



INVESTIGACION Y DESARROLLO EN NUTRICION ACUICOLA

Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez,
Denis Ricque Marie, Mireya Tapia
Salazar, Martha G. Nieto López,
David A. Villarreal Cavazos, Julián
Gamboa Delgado, Lus Mercedes López
Acuña y Mario Alberto Galaviz
Espinoza

Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola
2017, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza

Programa Maricultura Facultad
de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2017

Copias disponibles en:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa Maricultura

Cd. Universitaria A.P. F-67

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

C.P. 66455

Tel.+Fax. 818352 6380

E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Editores

L. Elizabeth Cruz Suárez

Denis Ricque Marie

Mireya Tapia Salazar

Martha G. Nieto López

David A. Villarreal Cavazos

Julián Gamboa Delgado

Lus Mercedes López Acuña

Mario Alberto Galaviz Espinoza

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

Autores del escrito. 2017. Nombre del artículo. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza. Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. ISBN: 978-607-27-0822-8. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

AGRADECIMIENTOS

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias
- Y a la imprenta Universitaria de la UANL por el apoyo brindado para la edición de estas memorias.

Directorio

Ing. Rogelio Garza Rivera
Rector

M.A. Carmen del Rosario de la Fuente García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de publicaciones

Dr. Antonio Guzmán Velasco
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, Lus Mercedes López Acuña y Mario Alberto Galaviz Espinoza

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455

Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2017. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Denis Ricque Marie, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha G. Nieto López, ©David A. Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado© Lus Mercedes López Acuña y ©Mario Alberto Galaviz Espinoza.

ISBN: 978-607-27-0822-8. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Índice

<i>Insights in to the potential Pre-processing of ingredients to improve their nutritive value to aquaculture species</i>	1
Dominique P. Bureau*, Yuhong Yang, Chunfang Cai and Guillaume Pfeuti University of Guelph, Canadá	
<i>Fact or fiction: Methionine requirement for Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei</i>	32
Allen Davis* and Mingming Duan Auburn University, USA	
<i>El ciclo diario de la digestión en peces cultivados. Aspectos funcionales y metodológicos</i>	55
Manuel Yúfera Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, España	
<i>Aditivos alimentarios para camarones marinos: salud y nutrición</i>	78
Felipe Vieira*, Norha Constanza Bolivar, Esmeralda Chamorro Legarda, Delano Dias Schleder, Walter Quadros Seiffert, Leila Hayashi Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil	
<i>La nutrición y alimentación del pepino de mar (Echinodermata, Holothuroidea); situación actual y perspectivas para el desarrollo de su cultivo intensivo</i>	106
Miguel Ángel Olvera Novoa*, Gloria Martínez-Milián y Itzel A. Sánchez-Tapia Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN-Mérida, México	
<i>Culture of marine sciaenids in low salinity: an opportunity for expanded aquaculture in Mexico</i>	156
Mayra L. González Félix*, Martin Perez-Velazquez, Germán E. Ibarra-Garciaparra, Jorge Trujillo-Villalba Universidad de Sonora, México	
<i>Lípidos alternativos en la nutrición de peces marinos</i>	171
Artur Rombenso Universidad Autónoma de Baja California, México	
<i>Transcriptómica la nueva puerta para el estudio de la nutrición en acuicultura: actividad enzimática en el cultivo larvario de crustáceos</i>	180
Gloria Helena Ospina Salazar*, Anselmo Miranda-Baeza, Juan F. Alzate, Sven Zea Universidad Nacional de Colombia	
<i>Uso de Microorganismos Inmovilizados en Cultivos Camaronícolas y su Efecto en la Respuesta Productiva, Condición Fisiológica y Microbioma Intestinal</i>	195
Luis Rafael Martínez Córdova*, Marcel Martínez Porchas; Anselmo Miranda Baeza; Roberto Vázquez Euan; Kadiya Calderón Alvarado, Ana Lucía Gómez Ramírez Universidad de Sonora, México	
<i>La biomasa microbiana como ingrediente en la nutrición acuícola</i>	213
Julián Gamboa Delgado*, Angel Gabriel Alvarado Ibarra, Yonatan Izahi Morales Navarro Martha G. Nieto-López, David Villarreal-Cavazos, Maribel Maldonado-Muñiz Mireya Tapia-Salazar, Denis Ricque-Marie, Lucía Elizabeth Cruz-Suárez Universidad Autónoma de Nuevo León, México	
<i>Taurine synthesis in teleosts-importance of cysteamine pathway</i>	264
Yutaka Haga*, Maria Mojena Gonzales, Tomoko Itoh, Hidehiro Kondo, Ikuo Hirono, Shuichi Satoh University of Tokyo, México	

<i>Development of antibiofilm biosurfactants from marine bacteria against shrimp Vibrio pathogens</i>	284
G. Seghal Kiran*, Saba Rathnam, Sethu Priyadharsini and Joseph Selvin University of Pondicherry, India	
<i>A Meta-Analysis of Essential Amino Acid Requirements of Fish</i>	303
Guillaume Salze*, Quinton Margaret, and Bureau Dominique P. University of Auburn, USA	
<i>Diversification of Fads2 finfish species: Implications in aquaculture</i>	338
Naoki Kabeya*, Goro Yoshizaki, Douglas R. Tocher, Óscar Monroig University of Tokyo, Japón	
<i>Non-coding RNAs: uncovering their potential relevance in fish nutrition</i>	362
Ignacio Fernández Monzón*, Carlos Alfonso Alvarez-González, Dariel Tovar-Ramírez and Mario Galaviz Universidad de Algarve Portugal	
<i>Enfoques transcriptómicos en el jurel Seriola rivoliana</i>	389
Dariel Tovar Ramírez*, Teles, A., Salas-Leiva, J.S., Hernández-Contreras, A., Asencio-Alcudia, G.G., Le Du, J., Burgoin-Cota, M., Alvarez-González, C.A., Llera-Herrera, R., Gisbert, E., Fernández, I., Pérez-Urbiola, J.C., Ibarra-Castro, L., Mazón-Suástegui, J.M., Núñez-Vázquez, E.J., Guzmán-Villanueva, L.T., Reyes-Becerril, M. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste Unidad La Paz, México	
<i>Change in protein digestion capacity during juvenile fish ontogeny: Approach on spotted rose snapper (Lutjanus guttatus)</i>	407
Emyr Peña*, Crisantema Hernández, Carlos Alfonso Álvarez-González, Leonardo Ibarra-Castro, Patricia Domínguez-Jiménez Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México	
<i>Synthetic growth hormone secretagogue GHRP-6 exhibits enhanced growth activity and immune system stimulation in teleost fish and shrimp</i>	431
Rebeca Martínez Rodríguez*, Yamila Carpio, Liz Hernandez, Antonio Morales, Fidel Herrera, Reynold Morales y Mario Pablo Estrada. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba	
<i>Protein and amino acid nutrition of marine fish species</i>	438
Helena Peres* and Aires Oliva-Teles Universidade do Porto	
<i>Role of Marine Metabolites in Shrimp Growth, Production and Disease Prevention</i>	493
Anuj Nishanth Lipton*, Joseph Selvin, Seghal Kiran and Aaron Premnath Lipton University of Pondicherry, India	
<i>Evaluación de la Atractabilidad, Palatabilidad y Consumo de Ingredientes en Alimentos Balanceados para el Camarón Blanco del Pacífico Litopenaeus vannamei</i>	518
David A. Villareal Cavazos*, Juan Pablo Hinrichsen, Julián Gamboa-Delgado, Martha Nieto-López, Mireya Tapia-Salazar, Maribel Maldonado-Muñiz, Denis Ricque-Marie y Lucía Elizabeth Cruz-Suárez Universidad Autónoma de Nuevo León, México	
<i>Uso Profiláctico de Aditivos Inmunoestimulantes en el Cultivo del Camarón Blanco, Litopenaeus vannamei</i>	536
Ángel I. Campa-Córdova*, Jesús A. Valenzuela-Chávez, Jocelyne García-Armenta, Diana Medina, Alan B. Licona-Jain, Carlos E. Angulo-Valadez, Gabriel Aguirre-Guzmán, Claudio H. Mejía-Ruíz	

