

UNIVERSIDAD ESTATAL DE SONORA

UNIDAD ACADÉMICA NAVOJOA



Evaluación de *Lactobacillus rhamnosus* para ser utilizado como probiótico en contra de *Vibrio parahaemolyticus* en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOSUSTENTABLES**

Presenta:

Everardo Quijada González

CONSTANCIA DE REVISIÓN DE TESIS POR EL SISTEMA ANTI PLAGIO

El coordinador de la Maestría en Sistemas de Producción Biosustentables hace constar que la tesis titulada: “**Evaluación de *Lactobacillus rhamnosus* para ser utilizado como probiótico en contra de *Vibrio parahaemolyticus* en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”**, presentada por el estudiante **Everardo Quijada González** cumple satisfactoriamente la revisión por el Sistema Anti Plagio **Copyleaks**, con un porcentaje de autenticidad del **88%** y una coincidencia del **12%**. Se expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Martha Elisa Rivas V.

Dra. Martha Elisa Rivas Vega
Coordinador de la Maestría en
Sistemas de Producción
Biosustentable

**UES**
Universidad Estatal de Sonora
La Fuerza del Saber Estimulará mi Espíritu
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
UNIDAD ACADÉMICA NAVOJOA

ACTA DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “**Evaluación de *Lactobacillus rhamnosus* para ser utilizado como probiótico en contra de *Vibrio parahaemolyticus* en el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*”**”, presentada por **Everardo Quijada González**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Sistemas de Producción Biosustentables.



Dr. Anselmo Miranda Baeza
Director

Martha Elisa Rivas V.

Dra. Martha Elisa Rivas Vega
Sinodal



Dr. Pablo Sergio Osuna Amarillas
Sinodal

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Manuel Quijada Rodríguez, que, aunque no está, siempre creyó en mí y en lo que podía lograr.

A mi esposa Teresa y a mis hijos Coral Abril y Jesús Everardo, por su amor, paciencia y comprensión. Los amo, son el motor que impulsa mi vida.

A toda mi familia, amigos y seres queridos, por su apoyo y buenos deseos.

AGRADECIMIENTOS

A dios por darme bendición, protección y dirección.

A la Universidad Estatal de Sonora, a su personal académico y administrativo por la atención recibida y las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por su beca otorgada para cursar el posgrado (905666).

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Anselmo Miranda Baeza por todo su apoyo durante la realización de la tesis. Dra. Martha Elisa Rivas Vega y Dr. Pablo Sergio Osuna Amarillas, por sus atinados comentarios y sugerencias.

Al Laboratorio de Tecnologías de Cultivo de Organismos Acuáticos por el uso sus instalaciones y de su equipo.

Al M.C. Jesús Lizárraga Armenta por el apoyo recibido durante el desarrollo de los bioensayos.

AL Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES), por las facilidades otorgadas para realizar los estudios de Maestría.

Al Dr. José Cuauhtémoc Ibarra Gámez y al Dr. Ricardo Sánchez Díaz, del Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), por la donación de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus*.

A cada uno de mis maestros que transmitieron sus conocimientos con dedicación y profesionalismo.

RESUMEN

El uso correcto de los probióticos puede presentar mejoras significativas en el cultivo de camarón, evitando el uso de antibióticos, y contribuyendo a la sustentabilidad de esta actividad. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la salinidad y de la temperatura en el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y de *Vibrio parahaemolyticus* y determinar si la bacteria probiótica inhibe a la patógena en condiciones controladas. Se obtuvieron las curvas de absorbancia vs concentración a 620 nm. Posteriormente se realizaron tres experimentos, en el primero se cultivó cada especie en cuatro salinidades (10, 20, 30 y 40 ‰) y dos periodos (24 y 48 h) por triplicado. En el segundo se cultivó por triplicado cada especie en tres temperaturas; 15, 25 y 25 °C y dos periodos (24 y 48 h). El tercer bioensayo, consistió en cultivar por triplicado ambas especies en el mismo recipiente a diferentes relaciones de *Vibrio parahaemolyticus*: *Lactobacillus rhamnosus* (1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000). Las curvas de absorbancia vs concentración indicaron que *Vibrio parahaemolyticus* tuvo más UFC por unidad de absorbancia en comparación con *Lactobacillus rhamnosus*. Las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Lactobacillus rhamnosus* mostraron crecimiento en todos los niveles de salinidad y de temperatura utilizados. En todas las condiciones ensayadas *Vibrio parahaemolyticus* tuvo mayor crecimiento en comparación con *Lactobacillus rhamnosus*. La bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* inhibió el crecimiento de la bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus* en 32.6% cuando se utilizó la relación 1:10 y llegó a 81.3% en la relación de 1:10,000. Se concluye que *Lactobacillus rhamnosus* puede ser un buen candidato para ser usado en contra de *Vibrio parahaemolyticus* en el cultivo de camarón blanco.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ACTA DE LIBERACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis	5
I.3 Objetivos	5
II. MATERIALES Y METODOS	7
II.1 Obtención de las bacterias	7
II.2 Obtención de las curvas de absorbancia vs concentración	7
II.3 Determinación del efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las bacterias	8
II.4 Medición del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias	9
II.5 Inhibición de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9
II.6 Procesamiento de la información	9
III. RESULTADOS	11
III.1 Relación de absorbancia vs concentración	11
III.2 Efecto de la salinidad	12
III.3 Efecto de la temperatura	15
III.4 Inhibición de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
IV. DISCUSIÓN	20
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
V.1 Conclusiones	25
V.2 Recomendaciones	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Curva de calibración absorbancia vs concentración para la especie <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	11
2	Curva de calibración absorbancia vs concentración para la especie <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	12
3	Crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cultivado a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h.	13
4	Crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> cultivado a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h.	14
5	Crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cultivado a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h.	16
6	Crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> cultivado a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h.	17
7	Porcentaje de inhibición de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cultivado con diferentes relaciones de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> después de un periodo de incubación de 24 h.	19

