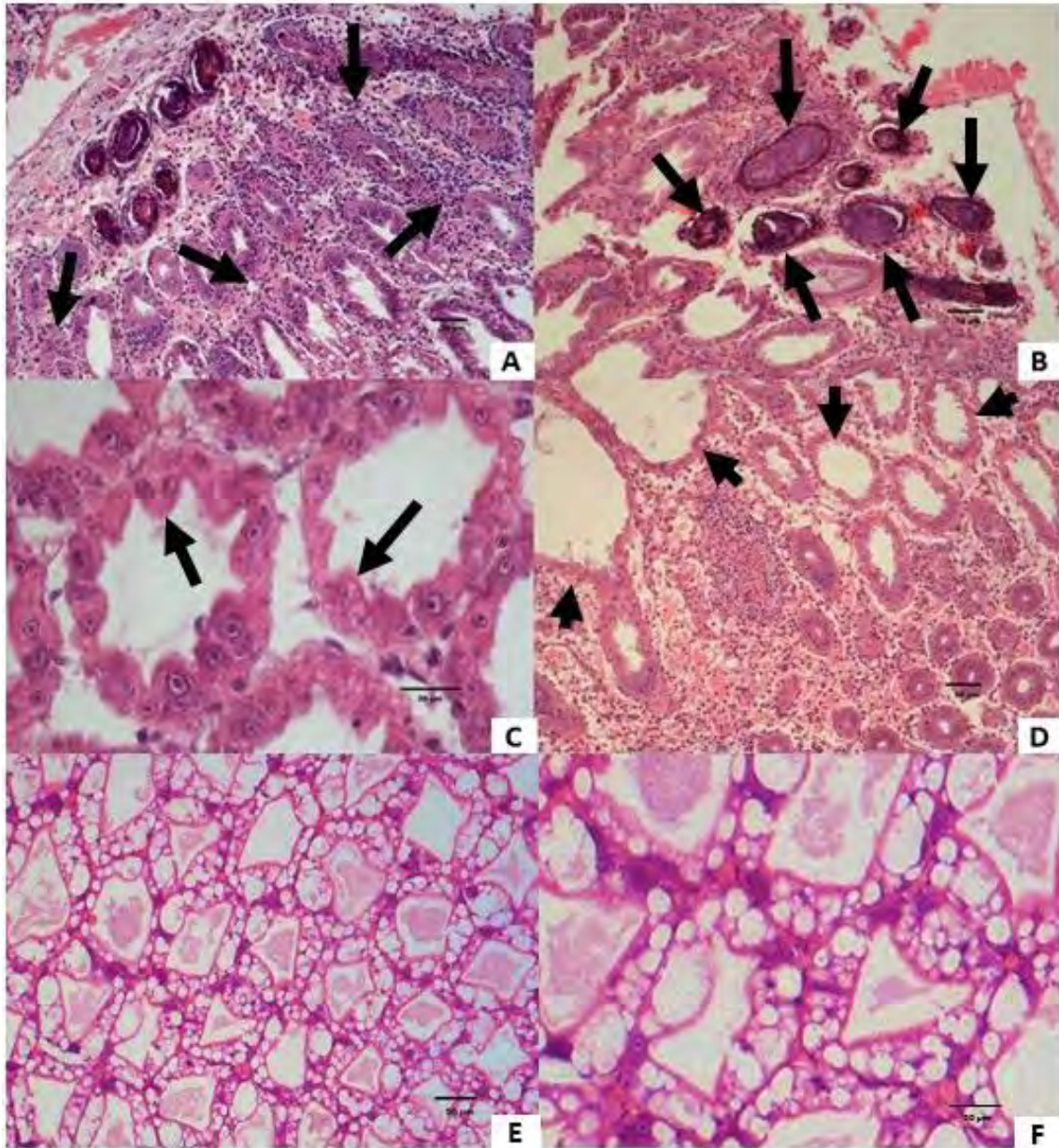


FIGURA 10. Tejidos de hepatopáncreas en juveniles de *L. vannamei* del tratamiento AC/INOC. (A) infiltración hemocítica o inflamación (50 μ m); (B) nódulos hemocíticos melanizados (50 μ m); (C) degeneración hidrópica (20 μ m) y (D) atrofia tubular (50 μ m). Tejidos de hepatopáncreas en juveniles de *L. vannamei* previamente cultivados en BFT. (E) muestra tomada del tratamiento BFT/INOC (50 μ m) y (F) muestra tomada del tratamiento BFT/Control (20 μ m).

- **Supervivencia**

Solamente se observaron mortalidades en los camarones previamente cultivados en AC e inoculados con la cepa patógena de *V. harveyi* CAIM 1792 (tasa de supervivencia =75%). En este tratamiento, la primera mortalidad se obtuvo en el Día 6, mientras que para el Día 10, el resto de los camarones de dicho tratamiento se encontraron

moribundos (Tabla 11). En el resto de los tratamientos no se observaron mortalidades (tasa de supervivencia=100%) (Tabla 11).

| Tratamiento | Mortalidad diaria | | | | | | | | | | | Tasa de supervivencia (%) a los 10 días | Número de camarones con lesiones histopatológicas (grado de severidad) |
|---------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| BFT / Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 / 6 (G0) |
| BFT / INOC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 / 6 (G0) |
| AC / Control | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 / 6 (G0) |
| AC / INOC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 75 | 6 / 6 (G1-G3) |

Tabla 11. Mortalidad diaria, tasa de supervivencia y número de camarones con lesiones histopatológicas en hepatopáncreas de juveniles de *L. vannamei* de acuerdo con SC (BFT, AC) o RB (Control, INOC). La severidad de los hallazgos histopatológicos fue clasificada con la siguiente escala: G0= sin lesiones; G1=pocas lesiones, poco severas; G2=lesiones moderadas, severas; G3=lesiones moderadas a severas, muy severas; and G4=lesiones severas, letal (Lightner, 1996). SC= Sistema de Cultivo; RB= Reto Bacteriano.

Discusión

Uno de los puntos debatibles en este estudio fue llevar a cabo el reto bacteriano transfiriendo a los camarones de su sistema de cultivo de origen (BFT, AC) a un dispositivo experimental con agua de mar estéril. En este sentido, lo que se quería demostrar era la manera en la cual el camarón por sí solo respondía ante la presencia de una bacteria con potencial patógeno, eliminando el efecto que pudiera tener la microbiota del agua sobre el camarón al momento de la infección. Así, solamente se podrían obtener resultados que fueran producidos por los mecanismos de respuesta inmune que el camarón desarrollara para combatir a la bacteria y que hasta cierto punto pudieran ser consecuencia del ambiente en el cual estos organismos estuvieran previamente cultivados.

Otro punto importante por mencionar es el cambio de ambiente acuático (en particular para los camarones que provenían de BFT) a un agua estéril y su posible efecto negativo sobre los indicadores que se pretendían evaluar. A este respecto, estudios enfocados a la reproducción de camarón han demostrado que este cambio de ambiente de un tipo de sistema de cultivo a otro no repercute de manera negativa en la calidad de los huevos obtenidos de hembras de *F. duorarum* (Emerenciano *et al.*, 2013a). En dicho estudio, los autores demostraron que el cambio en la composición del agua no afectaba la supervivencia de las crías ni el rendimiento del desove de las hembras, atribuyendo los resultados obtenidos al aporte nutricional que el BFT tuvo sobre los camarones antes de ser cambiados de manera paulatina a un sistema experimental con AC. Por esta razón, los resultados del presente en cuanto a los cambios en los indicadores analizados son causados por el factor “Sistema de cultivo” (BFT, AC) o por la presencia o ausencia de *V. harveyi* (INOC, Control), y no por el posible estrés producido por el cambio gradual del BFT al agua estéril utilizada en el dispositivo experimental.

Con base a los resultados obtenidos se puede confirmar el efecto que tienen los sistemas de cultivo utilizados para camarón (BFT, AC) sobre diferentes indicadores metabólicos, antioxidantes e inmunológicos. Dicho efecto podría ser atribuido al

microbioma que los camarones desarrollan de manera natural cuando están cultivados en BFT o AC, el cual es similar en diversidad, pero distinto en frecuencia de distribución para ambas condiciones de cultivo (Cardona *et al.*, 2016). Por tal razón, el efecto producido por el factor Sistema de Cultivo sobre algunas de las variables determinadas en este estudio fue significativamente diferente entre los camarones cultivados previamente en BFT y AC. No obstante, el efecto de la inoculación intramuscular de la cepa patógena de *V. harveyi* también tuvo un papel importante en la respuesta inmune de los camarones, demostrando así que la presencia de patógenos en los cultivos puede aumentar o disminuir los mecanismos de respuesta inmune que los camarones tienen para contrarrestar una infección, principalmente, los que están relacionados con el sistema proFO.