<i>Enteritis inducida por la harina de soya en las dietas de peces marinos: efectos sobre la integridad del intestino distal y la respuesta inmune en <i>Totoaba macdonaldi</i></i>	556
José Pablo Fuentes-Quesada, Artur N. Rombenso, Yanet Guerrero-Rentería, María Teresa Viana, Juan Pablo Lazo, José A. Mata-Sotres*	
CATEDRAS-Universidad Autónoma de Baja California, México	
<i>Efecto de la Dieta en el Microbioma Intestinal de Organismos Acuáticos</i>	566
Bruno Gómez-Gil*, Karen Enciso-Ibarra, Elizabeth Cruz-Suárez, Crisantema Hernández-González, Elizabeth Osuna-García, Martha Nieto-López, Clara Montero-Lizárraga.	
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, Sinaloa, México	

Uso Profiláctico de Aditivos Inmunoestimulantes en el Cultivo del Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*

Ángel I. Campa-Córdova¹, Jesús A. Valenzuela-Chávez, Jocelyne García-Armenta, Diana Medina, Alan B. Licon-Jain, Carlos E. Angulo-Valadez, Gabriel Aguirre-Guzmán, Claudio H. Mejía-Ruíz.

¹Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S., 23096. México. Tel: +52-612-123-8484; Fax: +52-612-125-3625. Correo Electrónico: angcamp04@cibnor.mx

Resumen

La industria del camarón representa el mayor desarrollo acuícola nacional y requiere grandes inversiones para alcanzar economías de escala y rentabilidad, debido a los problemas acentuados por el bajo margen de ganancia (15%) de los sistemas intensivos e hiperintensivos que vuelven vulnerables a los productores por la constante incidencia de enfermedades, a cambios en el mercado y en los costos de los insumos. Muchas investigaciones se han encaminado con el objetivo de prevenir o reducir la incidencia de enfermedades en los cultivos de camarón y el impacto ambiental de los productos utilizados (fertilizantes, pesticidas, herbicidas, antibióticos), lo que ha llevado a experimentar con alternativas terapéuticas naturales en el alimento y el agua de cultivo. Los aditivos como plantas medicinales, inmunoestimulantes, probióticos y prebióticos, se pueden adicionar a la dieta del camarón, por ser el medio más prometedor para influir en la salud del organismo cultivado e inducir resistencia al estrés y agentes causantes de enfermedades. Para el uso eficiente de los aditivos inmunoestimulantes en los cultivos acuícolas es indispensable el estudio del sistema inmune de las especies, debido a que es una herramienta útil para el diseño de estrategias que permiten mejorar la respuesta de defensa del hospedero contra patógenos potenciales. El presente estudio se enfoca en una revisión actualizada del uso de los diferentes aditivos inmunoestimulantes en el cultivo del camarón blanco y su eficiencia para prevenir enfermedades infecciosas de origen microbiano y viral.

Palabras clave: Inmunoestimulantes, probióticos, invertebrados, acuicultura.

Introducción

La acuicultura moderna provee de medios efectivos para la producción intensiva de organismos acuáticos bajo condiciones controladas. Tal industria, con inversión y ganancias multimillonarias, crece rápidamente (Bondad-Reantaso *et al.* 2012). El incremento de producción en granjas camaroneras con sistemas de siembra semi-intensivo e intensivos incrementa la posibilidad de introducción y transmisión de enfermedades; dado a un descontrol del crecimiento microbiano por la disponibilidad de los nutrientes y óptimos factores de crecimiento para microorganismos nocivos, además de las altas densidades de organismos cultivados causan condiciones de estresantes en organismos facilitando el riesgo de epizootias en los cultivos.

La mayor amenaza para el cultivo del camarón son las diferentes enfermedades que atacan a esta especie, tales como: Síndrome de Taura (ST), Enfermedad de la Mancha Blanca (EMB), Hepatopancreatitis necrotizante (NHP), Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHD), Enfermedad de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV), Enfermedad de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV), pero en la actualidad siguen apareciendo nuevas enfermedades y debido al desconocimiento de éstas, causan grandes mortalidades en los cultivos tal es el caso la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática aguda enfermedad denominada “Síndrome de la mortalidad temprana del camarón (EMS, por sus siglas en inglés)” Conocida también como Síndrome de la necrosis aguda del hepatopáncreas del camarón (AHPNS, por sus siglas en inglés). En general, las enfermedades de cualquier índole (viral, microbiana, fisiológica, parasitaria, entre otras) que presentan los organismos cultivados, siempre han sido notadas una vez que se establecen y causan grandes pérdidas en la producción (COESAES, 2013).

La sintomatología de las enfermedades es muy similar, el organismo presenta reducción en el consumo de alimento, letargia, agotamiento, manchas (rojas, café, negras), músculo melanizado, cutícula melanizada, cambio de color en hepatopáncreas y/o atrofia; en el caso de montajes en fresco al microscopio se observa necrosis. En la presencia de epicomensales se observa un cambio de coloración en las branquias (amarillo, café, verde o

negro), que depende del tipo de componente adherido a ellas. Se puede extender esta coloración a toda la superficie del animal en casos muy severos dando apariencia de “peluche” o “algodonoso” (Cuéllar, 2013). El diagnóstico de enfermedades va más allá de la sintomatología y características físicas, incorpora también el conocimiento de su etiología, el conocimiento del agente causal, de la fisiopatología, el diagnóstico, tratamiento, pronóstico y potencialmente las ideas para minimizar, combatir y hasta erradicar una enfermedad en particular.

El uso de antibióticos en sistemas acuáticos es para mantener la salud de los organismos, sin embargo, según (Ruiz *et al.* 2006), el uso excesivo e inapropiado de antibacterianos es el factor más importante en la aparición y diseminación de la resistencia, al crear una presión de selección que favorece la supervivencia de patógenos resistentes a los antibacterianos, también influyen la falta de diagnósticos etiológicos y de información que oriente los tratamientos empíricos y normas severas que restrinjan el uso indiscriminado de fármacos, por ende un aumento en los costos de tratamiento y en casos extremos la pérdida total del cultivo.

Uno de los factores principales para obtener un alimento acuícola de buena calidad, es la formulación de los componentes y calidad de la materia prima (Achupallas *et al.* 2000). En la mayoría de los casos, las fuentes de Carbono/Nitrógeno (C/N) son indispensables para un óptimo crecimiento en los primeros estadios de vida donde el organismo se encuentra en un constante crecimiento por lo que la adición de proteína en la dieta debe ser elevada. Sin embargo, sí la fuente de proteína de la materia prima es compleja, el organismo debe transformar estos nutrientes empleando una serie de enzimas para hacerlos biodisponibles y que puedan ser asimilados por él. El uso de microorganismos probióticos, como levaduras y bacterias, aumenta el peso y la talla del organismo que coloniza atribuyendo esta respuesta a la fermentación de los alimentos al sintetizar a las enzimas responsables de hidrólisis, como proteasas, amilasas, entre otras, ayudando en el aumento de la digestibilidad de fibras y proteínas. Hay una mejor absorción en los nutrientes formulados en el organismo, el cual gana peso y genera mayores ganancias económicas (García *et al.* 2012).

A pesar de que hoy en día la infraestructura empleada en la acuicultura va de la mano para que los organismos tengan las condiciones óptimas para su crecimiento, tanto ambientales como nutricionales, uno de los principales retos es la calidad en la producción de organismos acuáticos, por lo que es necesario reducir al mínimo el uso de antibióticos y reemplazarlo con el empleo de agentes con propiedades profilácticas, los cuales han demostrado ventajas significativas (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014). La aplicación de levaduras y bacterias de origen marino en cultivos acuícolas aporta nutrientes y además sus derivados de paredes celulares confieren potencial probiótico con efectos que incrementan los parámetros productivos; mejoran los procesos digestivos, modulan la microbiota intestinal y el estado inmunológico. El sistema inmune del camarón reconoce y desencadena una respuesta ya sea humoral o celular ante diferentes patógenos, es por ello la importancia de mantener un estado inmunológico eficiente de los organismos en cultivo.

Cada día aparecen nuevas enfermedades que causan grandes tasas de mortandad de los organismos cultivados, para ello es necesario contar con herramientas necesarias para activar el sistema inmune de los organismos en cultivo. El interés en la prevención de enfermedades por el uso de inmunoestimulantes ha aumentado, estos alertan al sistema inmune de los organismos incrementando la respuesta a infecciones, haciendo a los organismos más resistentes (Rendón y Balcázar, 2003), diferentes componentes como lipopolisacáridos, péptidoglicanos y β -glucanos, han sido empleados como inmunoestimulantes en camarones (Vargas-Albores *et al.* 1998; Campa-Córdova *et al.* 2010). Los pigmentos antioxidantes como los carotenos producidos por la microalga *Dunaliella* sp. (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014), incrementan la resistencia de *L. vannamei* a infecciones experimentales con WSSV (Medina-Félix *et al.* 2014). Las levaduras han sido usadas como activadores, moduladores y fortificadores del sistema inmune en diversos organismos debido a la presencia de β -glucanos, mananooligosacáridos y otros componentes de la pared celular. Esto sugiere la posibilidad de usar estos microorganismos como inmuno-estimulantes y fuente de bio-productos empleados para ese fin en acuicultura (Zhen-Ming *et al.* 2010).

El presente trabajo se enfoca en la aplicación de agentes biológicos para estudiar la modulación del sistema inmunológico y antioxidante del camarón, con la finalidad de

utilizarlos para la prevención de enfermedades y mejorar la producción en la industria acuícola.

Metodología

Cepas de microorganismos e inmunoestimulantes

Las cepas experimentales fueron obtenidas de la colección de levaduras del Centro Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), siendo utilizadas 8 cepas aisladas de medio marino. *Sympodiomyopsis sp.*, (D1 y N6), *Cronobacter sp.*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kluyveromyces aestuarii*, *Candida maris*, *Geotrichum candidum* y *Curtobacterium sp.* La microalga *Dunaliella sp.* se obtuvo del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) de la Universidad de Sonora. El β -glucano fue obtenido de *Saccharomyces cerevisiae* (Biotec Mackzymal, Tromsø), el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria *Helicobacter coli* (Sigma, L-2630).

Preparación de los tratamientos

Las levaduras fueron cultivadas en 4% de NaCl en medio YPD (Peptona-Dextrosa para levaduras, Sigma, Y1375), con 50 μ g/ml de cloranfenicol y a 30°C durante 24 h. *Dunaliella sp.* se cultivó en medio F/8 (basado en el medio f/2 de Guillard y Ryther, 1962), que contiene una cuarta parte de nitratos y fosfatos necesarios para su óptimo crecimiento. Una vez que alcanzaron su crecimiento máximo se flocculó con sulfato de aluminio (0.15g/l). Posteriormente el concentrado de *Dunaliella sp.* se secó por liofilización para obtener el polvo y elaborar el alimento.

Preparación de patógenos

Se colectaron organismos infectados con WSSV, se tomaron porciones de músculo y se maceraron en solución salina a una relación de 1:6, para después

Campa-Córdova, A. et al. 2017. Uso Profiláctico de Aditivos Inmunoestimulantes en el Cultivo del Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. (Eds), Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 536-555.

centrifugar a 9000 g por 5 min., el sobrenadante se pasó por un filtro de membrana de 0.2 micras y el inóculo resultante se almacenó a -80 °C.

La cepa de *Vibrio parahaemoliticus* se obtuvo por donación del CIIDIR (Sinaloa, México). La bacteria se sembró en agar tripticasa de soya para su reactivación, después de 24 horas se resembraron 30 placas más de las cuales se preparó el inóculo llevado a una absorbancia de 1 y una longitud de onda de 540 nm.