La eficiencia que el BFT demostró tener sobre el estado de salud de los camarones antes y después del reto bacteriano fue evaluada con la identificación de lesiones macroscópicas, histopatológicas y con la presencia de mortalidades en los camarones. En este caso, los camarones cultivados previamente en BFT y también inoculados con la bacteria, no presentaron evidencia de daño alguno, además de que su supervivencia fue de 100%. En contraste, los camarones previamente cultivados en AC y después inoculados con *V. harveyi* CAIM1792 mostraron un daño externo y a nivel histopatológico, además de mortalidades del 25%. El mecanismo protector que el BFT produce en los camarones para prevenir enfermedades en los cultivos se relaciona a su efecto de tipo probiótico, el cual tiene un efecto benéfico no solamente en el crecimiento de los camarones, sino también en su supervivencia y estado de salud a nivel del hepatopáncreas (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014). Además, estudios previos han sugerido que los camarones cultivados en BFT tienen una mejor capacidad de supervivencia ante brotes infecciosos de *Vibrio* (datos no publicados). La FAO también ha confirmado dicho supuesto, ya que se ha demostrado que durante brotes de AHPND, los camarones en BFT son menos propensos a enfermarse que los camarones de un sistema de cultivo tradicional (FAO/MARD, 2013).

Como ya se mencionó con anterioridad, el BFT no solamente tuvo un efecto importante sobre el estado de salud de los camarones a nivel macroscópico, sino también sobre algunos indicadores relacionados con el metabolismo, estrés oxidativo y sistema inmunológico. Uno de estos casos fue observado en los valores de PROT obtenidos en los hepatopáncreas de los camarones cultivados previamente en BFT (efecto dado por el factor Sistema de Cultivo). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por otros autores (Kuhn *et al.*, 2009; Crab *et al.*, 2012; Xu & Pan, 2013; Correia *et al.*, 2014), donde se sugiere que el alto aporte de este metabolito está relacionado con la presencia de proteína nativa producida por la microbiota del BFT. Por lo tanto, es posible establecer que las reservas de proteína en el hepatopáncreas de los camarones cultivados bajo estas condiciones fueron constantes debido a la contribución nutricional de este sistema de cultivo, a pesar del periodo de ayuno al que fueron sometidos los camarones durante el reto bacteriano. Además, es bien sabido que las altas concentraciones de proteína en la dieta afectan de manera favorable el desempeño en la actividad del sistema inmunológico de los camarones (Pascual *et al.*, 2004b; Mugnier *et al.*, 2013), ya que se ha demostrado que las proteínas juegan un papel importante en el reconocimiento de patógenos a través de las PAMPs, en la coagulación de la hemolinfa y en la regulación de la síntesis de melanina (Montaño-Pérez *et al.*, 1999; Vargas-Albores & Yepiz-Plascencia, 2000; Pascual *et al.*, 2004a).

Los niveles de Hc en plasma son otro indicador nutricional y del estado de salud en camarones de cultivo, por lo que su determinación ha sido propuesta como un indicador de evaluación durante infecciones virales y bacterianas (Spicer & Baden, 2000). Se ha observado que cuando los camarones son alimentados con dietas ricas en proteína, los niveles de Hc aumentan de manera significativa en el plasma (Pascual *et al.*, 2003 y 2006). Por otro lado, la interacción observada entre el factor Sistema de Cultivo y Reto Bacteriano para la variable Hc indica que, de acuerdo con la historia nutricional de los camarones previamente cultivados en BFT, se creó una condición preexistente en la cual, a pesar de que los camarones fueron inoculados con la bacteria patógena, los valores de Hc se mantuvieron constantes. En comparación con el tratamiento AC/INOC, la ausencia de enfermedad en el tratamiento BFT/INOC por

efecto de *V. harveyi* CAIM1792 pudo estar relacionada con el papel que tiene la Hc sobre el estado de salud de los camarones, ya que se ha visto que esta hemoproteína está relacionada con la producción de melanina (con efecto microbicida contra patógenos), en la aceleración del proceso de esclerotización de la cutícula para proteger al animal contra depredadores y patógenos (Decker & Rimke, 1998) y en la inhibición del crecimiento de virus, bacterias y hongos (Lee *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2014). Al ser la proteína la base del sistema inmunológico en camarones (Pascual *et al.*, 2006) se puede sugerir que los altos niveles de proteína en hepatopáncreas y su correlación con la Hc de los camarones cultivados previamente en BFT aumentaron la eficacia de los mecanismos de resistencia de dichos organismos, evitando así la presencia de enfermedades y mortalidades producidas por el reto bacteriano.

Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en la determinación de glucosa, colesterol y acilglicéridos entre los tratamientos evaluados se relacionó con la condición de ayuno a la que fueron sometidos los camarones durante el reto bacteriano. En estudios previos se ha reportado el efecto del ayuno sobre la concentración de lípidos totales (incluyendo colesterol y acilglicéridos) en hepatopáncreas de *L. vannamei* (Pascual *et al.*, 2006) y de glucosa en *Chasmagnathus granulata* (Oliveira *et al.*, 2004), demostrando en ambos casos que hay una disminución de estos metabolitos a partir del Día 7 y 3, respectivamente, la cual se mantiene durante todo el periodo de ayuno. Es por esta razón que se sugiere que la concentración de glucosa, colesterol y acilglicéridos pudiera haberse mantenido en niveles similares por el ayuno al que fueron sometidos los camarones antes y durante el reto bacteriano, mas no por el factor sistema de cultivo o reto bacteriano evaluados entre los tratamientos analizados.

Al llevar a cabo el análisis de la expresión génica de *Hc*, nuevamente se obtiene una interacción entre el factor Sistema de Cultivo y Reto Bacteriano, confirmado así que esta proteína es un marcador directo de la respuesta inmune después de un proceso infeccioso contra virus o bacterias (Zhang *et al.*, 2004; Nayak *et al.*, 2010). No obstante, en este caso se tuvieron los mayores valores de expresión de este gen en los tratamientos de BFT y AC que fueron inoculados con la cepa patógena utilizada en este estudio. La alta expresión de este gen en el tratamiento AC/INOC no tuvo un efecto

importante al momento de llevar a cabo el reto bacteriano, pues pese a este resultado, en este tratamiento si hubo presencia de signos de enfermedad y mortalidades en los camarones, a diferencia del tratamiento BFT/INOC, donde los camarones se mantuvieron sanos durante los 10 días de la fase experimental del estudio.

Algo importante a destacar son las diferencias en los valores de Hc obtenidos a nivel plasmático y transcripcional, ya que en el primer caso se observó una mayor concentración de dicha hemoproteína en ambos tratamientos de BFT (Control, INOC), mientras que en el segundo caso la mayor transcripción del gen se dio en los tratamientos inoculados con la bacteria (BFT, AC). Estas diferencias pueden ser debidas a tres factores: el tiempo de duración en el cual el camarón estuvo en contacto con el agente estresante (un reto bacteriano de 10 días con *V. harveyi* CAIM1792,); el tipo de tejido en el cual se hicieron las determinaciones de las variables analizadas (plasma para la determinación de Hc circulante, músculo para la expresión relativa del gen *Hc*); y el tiempo en el cual se tomaron las muestras para hacer los análisis correspondientes (en este caso, en el Día 10) (Regoli & Giuliani, 2014).

El sistema inmunológico de los camarones carece de memoria celular y funciona gracias a la respuesta de los hemocitos durante un proceso infeccioso (Martin & Graves, 1985). Uno de los mecanismos de respuesta desencadenados por los hemocitos es la fagocitosis, proceso que favorece la producción de radicales libres (O_2^- , H_2O_2 , OH) con efecto antimicrobiano (De Zoysa *et al.*, 2008). Sin embargo, dichos radicales libres pueden llegar a ser nocivos para las células y tejidos sanos del camarón, por lo que estos animales cuentan con un sistema de defensa antioxidante conformado por diferentes enzimas, entre las que se incluyen la SOD y catalasa, que tienen la función de neutralizar el efecto de dichos radicales (Ji *et al.*, 2009; Cardona *et al.*, 2015). Por esta razón, ambas enzimas han sido reportadas como un indicador del estado de salud en camarones (Mohankumar & Ramasamy, 2006; Cheng *et al.*, 2007). Por efecto del Sistema de Cultivo, los tratamientos en BFT presentaron una mayor actividad enzimática de SOD y catalasa, lo cual indica que, a comparación de los camarones cultivados en AC, los camarones en BFT tienen un sistema de defensa antioxidante continuamente activo, posiblemente por el contacto permanente entre los camarones y bacterias que de

manera natural se desarrollan en estos cultivos (Ekasari *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Por lo tanto, se sugiere que existe una liberación continua de radicales libres en los camarones cultivados en BFT, la cual no es dañina a causa de la actividad constante de ambas enzimas. Por esta razón, el tratamiento BFT/INOC no se vio afectado de manera negativa por la presencia del inóculo bacteriano utilizado durante el reto.