Bioensayo 1. Exposición de juveniles de *L. vannamei* a levaduras vía inmersión

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* (14.25 ± 1.5 g) en grupos de 15 camarones en tanques de fibra de vidrio de 60 L y 28 °C. Los grupos de juveniles fueron expuestos por inmersión cada 48 h a una concentración de 1×10^6 UFC/ml de cada cepa de levadura durante 10 días: 1) Control, sin tratamientos; 2) β -glucano (0.5 mg/ml); 3) LPS (1 μ g/ml); 4) *Kluyveromyces aestuarii*; 5) *Wickerhamomyces anomalus*; 6) *Cronobacter sp.*; 7) *Candida maris*; 8) *Geotrichum candidum*; 9) *Curtobacterium sp.* Se realizó un recambio de agua de 100% a todos los tratamientos. El bioensayo se realizó por triplicado y se tomaron al azar 3 camarones por tanque para extraer hemolinfa a las 24, 48, 72 h y 216 h posteriores a iniciado el bioensayo. Se tomaron muestras de hemolinfa de cada camarón para conteo de hemocitos circulantes (CTH) y 2.0 g de tejido muscular y se almacenaron a -80°C para posteriormente determinar actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD).

Bioensayo 2. Exposición de juveniles de *L. vannamei* a dieta con levaduras

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* (14.25 ± 1.5 g) en grupos de 15 camarones en tanques de fibra de vidrio de 60 l y 28°C. Los grupos de juveniles fueron expuestos vía oral diariamente durante 21 días a una concentración de levadura de 2% incluidas en el alimento: 1) Control, sin tratamientos; 2) β -glucano (2%); 3) *Symptodiomyopsis sp.*, cepa D1 (2%); 4)

Symphodiomyopsis sp., cepa N6 (2%). Se realizó un recambio de agua de 100% a todos los tanques. El bioensayo se realizó por triplicado y se tomaron al azar 3 camarones por tanque cada 7 días. Se tomaron muestras de hemolinfa de cada camarón para conteo de hemocitos circulantes (CTH).

Bioensayo 3. Exposición de juveniles de *L. vannamei* a dietas con *Dunalliella sp.* e infección con patógenos.

Se utilizaron juveniles de *L. vannamei* (6.0 ± 0.5 g) en grupos de 15 camarones en tanques de fibra de vidrio de 60 l y temperatura controlada de 28°C por triplicado. Los grupos de juveniles fueron expuestos vía oral diariamente a dos raciones diarias de la microalga incluida en el alimento: 1) Control, sin tratamientos; 2) *Dunalliella sp* (1%); 3) *Dunalliella sp* (1.5 %); 4) *Dunalliella sp* (2%); 5) *Dunalliella sp* (2.5 %); *Dunalliella sp* (3 %). Se realizó recambio de agua diario de 100% a todos los tanques. El bioensayo se mantuvo durante 30 días y posteriormente los camarones se infectaron por alimentación forzada utilizando un inóculo de WSSV; se tomaron al azar 3 camarones por tanque para extraer muestras de hemolinfa a los tiempos 0, 24, 48, 72, 120 y 144 horas post infección (hpi). Posterior a los 30 días de administración diaria de los tratamientos, los juveniles se infectaron con *V. parahaemolyticus* y se tomaron al azar 3 camarones por tanque para extraer hemolinfa a las 48 horas post infección (hpi).

Obtención de hemolinfa

Se tomaron 100 µl de hemolinfa de la base del quinto par de pereiópodos en una jeringa para insulina, de 1 ml que contenía 400 µl de anticoagulante de citrato trisodico. Las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 9000 g por 5 min para separar el plasma de los hemocitos.

Cuenta total de hemocitos

Antes de centrifugar las muestras de hemolinfa se tomaron 10 µl de cada una de las muestras y se les agregó anticoagulante al 20% de formol para su conteo al microscopio con un hematocitometro, en donde se aplica la siguiente fórmula para obtener el número de hemocitos por mililitro y se multiplico por el factor de dilución.

$$\text{hemocitos por mL} = \frac{\text{hemocitos contados}}{\text{numero de cuadros contados}} \times 1000$$

Actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD se determinó por el método descrito por Reyes-Becerril et al. (2008) utilizando NBT en presencia de riboflavina. Se colocaron 10 µl v/v de hemolinfa y buffer fosfatos de potasio (50 mM, pH 7.8) con 200 µl de la mezcla de reacción (0.1 mM EDTA, 13 µM metionina, 0.75 mM NBT, 20 µM riboflavina, 50 mM buffer de fosfatos, pH 7.8). Esta solución fue expuesta a luz fluorescente (1 min) o cuando el control lograra una densidad óptica de 0.2-0.25 a 560 nm.

Cuantificación de proteína (CP)

La CP en los hemocitos provenientes de la hemolinfa (mg/mL) se determinó en un lector de placa y una prueba de micro-determinación de proteína (Bio-Rad, USDA) realizándose la lectura a una absorbancia de 595 nm (Miles *et al.* 2001). Se efectuó una curva a partir de los reactivos estándares que posee la prueba antes señalada.

Análisis Estadísticos

Se hizo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando la prueba F para analizar las diferencias entre tratamientos y controles. Los valores de $F < 0.05$ son considerados significativamente diferentes. Cuando existieron diferencias significativas, se utilizó un análisis a posteriori, usando la prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($P < 0.05$).

Resultados

En la Figura 1 se muestran los resultados de hemocitos circulantes en juveniles tratados con microorganismos benéficos. Se observa incremento significativo ($P < 0.05$) en juveniles expuestos a LPS y *Wickerhamomyces* sp. a las 24 h de cultivo respecto al grupo control. A las 48 h, se registraron incrementos significativos en CTH en los grupos de camarones expuestos a *C. cretensis* y *Wickerhamomyces* sp. A las 72 h se muestra incremento significativo en *C. cretensis*, *Wickerhamomyces* sp. y *Cronobacter* sp. muestra incremento significativo en *C. cretensis*, *Wickerhamomyces* sp. y *Cronobacter* sp.

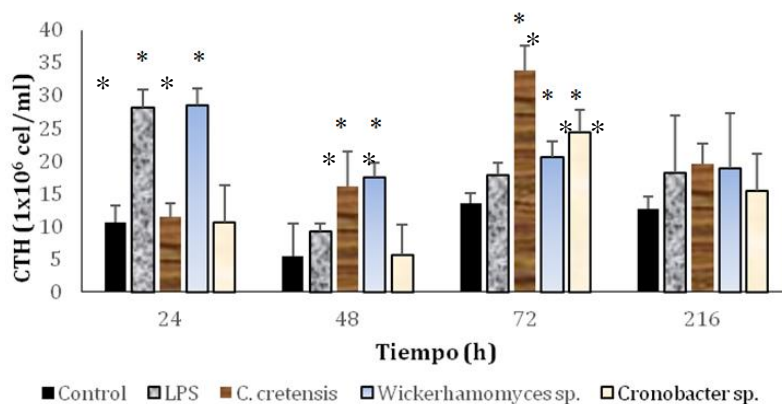


Figura 1. Hemocitos circulantes en juveniles de camarón blanco expuestos cada 48 h a una concentración de 1×10^6 UFC/ml de: 1) Lipopolisacárido (LPS; $1 \mu\text{g/ml}$); 2) *Candida cretensis*; 3) *Wickerhamomyces anomalus*; 4) *Cronobacter* sp. (*) Significativo ($P < 0.05$) respecto al grupo control.

Campa-Córdova, A. et al. 2017. Uso Profiláctico de Aditivos Inmunoestimulantes en el Cultivo del Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. (Eds), Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuícola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 536-555.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se muestra en la Figura 2. Se observa incremento significativo ($P<0.05$) en laminarina a las 24 y 72 h posteriores al inicio del cultivo. La levadura *G. geotrichum* incrementó la actividad SOD en músculo de camarón a las 24 h y 72 h, *Candida maris* a las 48 h y *Curtobacterium* sp. a las 72 h respecto al grupo control.

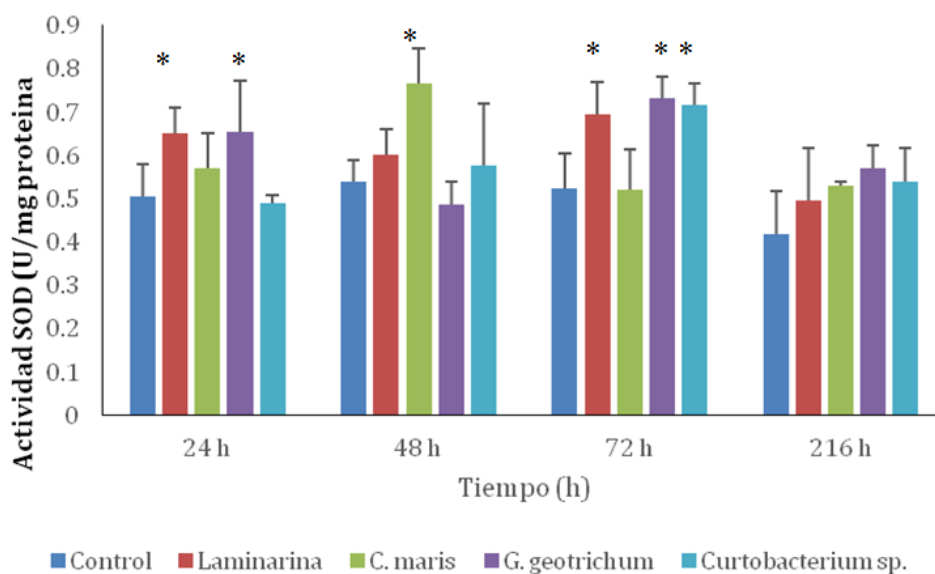


Figura 2. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en músculo de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos cada 48 h una concentración de 1×10^6 UFC/ml de: 1) laminarina (0.5 mg/ml); 2) *Candida maris*; 3) *Geotrichum candidum*; 4) *Curtobacterium* sp. (*). Significativo ($P<0.05$) respecto al grupo control.

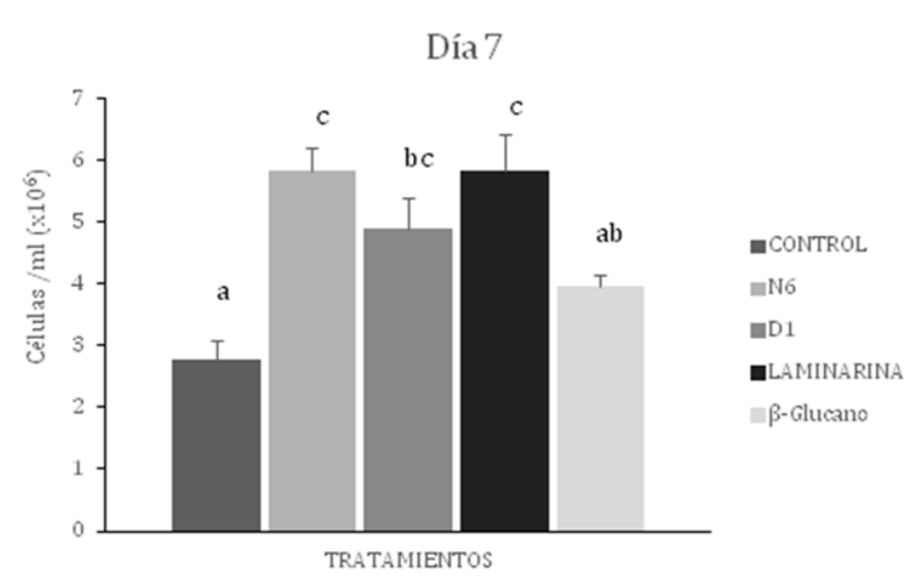


Figura 3. Concentración de hemocitos circulantes en juveniles de camarón blanco al día 7 de cultivo expuestos durante 21 días a una dieta con dos diferentes cepas de *Symphodiomyopsis sp.*: 1) Control; 2) levadura, Cepa N6 (2%); 3) levadura, cepa D1 (2%); 4) Laminarina (0.5 mg/g); 5) β-Glucano comercial (2%).

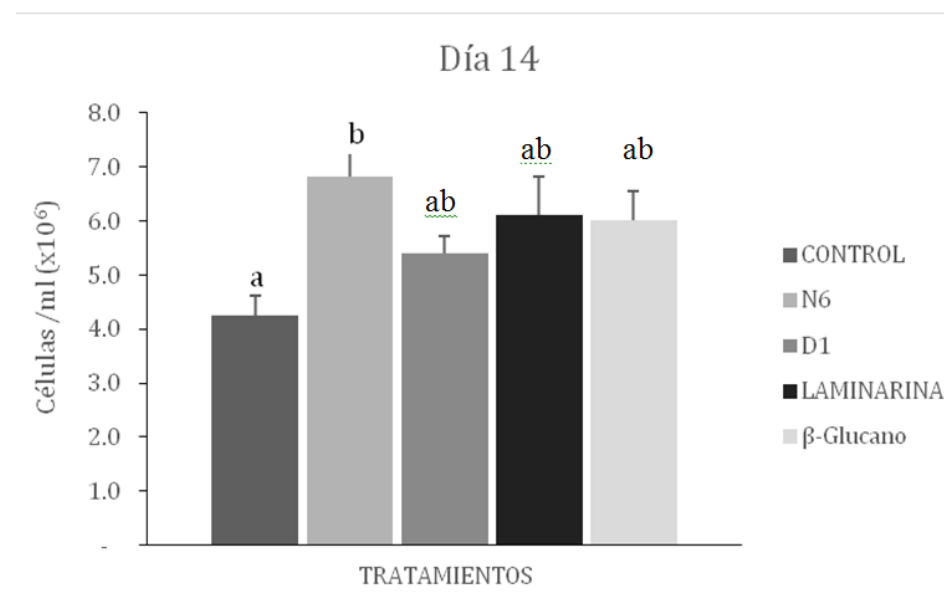


Figura 4. Concentración de hemocitos circulantes en juveniles de camarón blanco al día 14 de cultivo expuestos durante 21 días a una dieta con dos diferentes cepas de *Symphodiomyopsis sp.*: 1) Control; 2) levadura, Cepa N6 (2%); 3) levadura, cepa D1 (2%); 4) Laminarina (0.5 mg/g); 5) β-Glucano comercial (2%).