Al igual que la determinación enzimática de SOD, su expresión relativa evaluada por *qPCR* fue significativamente mayor por efecto del Sistema de Cultivo en los tratamientos de BFT (Kim *et al.*, 2014), lo que sugiere que los camarones cultivados bajo estas condiciones tienen un mecanismo de defensa activo contra patógenos que es dado por la continua actividad de su sistema de defensa antioxidante. Desafortunadamente, en este estudio no pudo hacerse el comparativo entre la actividad enzimática y expresión relativa a nivel del mRNA de catalasa, por lo que dicha comparación no puede ser abordada.

De manera adicional, la alta transcripción del gen *proFO* durante el reto bacteriano con *V. harveyi* confirma que la expresión de este gen es un marcador directo de la respuesta inmune del camarón (Gillespie *et al.*, 1997; Yu & Kanost, 2002). Sin embargo, también se observó un alto número de transcritos del mismo gen en BFT por efecto del factor Sistema de Cultivo, indicando que la composición del BFT proporciona al camarón una actividad antibacteriana permanente asociada con la población microbiana presente en estos cultivos, la cual participa en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune de los camarones (Ekasari *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). Por lo tanto, estos resultados también se correlacionan de manera positiva a la ausencia de signos de enfermedad y mortalidades del tratamiento BFT/INOC.

La alta transcripción del gen *proFO* en el tratamiento BFT/INOC produjo un decremento en la expresión del gen *pen3a*, posiblemente por la eficiente actividad del sistema *proFO* generada como mecanismo de respuesta contra la infección por *V. harveyi*. En este caso, la alta expresión de *pen3a* en camarones de BFT antes del RB pudo ser consecuencia de la actividad antagónica de la microbiota presente en el agua y el camarón (incluyendo a las bacterias del género *Vibrio*) (Bachère *et al.*, 2004; Muñoz *et*

al., 2004; Shanthi & Vaseeharan, 2012; Tassanakajon *et al.*, 2017). Esta hipótesis es confirmada por la ausencia de signos de enfermedad y mortalidades en los camarones de BFT después del reto bacteriano. Pese a que la expresión del gen *pen3a* fue similar entre los tratamientos BFT/INOC y AC/INOC, en el segundo caso la actividad de este gen no fue eficiente (a pesar de ser mayor que en el tratamiento AC/Control), por lo que en este caso si se observaron camarones enfermos y muertos.

Finalmente, es importante destacar la habilidad que el sistema inmune en crustáceos presenta para auto-modularse, evitando así dañar a las células y tejidos sanos después de que el agente infeccioso en cuestión ha sido eliminado. Nuevamente se indica un efecto significativo del BFT sobre el sistema inmune del camarón, encontrando por dicho efecto un alto número de transcritos del gen *a2M*. Este gen es responsable de regular la respuesta inmune generada por el sistema proFO para producir melanina (Johansson *et al.*, 2000), además de que se relaciona con los procesos de fagocitosis y coagulación durante infecciones por *V. harveyi* (Chaikeeratisak *et al.*, 2012; Ponprateep *et al.*, 2017).

Conclusiones

En este capítulo fue posible establecer que por sí solo, el BFT tuvo la capacidad de tener un efecto importante sobre diversos indicadores metabólicos y de salud de los camarones cultivados bajo estas condiciones. Dada la condición preexistente que se da entre el camarón y los nutrientes, microorganismos y moléculas producidas en el BFT, es posible conferirles a los camarones una mayor resistencia a las enfermedades. Por lo tanto, los niveles de PROT, la actividad del sistema de defensa antioxidante y respuesta inmune a nivel génico de camarones expuestos a un agente infeccioso pueden mantenerse en niveles similares a los presentes en condiciones normales de cultivo (en este caso, BFT).

CAPÍTULO 4

Discusión general, conclusión y recomendaciones para estudios futuros

Discusión general

El motivo por el cual se decidió llevar a cabo el presente trabajo de tesis fue la presencia estacional de brotes de vibriosis que se han observado durante los últimos 6 años en la zona de estudio descrita (Capítulos 2 y 3). Lo interesante de este fenómeno es que los estanques experimentales de cultivo de camarón que se encuentran en condiciones de BFT han presentado este problema en menor grado de severidad (20% de la población/estanque), mientras que los que están cultivados en agua clara son quienes han resultado más afectados por el brote infeccioso (del 80 al 100% de la población/estanque). Entre los signos identificados durante estos episodios de enfermedad presentes en ambas condiciones de cultivo se encuentran: melanización en exoesqueleto y branquias, coloración rojiza multifocal, necrosis de urópodos, pleópodos y pereiópodos incompletos, reducción en el consumo de alimento, letargia y mortalidades de aproximadamente 30% en BFT y 80% en agua clara (datos no publicados).

Con el objetivo de comprender porque los camarones en BFT eran más resistentes a la enfermedad producida por *Vibrio*, se propuso la realización de un reto bacteriano con camarones previamente cultivados en ambas condiciones para evaluar los mecanismos de respuesta inmune que pudieran intervenir en controlar el desarrollo de la infección. Sin embargo, para elegir la densidad bacteriana a utilizar en dicho reto bacteriano que permitiera observar la evolución paulatina de la infección y la aparición gradual de signos de enfermedad en los camarones, se planteó la realización del estudio descrito en el Capítulo 2, utilizando diferentes densidades bacterianas de la cepa de *V. harveyi* CAIM1792.

La densidad bacteriana que se eligió para el reto bacteriano entre BFT vs. AC (Capítulo 3) fue la que no presentó mortalidades repentinas o ausencia de enfermedad por efecto de la cepa utilizada en los camarones del experimento llevado a cabo en el Capítulo 2. En este caso, los resultados esperados se obtuvieron en el tratamiento 10^6 , donde los camarones permanecieron sanos hasta el día 8, y a partir del día 9 se observaron 3 de los 4 camarones utilizados en este tratamiento con letargia y una disminución en su reflejo de huida, tal y como ocurrió al inicio de la infección producida

en los tratamientos 10^7 y 10^8 , donde la aparición de signos de enfermedad se dio en menor tiempo y de forma más repentina.

Cuando se llevó a cabo el reto bacteriano comparativo entre camarones previamente cultivados en BFT y AC con la densidad bacteriana de 10^6 UFC, los camarones del tratamiento en BFT permanecieron en condiciones normales y sin presencia de signos de enfermedad durante los 10 días del experimento, mientras que el 100% de los camarones del tratamiento en AC e inoculados con la bacteria si mostraron evidencia de enfermedad y mortalidades a partir del día cuatro del reto bacteriano.

Estos resultados confirmar que los camarones en BFT son más resistentes al efecto patógeno de ciertos agentes infecciosos (en este caso *Vibrio*) (Aguilera-Rivera *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2016; FAO/MARD, 2013), aunque esta propiedad no los excluye de ser blanco de enfermedades, ya que estos camarones tienen un umbral de resistencia que es sobrepasado cuando una cepa bacteriana con efecto patógeno rebasa la densidad de 10^7 UFC, produciendo así brotes infecciosos y mortalidades en los cultivos. No obstante, esta tolerancia es mayor a la que los camarones en cultivos de AC presentan cuando son sometidos a infecciones experimentales (Karunasagar *et al.*, 1994; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1998; Le Groumellec *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1996; Prayitno & Latchford, 1995; Robertson *et al.*, 1998).

Para que este fenómeno sea logrado, en el BFT se llevan a cabo diferentes mecanismos de control sobre las comunidades microbianas que de manera natural se desarrollan en el agua de los estanques y en la microbiota del camarón (Cardona *et al.*, 2015; Crab *et al.*, 2010b; De Schryver *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), evitando así el efecto oportunista de las bacterias del género *Vibrio*. Como ya se demostró en el Capítulo 2 y 3 de este trabajo de investigación, dichos mecanismos tienen un efecto importante sobre la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune del camarón cuando éste tiene que responder ante el estímulo dado por un agente infeccioso (Ekasari *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015). La activación de los genes de respuesta inmune de los camarones en BFT demostró ser más eficiente que en los camarones de AC, fenómeno

que fue demostrado en ambos experimentos por la ausencia de signos de enfermedad, mortalidades y hallazgos histopatológicos a nivel del hepatopáncreas.

En la Figura 11 se esquematiza el modelo propuesto como resultado de este estudio y que ilustra los efectos producidos por la cepa *V. harveyi* CAIM1792 sobre los mecanismos de defensa de los camarones en BFT y AC utilizados en este estudio, mismos que en mayor o menor grado, provocaron que en el caso específico de los camarones en BFT, la resistencia al efecto de la cepa patógena fuera mayor.

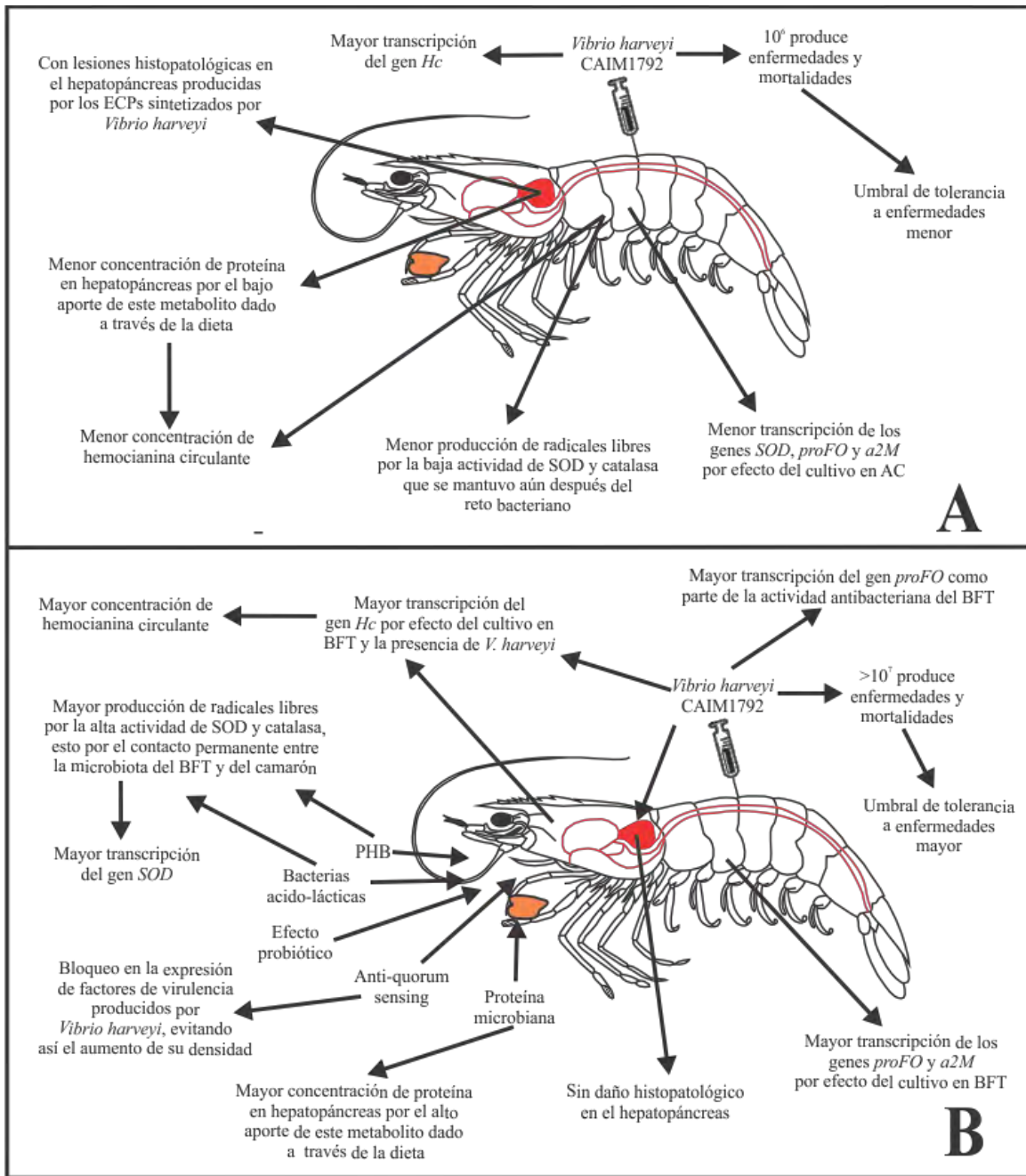


FIGURA 11. Efecto producido por los factores SC, RB e interacción SC / RB sobre indicadores metabólicos Efecto producido por los factores SC, RB e interacción SC/RB sobre indicadores metabólicos e inmunológicos de juveniles de *L. vannamei* previamente cultivados en AC (A) y BFT (B) y posteriormente infectados experimentalmente con la cepa patógena *V. harveyi* CAIM1792. SC=Sistema de cultivo; RB=Reto bacteriano; AC=Agua clara; BFT=Biofloc.

Conclusión

El BFT mejora la capacidad de respuesta inmune de juveniles de *L. vannamei*, haciéndolos más tolerantes a enfermedades producidas por cepas patógenas de *V. harveyi* (Capítulos 2 y 3). Los mecanismos de defensa de los camarones pueden variar según la densidad bacteriana del patógeno en cuestión (Capítulo 2). Sin embargo, el efecto del BFT es limitado, pues los camarones comienzan a ser más susceptibles a las infecciones por bacterias del género *Vibrio* a partir de 10^7 UFC, a pesar de los mecanismos de defensa que se estén llevando a cabo para intentar contrarrestar la infección (Capítulo 2).

El BFT por si solo es capaz de proporcionarles a los camarones un sistema de defensa estable y fuerte que se mantiene constante a pesar de que los camarones pudieran llegar a estar en contacto con algún agente infeccioso. Con base a las variables analizadas en el Capítulo 3, es posible establecer que la determinación de proteínas metabólicas, la actividad del sistema de defensa antioxidante (enzimas SOD y CAT) y la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta inmune de los camarones (genes *SOD*, *pen3a*, *Hc* y *proFO*) pueden ser utilizados en el área de la inmunología de camarón para estudiar el efecto de los sistemas de cultivo utilizados en acuicultura para disminuir la presencia de enfermedades en los cultivos.

Pese a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, aún hacen falta más estudios que permitan confirmar a mayor detalle el efecto del BFT sobre el estado de salud de los camarones de cultivo.

Recomendaciones para estudios futuros

- Hacer el reto bacteriano comparativo entre camarones de BFT y AC dentro de estos sistemas de cultivo, lo cual permitiría dar un panorama más amplio del efecto de la composición microbiana del BFT sobre la prevención de enfermedades en acuicultura.
- Complementar la determinación de genes relacionados al sistema inmune del camarón con la actividad enzimática de los efectores que participan en dicho sistema, lo cual permitiría determinar si el aumento de transcritos de ciertos genes se correlaciona de manera positiva con la actividad catalítica, comprobando así la efectividad del BFT sobre el sistema inmune de los camarones para hacerlos más tolerantes a enfermedades.
- Integrar a este tipo de estudios la realización de una cinética de la actividad de enzimas y genes relacionados con el sistema inmunológico, lo cual ayudaría a comprender a mayor detalle si los mecanismos de respuesta inmune son los mismos o van cambiando durante el desarrollo de un proceso infeccioso.

Referencias

Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T., Sakaguchi, M. 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 134, 135–141.

Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Escalante, K., Chávez, C., Cuzon, G., Gaxiola, G. 2014. Probiotic effect of floc on *Vibrios* in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 424–425, 215–219. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.01.008.

Akiyama, D.M. 1989. Soybean meal utilization by marine shrimp, in: *Proceeding of the World Congress, Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*. American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, USA, pp. 252–265.

Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A. 1987. R cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea Decapoda). *Mar. Biol.* 95, 129–137.

Alapide-Tendencia, E. V., Dureza, L.A. 1997. Isolation of *Vibrio* spp. from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* 154, 107–114. doi:10.1016/S0044-8486(97)00045-8.

Almanza-Abud, M.J., Barracco, M.A., Cuéllar-Ánjel, J., Lightner, D., Shinozaki-Méndes, E., Lemos-Pereira, A.M., Morales-Covarrubias, M.S., Pantoja, C., Perazzolo, L., Diego-Rosa, R., Saborio-Coze, A., Vasconcelos-Gesteira, T.C. 2008. *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Peneidos*, Primera Ed., Programa CYTED Red II-D Vannamei. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.

Álvarez-Borrego, S. 2007. Primera parte: Generalidades del CO₂ en el océano y en la atmósfera, in: *Hernández de la Torre, B., Gaxiola Castro, B. (Eds.), Carbono En Ecosistemas Acuáticos de México*. pp. 11–28.

Andriantahina, F., Liu, X., Huang, H., Xiang, J., Yang, C. 2012. Comparison of reproductive performance and offspring quality of domesticated Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 324, 194–200.

Arena, L., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Soyez, C., Wormhoudt, A. Van, Rosas, C. 2003. Physiological and genetic variations in domestic ted and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrate levels. *J. Shellfish Res.* 22, 269–279.

Argüello-Guevara, W., Molina-Poveda, C. 2013. Effect of binder type and concentration on prepared feed stability, feed ingestion and digestibility of *Litopenaeus vannamei* broodstock diets. *Aquac. Nutr.* 19, 515–522.