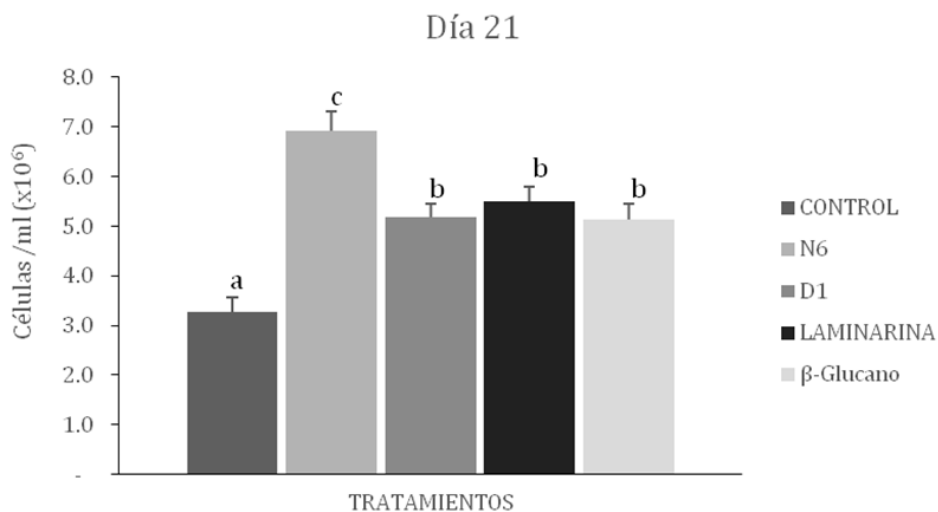


Figura 5. Concentración de hemocitos circulantes en juveniles de camarón blanco al día 21 de cultivo expuestos durante 21 días a una dieta con dos diferentes cepas de *Sympodiomyopsis sp.*: 1) Control; 2) levadura, Cepa N6 (2%); 3) levadura, cepa D1 (2%); 4) Laminarina (0.5 mg/g); 5) β -Glucano comercial (2%).

La Figura 6 muestra la supervivencia de camarón alimentado con dietas conteniendo 1% y 2% de la microalga *Dunaliella sp.* e infectados con el virus de la mancha blanca. Se observa supervivencia de 83% con el 1% de *Dunaliella sp.*, seguido de la dieta con el 2% con una supervivencia de 81%, seguido de la dieta control con 56%. El grupo blanco (sin infección) no registró mortalidad.

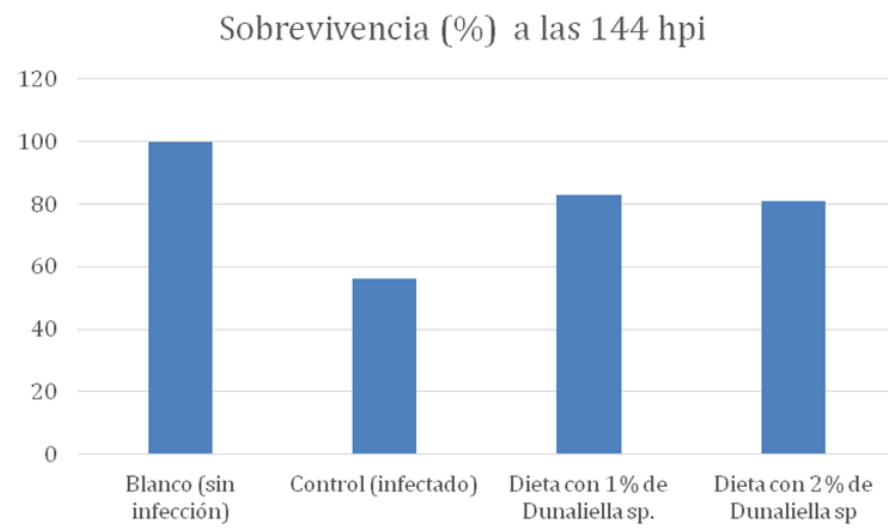


Figura 6. Supervivencia de juveniles de camarón blanco expuestos a dietas con *Dunaliella* sp. durante 30 días e infectados con WSSV.

En la Figura 7 se observa la supervivencia de camarón alimentado con dietas conteniendo 1.5, 2, 2.5 y 3% de la microalga *Dunaliella* sp. e infectados con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus*. Se observa mayor supervivencia con la dieta al 3% (30.9%) seguida por la dieta con el 1.5% de *Dunaliella* sp. (20.9%) y una supervivencia del 13.7% en el grupo control infectado. El grupo control (sin infección) no registró mortalidad.

supervivencia de *L. vannamei*

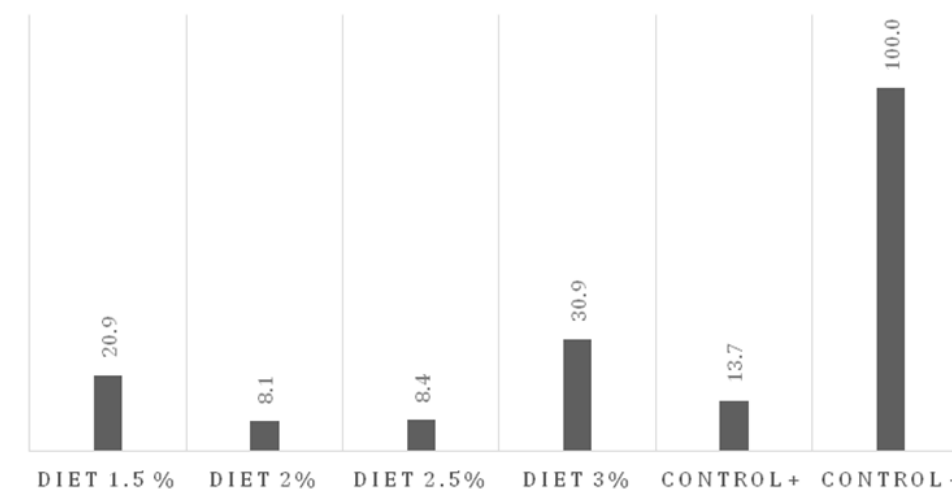


Figura 7. Supervivencia de juveniles de camarón blanco a las 48 h posteriores a la infección con *V. parahaemolyticus* expuestos previamente a dietas con *Dunalliella* sp. durante 30 días.