Avilés-Gómez, L. 2011. Estudio de la microbiota del sistema digestivo en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Avnimelech, Y. 2015. Biofloc technology. A practical guidebook, Third ed., World Aquaculture Society. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Avnimelech, Y. 1999. Carbon / nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227–235.

Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3–11. doi:10.1016/S0044-8486(00)00413-0.

Bachere, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149–168. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.

Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17–32.

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L., Donelli, G. 2003. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 31–39.

Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A., Martinez-urtaza, J. 2012. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat. Clim. Chang.* 3, 73–77. doi:10.1038/nclimate1628.

Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.

Barange, M., Perry, R.I. 2009. Repercusiones físicas y ecológicas del cambio climático en la pesca de captura marina y continental y en la acuicultura, in: Cochrane, K., Young, C. de Soto, D., Bahri, T. (Eds.), Consecuencias del cambio climático para la pesca y acuicultura: Visión de conjunto del estado actual de los conocimientos científicos. pp. 7–118.

Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D., Morales, V., Cuéllar-Ánjel, J. 2014. Inmunología del camarón, in: Guía Técnica-Patología E Inmunología de Camarones Peneidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá, pp. 169–224.

Battistella, S., Bonivento, P., Amirante, G.A. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Ital. J. Zool.* 63, 337–343. doi:10.1080/11250009609356156.

Baucheun, P., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A. 2014. Inhibitory activity of alpha-2-macroglobulin from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* proteases, in: The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. pp. 559–566.

Baumann, P., Baumann, L., Mandel, M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. J. Bacteriol. 107, 268–294.

Bonami, J.R., Hasson, K.W., Mari, J., Poulos, B.T., Lightner, D.V. 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: Characterization of the viral agent. Journal of General Virology, 78, 313–319. doi:10.1099/0022-1317-78-2-313.

Boyd, C. 2001. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón, in: Boyd, C., Haws, M. (Eds.), Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. UCA, Managua, pp. 1–30.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Burge, E.J., Madigan, D.J., Burnett, L.E., Burnett, K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio* 22, 327–339. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.004.

Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. 2005. Immunomodulatory response of superoxide dismutase in juvenile American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to immunostimulants. Ciencias Mar. 31, 661–669.

Campbell, M.S., Wright, A.C. 2003. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7137–7144.

Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., Saulnier, D. 2016. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. BMC Microbiol. 16, 1–9. doi:10.1186/s12866-016-0770-z.

Cardona, E., Saulnier, D., Lorgeoux, B., Chim, L., Gueguen, Y. 2015. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. Fish Shellfish Immunol. 45, 933–939. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.041.

Cavallo, R.A., Stabili, L. 2004. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). Scientia Marina 68, 23–29.

Cerenius, L., Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 198, 116–126.

Chaikeratisak, V., Somboonwiwat, K., Tassanakajon, A. 2012. Shrimp alpha-2-macroglobulin prevents the bacterial escape by inhibiting fibrinolysis of blood clots. PLoS One 7, e47384. doi:10.1371/journal.pone.0047384.

Chávez-Sánchez, M.C., Montoya-Rodríguez, L. 2000. Medidas de bioseguridad para evitar la introducción y dispersión de enfermedades virales en granjas camaronícolas, in: Cruz-Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. (Eds.), Memorias Del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México, pp. 650–670.

Chen, J.C., Cheng, S.Y. 1995. Accumulation of urea in the haemolymph and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 110, 1–6.

Cheng, J.C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L. 2007. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low-density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship. Food Chem. 104, 132–139. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.012.

Cheng, S.Y., Chen, J.C. 2001. The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. Aquat. Toxicol. 51, 443–454.

Ching, C.A., Portal J.V. 1998. Control de bacterias *Vibrio* spp. en larvas del camarón marino mediante el uso de agua con baja salinidad.

Cipriani, G.R., Wheeler, R.S., Sizemore, R.K. 1980. Characterization of brown spot disease of gulf coast shrimp. j. Invertebr. Pathol. 36, 255–263.

Clarke, K.R., Gorley, R.N. 2015. PRIMER v7: User Manual/Tutorial.

Cohen, J. 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences, 2nd ed. Academic Press, New York. doi:10.3758/BRM.41.4.1083

Compagnucci, M.V. 2012. Utilización de tecnología espacial asociada a floraciones algales y presencia de Vibrios. Universidad Nacional de Córdoba.

CONAPESCA. 2014. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2014. Mazatlán, Sinaloa, México.

Cook, G.C. 1992. Effect of global warming on the distribution of parasitic and other infectious diseases: a review. J. R. Soc. Med. 85, 688.

Correia, E.S., Wilkenfeld, J.S., Morris, T.C., Wei, L., Prangnell, D.I., Samocha, T.M. 2014. Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a biofloc-dominated system. Aquac. Eng. 59, 48–54. doi:10.1016/j.aquaeng.2014.02.002.

Corteel, M., Dantas-Lima, J., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M., Sorgeloos, P., Nauwynck, H. 2012. Moulting cycle of laboratory-raised *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* and *P. monodon*. *Aquac. Int.* 20, 13–18. doi:10.1007/s10499-011-9437-9.

Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1–14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.006.

Crab, R. 2010. Bioflocs technology: an integrated system for the removal of nutrients and simultaneous production of feed in aquaculture. Ghent University.

Crab, R., Chielens, B., Wille, M., Bossier, P., Verstraete, W. 2010a. The effect of different carbon sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *Aquac. Res.* 41, 559–567.

Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2010b. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1643–1649. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04791.x.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 351–356. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.046.

Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Villarreal-Cavazos, D., Beltrán-Rocha, J., Nieto-López, M.G., Lemme, A., Ricque-Marie, D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 292, 87–94. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.03.026

Cruz-Ricque, L.E., Guillaume, J., Cuzon, G. 1987. Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.* 18, 209–217.

Cuéllar-Ánjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., García Suárez, O. 2010. Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Primera Ed. ed. OIRSA-OSPESCA, C.A., Panamá, República de Panamá.

de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachère, E. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Mol. Immunol.* 45, 3438–3445. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.002.

de Magny, G.C., Murtugudde, R., Sapiano, M.R.P., Nizam, A., Brown, C.W., Busalacchi, A.J., Yunus, M., Nair, G.B., Gil, A.I., Lanata, C.F. 2008. Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17676–17681.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125–137.

De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., De Boeck, G., Bossier, P. 2010. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1535–1541.

De Zoysa, M., Pushpamali, W.A., Whang, I., Kim, S.J., Lee, J. 2008. Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 149, 630–639. doi:10.1016/j.cbpb.2007.12.009.

Decker, H., Rimke, T. 1998. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 25889–25892. doi:10.1074/jbc.273.40.25889.

Deepika, A., Sreedharan, K., Paria, A., Makesh, M., Rajendran, K.V. 2014. Toll-pathway in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) responds to white spot syndrome virus infection: Evidence through molecular characterisation and expression profiles of MyD88, TRAF6 and TLR genes. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 441–454. doi:10.1016/j.fsi.2014.09.026.

Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Van De Wiele, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W. 2007. The bacterial storage compound poly- β -hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.* 9, 445–452. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01161.x.

Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 251–258.

Denner, E.B.M., Vybiral, D., Fischer, U.R., Velimirov, B., Busse, H.J. 2002. *Vibrio calviensis* sp. nov., a halophilic, facultatively oligotrophic 0.2 μ m-filterable marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 549–553.

Eiler, A., Johansson, M., Bertilsson, S., Eiler, A., Johansson, M., Bertilsson, S. 2006. Environmental influences on *Vibrio* Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6004–6011. doi:10.1128/AEM.00917-06.

Ekasari, J., Hanif Azhar, M., Surawidjaja, E.H., Nuryati, S., De Schryver, P., Bossier, P. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 332–339. doi:10.1016/j.fsi.2014.09.004.

Emerenciano, M.G.C. 2012. Biofloc technology (BFT) application on reproduction of penaeid shrimp (Decapoda, Penaeidae) and its effects on biochemical composition and fatty acid profile. Tesis de doctorado. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Gaxiola, G. 2013a. Biofloc technology in intensive broodstock farming of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum*: Spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile of eggs. *Aquac. Res.* 45, 1713–1726. doi:10.1111/are.12117.

Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G. 2013b. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry, in: Dr. Miodrag Darko Matovic (Ed.), *Biomass Now- Cultivation and Utilization*. pp. 301–328. doi:10.5772/53902.

FAO/MARD. 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), FAO Fisheries and Aquaculture Report.

Franz, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A. 2007. G*Power: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* 39, 175–191. doi:10.3758/BF03193146.

Gai, Y., Zhao, J., Song, L., Li, C. 2008. A prophenoloxidase from the *Chinese mitten crab Eriocheir sinensis*: Gene cloning, expression and activity analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 156–167. doi:10.1016/j.fsi.2007.08.006.

Gaxiola, G., Brito, A., Maldonado, C., Jiménez-Yan, L., Guzmán, E., Arena, L., Brito, R., Soto, L.A., Cuzon, G. 2006. Nutrición y Domesticación de *Litopenaeus vannamei*, in: *Avances En Nutrición Acuícola VIII*. pp. 139–162.

Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 611–643.

Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., De Decker, S. 2006. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* 253, 105–113.

Goarant, C., Herlin, J., Ansquer, D., Imbert, F., Domalain, D., Marteur, A. 2004. Épidémiologie de *Vibrio nigripulchritudo* dans le cadre du Syndrome d’été: résultats préliminaires du programme DESANS, in: IFREMER (Ed.), *Trente Ans de Crevetticulture En Nouvelle-Calédonie. Trente ans de crevetticulture en Nouvelle-Calédonie, Nouméa-Komé*, pp. 210–215.

Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C. V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 893–900. doi:10.1016/j.dci.2006.01.002.

González, C.J., López-Díaz, T.M., Prieto, M., Otero, A. 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62, 1270–1277.

Gullian, M., Aramburu, C., Sanders, B., Lope, R. 2010. Viability of culturing pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* in low-salinity groundwater from the Yucatán Peninsula (SE, México). *Aquaculture* 302, 202–207.

Hadwan, M.H., Abed, H.N. 2016. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Br.* 6, 194–199. doi:10.1016/j.dib.2015.12.012.

Halet, D., Defoirdt, T., Van Damme, P., Vervaeren, H., Forrez, I., Van De Wiele, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W. 2007. Poly-beta-hydroxybutyrate-accumulating bacteria protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 363–369. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00305.x.

Hancock, R.E.W. Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends Microbiol.* 8, 402–410.

Hari, B., Madhusoodana-Kurup, B., Varghese, J.T., Schrama, J.W., Verdegem, M.C.J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 241, 179–194. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.07.002.

Harris, L.J., Owens, L. 1999. Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 38, 11–22. doi:10.3354/dao038011.

Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2162.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Tettelin, Â., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., Mcdonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., Fraser, C.M. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–484.

Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B., Colwell, R.R. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5488–5497.

Hernández-López, J., Mendoza-Cano, F., Coronado-Molina, D. 2011. Manual de prácticas Sistema Inmune de Camarón. LARADSA-CIBNOR.

Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. 2003. A microplate technique to quantify nutrients (NO₂, NO₃, NH₄ and PO₄) in seawater. *Aquac. Res.* 34, 1201–1204.

Hervio-Heath, D., Colwell, R.R., Derrien, A., Robert-Pillot, A., Fournier, J.M., Pommepuy, M. 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1123–1135.

Holmblad, T., Söderhäll, K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172, 111–123.

Huang, H.H., Liu, X.L., Xiang, J.H., Wang, P. 2013. Immune response of *Litopenaeus vannamei* after infection with *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 406–407, 115–120. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.05.010.

Huys, L., Dhert, P., Robles, R., Ollevier, F., Sorgeloos, P. 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus L.*) larviculture. *Aquaculture* 193, 25–37.

Ibrahim, H.R., Yamada, M., Kobayashi, K., Kato, A. 1992. Bactericidal action of lysozyme against Gram-negative bacteria due to insertion of a hydrophobic pentapeptide into its C-terminus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1361–1363.

Janeway Jr, C.A., Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.

Ji, P.F., Yao, C.L., Wang, Z.Y. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 563–570.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45–52.

Kaneko, T., Colwell, R.R. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113, 24–32.

Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G.R., Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128, 203–209.

Karunasagar, I., NaveenKumar, S., Maiti, B., Rai, P. 2014. Immunostimulation of Crustaceans, in: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O. (Eds.), *Fish Vaccination*. Wiley-Blackwell, pp. 352–371.

Kim, S.K., Pang, Z., Seo, H.C., Cho, Y.R., Samocha, T. Jang, I.K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquac. Res.* 45, 362–371. doi:10.1111/are.12319.

Kim, M.S., Min, E.Y., Kim, J.H., Koo, J.K., Kang, J.C. 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 47, 141–146. doi:10.1016/j.fsi.2015.08.027.

Krepstakies, M., Lucifora, J., Nagel, C.H., Zeisel, M.B., Holstermann, B., Hohenberg, H., Kowalski, I., Gutschmann, T., Baumert, T.F., Brandenburg, K. 2012. A new class of synthetic peptide inhibitors blocks attachment and entry of human pathogenic viruses. *J. Infect. Dis.* 205, 1654–1664.

Kuhn, K., Campbell-Lendrum, D., Haines, A., Cox, J., Corvalán, C., Anker, M. 2005. Using climate to predict infectious disease epidemics, World Health Organization. Geneva. doi:http://www.who.int/globalchange/ Figure 6. Increasing rate (p%) of incidence of *V. vulnificus* infection versus water temperature. 56 C. Chu, et al publications/infectdiseases/en/index.html.

Kuhn, D.D., Boardman, G.D., Lawrence, A.L., Marsh, L., Flick, G.J. 2009. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture* 296, 51–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.07.025.

Kumar, S., Anand, P.S.S., De, D., Deo, A.D., Ghoshal, T.K., Sundaray, J.K., Ponniah, A.G., Jithendran, K.P., Raja, R.A., Biswas, G., Lalitha, N. 2015. Effects of biofloc under different carbon sources and protein levels on water quality, growth performance and immune responses in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). *Aquac. Res.* 1–15. doi:10.1111/are.12958.

Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E., Rosenberg, E. 2001. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1383–1388.

Lavilla-Pitogo, C.R., Leñaño, E.M., Paner, M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. *Aquaculture* 164, 337–349. doi:10.1016/S0044-8486(98)00198-7.

Le Groumellec, M., Haffner, P., Martin, B., Martin, C. 1995. Comparative study of bacterial infections responsible for mass mortality in penaeid shrimp hatcheries of the Pacific zone, in: Shariff, M., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture II*. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 163–173.

Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121–131.

Lear, D.W. 1963. Occurrence and significance of chitinoclastic bacteria in pelagic waters and zooplankton. Charles C. Thomas.

Lee, S.Y., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem. 278, 7927–7933. doi:10.1074/jbc.M209239200.

Leyva-Ordáz, G.A., Sáinz-Gaxiola, L., Guevara-Escamilla, S. 2010. Protocolo de prevención y contingencias para el cultivo de camarón en Baja California. Baja California, México.

Li, C.C., Jiann-Chu, C. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish Shellfish Immunol. 25, 701–709. doi:10.1016/j.fsi.2004.07.008

Li, Q., Peng, Z., Chen, X., Sun, X., Pan, Y., Zhao, Y. 2013. Selection of reference genes for virulence gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. Wei Sheng Wu Xue Bao 53, 306–312.

Lightner, D. V, Bell, T.A., Redman, R.M., Mohney, Á.L., Natividad, Á.J., Rukyani, Á.A., Poernomo, Á.A., Shariff, Á.M., Subasinghe, Á.R., Arthur, Á.J. 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indo-Pacific, in: M. Shariff, R.S. and J.A. (Ed.). Proceedings 1st Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 57–80.

Lightner, D. V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Lightner, D. V, Pantoja, C.R. 1996. Manual para el diagnóstico de enfermedades del camarón.

Lightner, D. V. 2005. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. J. World Aquac. Soc. 36, 229–248.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Chen, Y.Y., Yeh, S.T., Chen, L.L., Huang, C.L., Hsieh, J.F., Li, C.C. 2015. Crowding of white shrimp *Litopenaeus vananmei* depresses their immunity to and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. 45, 104–111. doi:10.1016/j.fsi.2015.02.012.

Lipp, E.K., Huq, A., Colwell, R.R. 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. Clin. Microbiol. Rev. 15, 757–770. doi:10.1128/CMR.15.4.757.

Liu, P.C., Lee, K.K., Yii, K.C., Kou, G.H., Chen, S.N. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 22, 413–416. doi:10.1111/j.1472-765X.1996.tb01192.x.

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 448, 135–141. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.05.017.

López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary [beta] 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224, 223–243. doi:10.1016/S0044-8486(03)00214-X.

Lucas, A. 1993. Bioénergétique des animaux aquatiques. Masson, Paris.

Lyon, W.J. 2001. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4685–4693.

Magaña-Gallegos, E., González-Zúñiga, R., Cuzon, G., Arevalo, M., Pacheco, E., Valenzuela, M.A.J., Gaxiola, G., Chan-Vivas, E., López-Aguiar, K., Noreña-Barroso, E. 2018. Nutritional contribution of biofloc within the diet of growout and broodstock of *Litopenaeus vannamei*, determined by stable isotopes and fatty acids. *J. World Aquac. Soc.* doi:10.1111/jwas.12513.

Martin, G.G., Graves, B.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* 185, 339–348.

Martínez S., F. 2007. Sistema Inmune en Camarones.