Discusion

Las levaduras son hongos unicelulares que han llamado la atención por su potencial para ser usados en la obtención de bio-productos tales como enzimas, toxinas, glucanos. Los immuno-estimulantes por su parte son productos extraídos de las paredes de bacterias Gram negativas y/o positivas, hongos, y algas (glucanos, lipopolisacáridos, péptidoglicanos, etc.) y los cuales tienen la cualidad de activar al sistema inmune no específico (Reyes-Becerril *et al.* 2008). En la actualidad existen diversos trabajos de probióticos en acuicultura, algunos de ellos son los realizados por (Douillet y Langdon, 1994), quienes utilizaron un tipo de levadura (CA2) para incrementar la supervivencia de larvas de *Crassostrea gigas*. (Tovar *et al.* 2000) con lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), utilizando dos levaduras, como promotores de crecimiento (*S. cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*), señalan que encontraron un menor crecimiento, con las dietas que contenían ambas levaduras, pero lo atribuyen a la textura de las levaduras combinadas. Por otra parte (Reyes-Becerril *et al.* 2008) indica que el

uso de *Debaryomyces hansenii* cepa 8389 estimuló los parámetros del sistema inmune innato y específico en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* y la dorada *Sparus aurata*.

El entendimiento de la función de los hemocitos es importante en la investigación del sistema de defensa de crustáceos, particularmente la capacidad para generar respuestas oxidativas y antioxidantes (Roch 1999) y así poder caracterizar las funciones inmunes básicas en nuevas especies de estudio. Al exponer a los camarones a diferentes cepas de microorganismos cada 48 h durante 10 días y utilizando un β -glucano y un LPS como controles positivos, se observaron tres incrementos en los hemocitos circulantes, a las 24, 48 y 72 horas después de iniciado el bioensayo. Estos incrementos en la respuesta inmune del camarón han sido reportados en otros estudios. Karunasagar *et al.* (1999) utilizó β -1,3 glucano en *P. monodon*, encontrando un pico en la producción de radicales libres de oxígeno (ROI) a las 48 horas posteriores a la administración oral. El incremento en CTH está relacionado con el estatus nutricional del camarón. Le Moullac *et al.* (1999) encontró un incremento significativo en peso alimentando al camarón con una dieta conteniendo 54% de proteína comparada con una dieta conteniendo 38%. La resistencia del camarón a la infección generada por *V. penaeicida* fue mejorada entre el 5-30%. Sajeevan *et al.* (2009) observó que las células completas de levaduras le proporcionaron a *F. indicus* un mayor CTH que el uso de productos purificados (glucanos). Esto sugiere que las células completas pueden tener otros elementos que fortalezcan la respuesta inmune (aminoácidos, vitaminas, minerales). En el presente trabajo se observó un aumento en los hemocitos circulantes de camarones cuando estos fueron expuestos a diferentes cepas de levaduras a una dosis de 1×10^6 UFC/ml y LPS a una concentración de 1 μ g/ml. Se muestra también cómo diferentes cepas de levadura pueden activar los hemocitos en camarón a diferente tiempo de exposición.

El incremento en CTH está relacionado con el estatus nutricional del camarón. Le Moullac *et al.* (1999) encontraron un incremento significativo en peso alimentando al camarón con una dieta conteniendo 54% de proteína comparada con una dieta conteniendo 38%. La resistencia del camarón a la infección generada por *V. penaeicida* fue mejorada entre el 5-

30%. La inclusión de levaduras y un β -glucano comercial en el alimento para camarón y la aplicación de una dosis diaria de 2%, incrementó la concentración de hemocitos circulantes en los camarones durante 21 días. Este estudio no explora cuánto tiempo se mantiene la respuesta inmune en camarón como respuesta a una activación con inmunoestimulantes y levaduras. Sin embargo, Sung et al. (1994) demostraron que la supervivencia de *P. monodon* puede ser mejorada cuando es activada (3 horas de inmersión con glucano) 18 días antes del reto con la bacteria patógena *V. vulnificus*. En este estudio, la respuesta inmune del camarón fue activada vía inmersión y vía oral. Itami et al. (1998) reportaron que el uso de inmunoestimulantes por inyección, aspersion e inmersión, protegen al camarón contra infecciones experimentales. Sajeevan et al. (2006) siguieron que las células completas de levaduras pueden tener otros elementos que fortalezcan la respuesta inmune (aminoácidos, vitaminas, minerales) que no aportan los productos purificados (glucanos, lipopolisacáridos).

Las levaduras han sido reportadas como una fuente importante de enzima SOD (Reyes-Becerril et al. 2008). Las superóxido dismutasas (SODs), son una de las principales rutas de defensa antioxidante en respuesta a estrés oxidativo (Guertler et al. 2010). En este estudio, la adición por inmersión cada 48 h de levaduras y laminarina (β -1,3 glucano) como control positivo (Guertler et al. 2010), registraron un incremento en la actividad de la SOD en músculo de juveniles de *L. vannamei* a las 24, 48 y 72 h después de iniciado el bioensayo. Los inmunoestimulantes utilizados, incrementaron la actividad antioxidante en músculo a las 24 h posteriores a su aplicación. Guertler et al. (2010) señalan que la aplicación de laminarina en *Astacus astacus*, *F. paulensis*, *L. schmitti*, *L. vannamei* generó la activación de la SOD y de moléculas asociadas al sistema inmune de estos organismos. El incremento en los niveles antioxidantes en los hemocitos estimulados (dentro de las primeras 24 h), se considera una respuesta a los cambios en la composición lipídica de las membranas celulares, y de mejorar la producción de factores de activación celular como citocinas y chaperoninas, quienes pueden mejorar la capacidad fagocítica de los hemocitos (Sajeevan et al., 2006). Por tal motivo, se espera que el incremento en CTH y en los niveles antioxidantes en las células, como consecuencia de una exposición previa del camarón blanco a inmunoestimulantes,

generen una respuesta inmune mas fuerte contra los patógenos potenciales (Downs *et al.* 2001).