McIntosh, R.P., Drennan, D.P., Bowen, B.M. 1999. Belize aquaculture: Development of an intensive sustainable, environmentally friendly shrimp farm in Belize, in: V Central American Symposium on Aquaculture, Latin American. Chapter of the World Aquaculture Society, San Pedro Sula, Honduras, pp. 85–99.

McLaughlin, J.B., DePaola, A., Bopp, C.A., Martinek, K.A., Napolilli, N.P., Allison, C.G., Murray, S.L., Thompson, E.C., Bird, M.M., Middaugh, J.P. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *N. Engl. J. Med.* 353, 1463–1470.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., Sorgeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquac. Res.* 29, 579–585.

Miller, M.B., Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199.

Mohankumar, K., Ramasamy, P. 2006. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res.* 115, 69–75. doi:10.1016/j.virusres.2005.07.006.

Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I., Vargas-albores, F. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 122, 381–387.

Mugnier, C., Justou, C., Lemonnier, H., Patrois, J., Ansquer, D., Goarant, C., Lecoz, J.R. 2013. Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis. *Aquaculture* 388–391, 105–114. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.01.010.

Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Garnier, J., Gueguen, Y., Buket, P., Saulnier, D., Bachere, E. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 961–972. doi:10.1007/s00018-003-3441-9.

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. *Eur. J. Biochem.* 269, 2678–2689. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x.

Nayak, S., Singh, S.K., Ramaiah, N., Sreepada, R.A. 2010. Identification of upregulated immune-related genes in *Vibrio harveyi* challenged *Penaeus monodon* postlarvae. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 544–549. doi:10.1016/j.fsi.2010.05.010.

Nelapati, S., Nelapati, K., Chinnam, B.K. 2012. *Vibrio parahaemolyticus*-An emerging foodborne pathogen. *Vet. World* 5, 48–63.

Nhan, D.T., Wille, M., De Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P. 2010. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 302, 76–81. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.011.

Oberbeckmann, S., Fuchs, B.M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K.H., Gerds, G. 2012. Seasonal Dynamics and Modeling of a *Vibrio* Community in Coastal Waters of the North Sea. *Microb. Ecol.* 63, 543–551. doi:10.1007/s00248-011-9990-9.

Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 137, 383–390. doi:10.1016/j.cbpb.2003.10.017.

Orbea, A., Fahimi, H.D., Cajaraville, M.P. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochem. Cell Biol.* 114, 393–404.

Otoshi, C.A., Moss, D.R., Moss, S.M. 2011. Growth-enhancing effect of pond water on four size classes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 42, 417–422.

Panjaitan, P. 2010. Shrimp culture of *Penaeus monodon* with zero water exchange model (ZWEM) using molasses. *J. Coast. Dev.* 14, 35–44.

Parra-Covarrubias, E. 1997. Evaluación del efecto de dietas sobre el crecimiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones controladas de laboratorio. Universidad de Colima.

Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.* 142, 735–745. doi:10.1007/s00227-002-0995-2.

Pascual, C., Arena, L., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Rosas, C. 2004a. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 230, 405–416. doi:10.1016/S0044-8486(03)00438-1.

Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Suárez, J., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., Maldonado, T., Rosas, C. 2004b. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins. *Aquaculture* 239, 375–395. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.041.

Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., Rosas, C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251, 416–429.

Phillips, A.M.B., DePaola, A., Bowers, J., Ladner, S., Grimes, D.J. 2007. An evaluation of the use of remotely sensed parameters for prediction of incidence and risk associated with *Vibrio parahaemolyticus* in Gulf Coast oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Food Prot.* 70, 879–884.

Phuoc, L.H., Corteel, M., Thanh, N.C., Nauwynck, H., Pensaert, M., Alday-Sanz, V., den Broeck, W. Van, Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 290, 61–68. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.004.

Ponprateep, S., Vatanavicharn, T., Lo, C.F., Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V. 2017. Alpha-2-macroglobulin is a modulator of prophenoloxidase system in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 62, 68–74. doi:10.1016/j.fsi.2016.12.028.

Potasman, I., Paz, A., Odeh, M. 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* 35, 921–928.

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, 105–112. doi:10.1016/0044-8486(94)00374-W.

Qiu, C., Sun, J., Liu, M., Wang, B., Jiang, K., Sun, S., Meng, X., Luo, Z., Wang, L. 2014. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and antimicrobial analysis of two c-terminal fragments. *Mar. Biotechnol.* 16, 46–53. doi:10.1007/s10126-013-9519-y.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing.

Rajkumar, M., Pandey, P.K., Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V., Purushothaman, C.S. 2015. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac. Res.* 1–13. doi:10.1111/are.12792.

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Gururaja, P. 2014. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front. Public Heal.* 2, 1–9. doi:10.3389/fpubh.2014.00103.

Regoli, F., Giuliani, M.E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.006.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191, 271–288.

Ricque-Marie, D., Cruz-Suarez, L.E., Zavala-Chavez, B.M., Nieto-Lopez, M., Guajardo, C., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Newkirk, R. 2004. Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed an air classified pea protein flour (Ppf) based diet, in: *Avances en Nutrición Acuícola VII*. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, p. 2004.

Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M., Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infection in *Penaeus vannamei* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 32, 151–155. doi:10.3354/dao032151.

Robledo, D., Navarro-Angulo, L., Valdes-Lozano, D., Freile-Pelegrín, Y. 2014. Nutrient removal efficiency of *Hydropuntia cornea* in an integrated closed recirculation system with pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. *Aquac. Res.* 45, 1648–1658.

Rodríguez, J., Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109–119.

Rosenberg, E., Ben-Haim, Y. 2002. Microbial diseases of corals and global warming. *Environ. Microbiol.* 4, 318–326.

Ruby, E.G., Greenberg, E.P., Hastings, J.W. 1980. Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 302–306.

Samocha, T., Prangnell, D., Hanson, T., Treece, G., Morris, T., Castro, L., Staresinic, N. 2017. Design and operation of superintensive, biofloc-dominated systems for indoor production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The Texas A&M AgriLife Research Experience. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13–28. doi:10.1016/S0044-8486(00)00576-7.

Saulnier, D., Phillipe, H., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D. 2000. Experimental infection for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191, 133–144.

Sawabe, T., Setoguchi, N., Inoue, S., Tanaka, R. 2003. Acetic acid production of *Vibrio haliotocoli* from alginate: a possible role for establishment of abalone – *V. haliotocoli* association. *Aquaculture* 219, 671–679.

Schneider, O., Sereti, V., Eding, E.H., Verreth, J.A.J. 2006. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture* 261, 1239–1248.

Sechi, L.A., Dupre, I., Deriu, A., Fadda, G., Zanetti, S. 2000. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. *J. Appl. Microbiol.* 88, 475–481.

Seki, H. 1965. Microbiological studies on the decomposition of chitin in marine environment-IX. *日本海洋学会誌* 21, 253–260.

Shanthi, S., Vaseeharan, B. 2012. cDNA cloning, characterization and expression analysis of a novel antimicrobial peptide gene penaeidin-3 (Fi-Pen3) from the haemocytes of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Microbiol. Res.* 167, 127–134. doi:10.1016/j.micres.2011.07.003.

Soto-Rodríguez, S., Armenta, M., Gómez-Gil, B. 2006. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 255, 48–54. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.035.

Soto-Rodríguez, S., Gómez-Gil, B., Lozano, R. 2010. “Bright-red” syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Dis. Aquat. Organ.* 92, 11–19. doi:10.3354/dao02274.

Soto-Rodríguez, S. A., Gómez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A.L., Romalde, J.L. 2012. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 307–317. doi:10.1016/j.jip.2012.01.006.

Spicer, J.I., Baden, S.P. 2000. Natural variation in the concentrations of haemocyanin from three decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus*, *Liocarcinus depurator* and *Hyas araneus*. Mar. Biol. 136, 55–61. doi:10.1007/s002270050008.

StatSoft Inc. 2011. STATISTICA (data analysis software system).

Subramanian, K., Balaraman, D., Balachandran, D.N., Thirunavukarasu, R., Gopal, S., Renuka, P.S., Kumarappan, A. 2014. Immune response of shrimp (*Penaeus monodon*) against *Vibrios furnissii* pathogen. J. Coast. Life Med. 2, 281–286. doi:10.12980/JCLM.2.201414J14.

Takemura, A.F., Chien, D.M., Polz, M.F. 2014. Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. Front. Microbiol. 5, 1–26. doi:10.3389/fmicb.2014.00038.

Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S. 2012. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol. 3, 1–14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021.

Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapsri, W., Tang, S. 2017. Shrimp humoral responses against pathogens: Antimicrobial peptides and melanization. Dev. Comp. Immunol. 1–14. doi:10.1016/j.dci.2017.05.009.

Tavares-Sánchez, O.L., Gómez-Anduro, G.A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M.A., Sotelo-Mundo, R.R., Barillas-Mury, C., Yepiz-Plascencia, G. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 138, 331–7. doi:10.1016/j.cbpc.2004.03.005.

Taw, N., Srisombat, S., Chandaeng, S. 2002. *L. vannamei* trials in Indonesia. Glob. Aquac. Advocate 20–22.

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68, 403–431.

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*. J. Appl. Microbiol. 109, 1177–1187.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohney, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., Lightner, D. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Organ. 105, 45–55. doi:10.3354/dao02621

Treece, G.D. 2000. Shrimp maturation and spawning, spawning and maturation of aquaculture species: proceedings of the twenty-eighth. US-Japan Natural Resources Aquaculture, Panel, Kihei, Hawaii, USA.

Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., Ohwada, K. 2000. Characterization of depth related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA based approaches and quinone profiling. *Environ. Microbiol.* 2, 542–554.

Valderrama, D., Anderson, J.L. 2015. Shrimp Production Review, in: Goal 2015. Global Aquaculture Alliance, Vancouver, Canada.

Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderon, J., Sorgeloos, P., Swings, J. 1999. *Vibrios* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2592–2597.

Vandenbergh, J., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Swings, J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219, 9–20.

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13–21.

Vogan, C.L., Costa-Ramos, C., Rowley, A.F. 2002. Shell disease syndrome in the edible crab, *Cancer pagurus* - Isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology* 148, 743–754. doi:10.1099/00221287-148-3-743.

Wang, X.W., Zhao, X.F., Wang, J.X. 2014. C-type lectin binds to β -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. *J. Biol. Chem.* 289, 2405–2414. doi:10.1074/jbc.M113.528885.

Wang, Y.C., Chang, P.S., Chen, H.Y. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1161–77. doi:10.1016/j.fsi.2007.04.004.

Wei, X., Liu, X., Yang, J., Fang, J., Qiao, H., Zhang, Y. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 132–140. doi:10.1016/j.fsi.2011.11.001.

Wood, C.M. 2001. Toxic responses of the gill, in: Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. pp. 1–89.

Xu, W.J., Pan, L.Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. *Aquaculture* 412–413, 117–124. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.017.

Yao, C.L., Wang, A.L., Wang, Z.Y., Wang, W.N., Sun, R.Y. 2007. Purification and partial characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from haemolymph of Oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 270, 559–565.

Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191, 177–189.

Yilmaz, M., Soran, H., Beyatli, Y. 2005. Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 565–566. doi:10.1007/s11274-004-3274-1.

Yu, X., Kanost, M.R. 2002. Binding of haemolymph to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Eur. J. Biochem.* 269, 1827–1834.

Zhang, X., Huang, C., Qin, Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Res.* 61, 93–99. doi:10.1016/j.antiviral.2003.08.019.

Zhao, D., Pan, L., Huang, F., Wang, C., Xu, W. 2016. Effects of different carbon sources on bioactive compound production of biofloc, immune response, antioxidant level, and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange culture tanks. *J. World Aquac. Soc.* 47, 566–576. doi:10.1111/jwas.12292.

Zhou, J., Wang, W., He, W., Zheng, Y., Wang, L., Xin, Y., Liu, Y., Wang, A. 2010. Expression of HSP60 and HSP70 in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to bacterial challenge. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 170–178. doi:10.1016/j.jip.2009.12.006.

ANEXOS



Anexo 1: Caracterización fenotípica de *Vibrio harveyi* CAIM1792

Se determinó el crecimiento de la cepa *Vibrio harveyi* CAIM1792 en agar TCBS (MCD-LAB®, Tlalnepantla, México), morfología celular y prueba de oxidasa. También se determinó su fermentación a manitol, arabinosa, citrato, arginina, galactosa, glicina, inositol, manosa, melibiosa y sorbitol, utilizando un equipo para la identificación de patógenos entéricos/no fermentantes (BBL Crystal® MIND, Sparks, MD, EUA).

A las 24 horas de sembrar la cepa de *V. harveyi* CAIM1792 en agar TCBS, se observaron colonias amarillas, con superficie granular, forma circular y bordes irregulares (Figura 12).

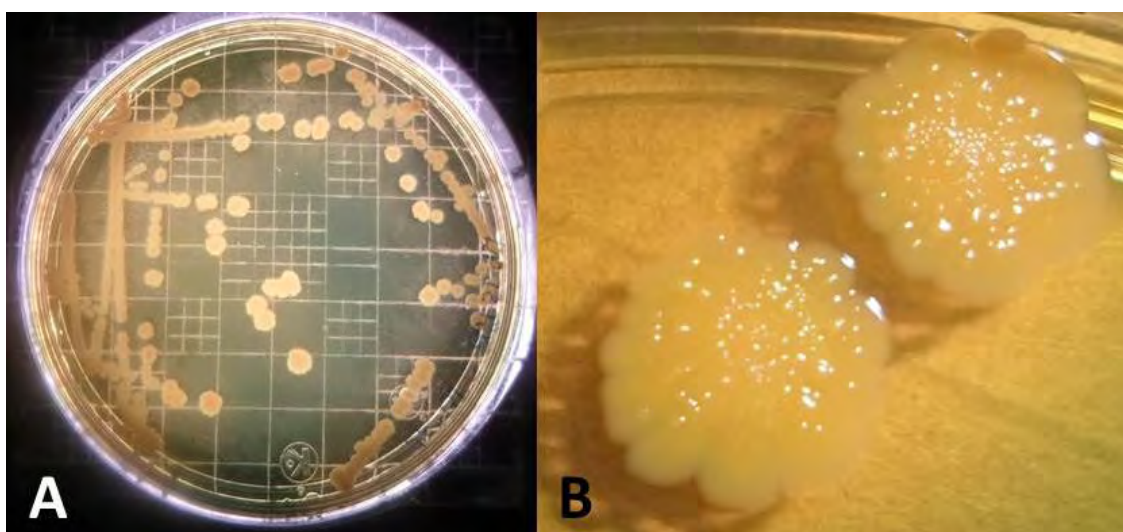


FIGURA 12. (A) Crecimiento de colonias de *V. harveyi* CAIM1792 en agar TCBS. (B) Morfología de colonias de la cepa de *V. harveyi* CAIM1792 en agar TCBS.

En cuanto a la utilización de sustratos específicos, la prueba de identificación utilizada arrojó un resultado negativo a la fermentación de arabinosa, citrato, sorbitol, arginina, galactosa, inositol y melibiosa; mientras que se tuvo una fermentación positiva a manitol, manosa y glicina (Tabla 12), mientras que la reacción a oxidasa fue positiva.

| Sustrato enzimático | Reacción |
|---------------------|----------|
| Arabinosa | - |
| Arginina | - |
| Citrato | - |
| Galactosa | - |
| Glicina | + |
| Inositol | - |
| Manitol | + |
| Manosa | + |
| Melibiosa | - |
| Sorbitol | - |

TABLA 12. Características fisiológicas de la cepa de *V. harveyi* CAIM1792. (+) fermentación positiva; (-) fermentación negativa.

Anexo 2. Extracción de ARN (Técnica de Trizol)

- 1) Colocar 750 μ L del reactivo trizol en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf[®]).
- 2) Pesar de 50 a 100 mg de tejido y colocarlo en el tubo que contiene Trizol[®].
- 3) Triturar la muestra con un pistilo de plástico para lisar las células del tejido.
- 4) Incubar las muestras en los tubos a 30°C durante 5 minutos.
- 5) Adicionar 200 μ L de cloroformo por cada 750 μ L de Trizol[®] y agitar por inmersión durante 15 segundos.
- 6) Incubar a 30°C durante 15 minutos.
- 7) Centrifugar a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C.
- 8) Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL y adicional 1000 μ L de etanol al 70%.
- 9) Centrifugar a 7,500 g durante 5 minutos a 4°C.
- 10) Desechar sobrenadante y agregar 500 μ L de etanol al 70%, agitar por inmersión.
- 11) Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- 12) Desechar sobrenadante y dejar evaporar los residuos de alcohol durante 20 minutos.
- 13) Resuspender la pastilla en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

NOTA: Durante todo el procedimiento, los pasos a realizar deben realizarse en placa fría.

Anexo 3: Preparación de la solución fijadora de Davidson (alcohol-formalina-ácido acético)

Para preparar 1 litro de solución Davidson se necesitan mezclar:

- 330 ml de alcohol etílico al 95%.
- 220 ml de formaldehído (solución saturada con gas formaldehído; concentración final de 37-39%).
- 115 ml de ácido acético glacial.
- 335 ml de agua corriente (de preferencia agua destilada).

La solución obtenida se almacenará a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: Debe evitarse el contacto con la piel o con los ojos (usar guantes y lentes protectores). En caso de un accidente, lavar inmediatamente la parte expuesta con bastante agua, consultar a un médico.