La administración de una dieta rica en carotenoides tiene un efecto protector en los camarones con una mejora en el crecimiento, reducción en la tasa de mortalidad y mejor rendimiento de los organismos, por lo tanto la administración de carotenoides es esencial para el bienestar del cultivo (Arredondo-Figueroa *et al.* 2003). En estudios realizados por Medina-Félix *et al.* (2014) se encontró que cuando se aplica una dieta rica en antioxidantes se obtiene una respuesta favorable por parte del camarón blanco aumentando la supervivencia en un 80%. La inclusión de *Dunaliella* sp. a la dieta de *Litopenaeus vannamei* tuvo un efecto positivo en cuanto a supervivencia, con un 83% en los camarones alimentados durante 30 días con 1% de microalga, 81% en los juveniles alimentados con 2% y el grupo control (no tratado e infectado) con el 56%. López-Elias *et al.* (2016) reportaron que la actividad del sistema inmune de *L. vannamei* es activado por la inclusión de *Dunaliella* sp. en el alimento de camarones, obteniendo incrementos significativos previo a una infección viral en la actividad enzimática de lisozima, aglutinina y fenoloxidasa.

La inclusión de *Dunaliella* spp. al 3% en la dieta para juveniles de *Litopenaeus vannamei* mostró una mejor supervivencia (30.9%) contra una una infección experimental con *V. parahaemolyticus*, seguida por *Dunaliella* spp. incluida al 1.5% con una supervivencia de 25.3% y el control con la menor supervivencia (10,2%). Madhumathi & Rengasamy (2011) evaluaron *Dunaliella salina* a 1 y 2% en dietas para *Penaeus monodon*, concluyendo que esta microalga es un potencial agente profiláctico contra infecciones experimentales con WSSV y por incrementar la respuesta inmune en camarón.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que algunas cepas de levaduras, microalgas y otros géneros de microorganismos benéficos pueden ser empleadas para incrementan la proliferación de hemocitos circulantes, la actividad antioxidante y como potenciales profilácticos en juveniles de camarón blanco. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para entender los procesos relacionados al sistema inmune de camarón con el propósito de disminuir la proliferación de enfermedades y aumentar la supervivencia y producción de camarón.

Referencias Bibliograficas

- Achupallas J (2000) Tecnología de alimentos para camarón. In: Civera-Cerecedo R, Pérez-Estrada CJ, Ricque-Marie D, Cruz-Suárez LE (ed) *Avances en Nutrición Acuícola IV*. pp 520-525. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México
- Arredondo-Figueroa JL, Pedroza-Islas R, Ponce-Palafox JT, Vernon-Carter EJ (2003) Pigmentación del camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) con carotenoides de Chile (*Capsicum annuum*), esterificados y saponificados, en comparación con la astaxantina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **2**:101-108.
- Bondad-Reantaso M, Subasinghe R, Josupeit H, Cai J, Zhou X. (2012) The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. *Journal of Invertebrate Pathology* **110**: 158-165.
- Campa-Córdova AI, Hernández-Saavedra NY, Philippis R De, Ascencio F (2002) Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* **12**:353-366.
- Campa-Córdova A, Hernández-Salmerón A, Ascencio-Valle F, Aguirre-Guzmán G (2010) Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunostimulantes y probióticos. In: Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J (ed). *Avances en Nutrición Acuícola-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 567-587 pp. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México,
- COSAES (2013) Informe de Sanidad de Camarón 2013, Comité de Sanidad Acuícola Del Estado de Sonora, 1-98 pp.
- Cuéllar-Anjel J. (2013). Enfermedades parasitarias en camarones. Disponible en internet <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/parasitic-disease-es.pdf> consultado el día 4 de enero del 2017.
- Downs C, Fauth JE, Woodley CM (2001) Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* **3**:380-397.
- García Sorrondegui M, López de Varona Y, Carcassés Vera A (2012). Empleo de Probióticos en los Animales. *Revista Engormix*, pp 1-8
- Guertler C, Schleder DD, Barracco MA, Perazzolo LM (2010) Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquaculture Research* **41**:1082-1088.

- Itami T, Asano M, Tokushige K, Kubono K, Nakagawa A, Takeno N, Nishimura H, Maeda M, Kondo M, Takahashi Y (1998) Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* **164**: 277-288.
- Karunasagar I, Otta SK, Devaraj TN, Shubha G, Iddya K (1999) Immunostimulation of *Penaeus monodon* through the oral route. *Workshop: Shrimp immunity and disease control*. Thailand.
- Le Moullac G, Soyez C, Saulnier D, Ansquer D, Avarre JC, Levy P (1998) Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol* **8**:621-629.
- Le Moullac G, Rodriguez J, Saulnier D, Cuzon G, Chim L (1999) Immunomodulation: nutritional aspects and immunostimulation. *IFREMER-Aquacop, Taravao, Tahiti. CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador. Forum*.
- Lomelí-Ortega C, Martínez-Díaz S (2014) Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture* **434**: 208-211.
- López-Elías JA, Medina-Félix D, Campa-Córdova AI, Martínez-Córdova LR, Hernández-López J, Mendoza-Cano JF, Rivas-Vega ME (2016) Optimización de la supervivencia y respuesta inmune de *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas ricas en carotenos e infectado con el síndrome de la mancha blanca. *Latin American Journal of Aquatic Research* **44**: 305-312.
- Medina-Félix D, López-Elías JA, Martínez-Córdova L, López-Torres M, Hernández-López J, Mendoza-Cano F (2014) Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. *Journal of Invertebrate Pathology* **117**: 9-12.
- Madhumaathi M, Rengasamy R (2011) Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. *International Journal of Environmental Science and Technology* **3**:7249-7259.
- Miles DJC, Polchana J, Lilley JH, Kanchanakhan S, Thompson KD, Adams A. (2001) Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture* **195**:1-15.
- Rendón L, Balcázar JL (2003) Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances, *AquaTIC* **19**:27-33.
- Reyes-Becerril M, Tovar-Ramirez D, Ascencio-Valle F, Civera-Cerecedo R, Gracia-López V, Barbosa-Solomieu V (2008) Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture* **280**: 39-44.
- Roch P (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* **172**:125-145.

- Ruiz J, Suarez M, Uribe C (2006) Susceptibilidad antimicrobiana in vitro de cepas de *Salmonella* spp. en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquía. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias* **19**:297-305.
- Sajeevan TP, Rosamma P, Bright-Singh IS (2006) Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* **257**: 150–155.
- Sung HH, Kou GH, Song L (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* **29**: 11-17.
- Vargas-Albores F, Hernández-López J, Gollas-Galván T, Montañón-Pérez K, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G (1998) Activation of shrimp cellular defense functions by microbial products. In: Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. 161-166 pp. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok,.
- Zhen-Ming C, Liu G, Zhao S, Li J, Peng Y (2010) Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1227–1241.