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Densidades de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> obtenidas a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h (cultivados a 30 ± 2 °C y pH 7.5; letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, ANOVA de 2 vías, $P<0.5$).	15
2	Densidades de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> obtenidas a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h (cultivados a 35 ‰ y pH 7.5; letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, ANOVA de 2 vías, $P<0.5$).	17
3	Densidades de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> obtenidas en presencia de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> con relaciones de 1:0, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000 (densidad inicial de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> = 10,000 UFC/mL; letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa, ANOVA de una vía $P<0.01$).	18

I. INTRODUCCIÓN

En 2016, la producción mundial de la acuicultura, incluidas las plantas acuáticas, ascendió a 110.2 millones de toneladas (FAO, 2018). En México, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, de la SAGARPA reportó que la producción nacional de camarón en el 2017 fue de 393 mil toneladas (CONAPESCA, 2017).

Hace varios años, el uso de sustancias químicas (antibióticos y otros terapéuticos) se presentaba como la mejor opción para prevenir y controlar los problemas relacionados con enfermedades en el cultivo de camarón. Sin embargo, los efectos adversos ocasionados por la resistencia de las bacterias patógenas y sus repercusiones en la salud humana originaron la búsqueda de nuevas alternativas que permitieran disminuir las pérdidas económicas de los productores, el riesgo en el consumo, y su impacto en el ambiente (Holmström *et al.* 2003; Huerta-Rábago *et al.*, 2019).

En los últimos años, se han realizado varias investigaciones encaminadas al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas para reducir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Los problemas de enfermedades muchas veces son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de ataques bacterianos. La tendencia actual se enfoca en restringir o reducir el uso de antibióticos para evitar la aparición de resistencia bacteriana y disminuir los problemas ambientales. Adicionalmente, para evitar la restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de camarones y su incidencia en la salud humana (Lyle-Fritch, *et al.*, 2006).

La eficacia de los probióticos comerciales para el cultivo de camarón ha sido severamente cuestionada y criticada (Ninawe y Selvin, 2009). En algunos casos las

cepas utilizadas no han sido evaluadas bajo condiciones controladas en las cuales sea posible verificar que son capaces de sobrevivir en el ambiente prevaleciente en los cultivos de camarón.

I.1 Antecedentes.

Respuesta inmune del camarón.

La inmunidad se refiere al estado de resistencia natural o adquirida frente a una determinada enfermedad, así como durante el ataque de un agente tóxico. El camarón cuenta con inmunidad innata, en el cual el sistema humoral y el celular tienen un papel importante en la defensa de organismos patógenos.

La salud de las especies acuáticas depende de la interacción entre el medio ambiente, los patógenos y el hospedador (triada epidemiológica). Inicialmente todo el proceso de defensa inicia en el exoesqueleto, el cual está compuesto de carbonato de calcio y proteínas, y contribuye a diferentes procesos fisiológicos asociados con la respuesta inmune (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

Si esta barrera es rebasada, el patógeno deberá evitar varias acciones desarrolladas en los hemocitos y en el plasma. Los cuales contienen mecanismos para suprimir al patógeno. Si estos fallan, entonces se desarrolla la enfermedad. De manera general, los fagocitos participan en la señalización y la fagocitosis, así mismo los procesos involucrados en la expresión de proteínas plasmáticas, la fenoloxidasas, la tripsina, la α 2-macroglobulina, la lisozima y los péptidos antimicrobianos (Cárcamo-Arechiga *et al.*, 2016).

Uso de bacterias para estimular la respuesta inmune.

Los microorganismos probióticos han sido aprovechados por los humanos desde épocas inmemoriales; tradicionalmente estos se han utilizado en humanos y animales terrestres (Lebeer *et al.*, 2012). Actualmente el uso de probióticos en la producción acuícola se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para mantener la salud de los organismos (Holmström *et al.*, 2003; Zokaeifar *et al.*, 2012).

En el área de la acuicultura, los probióticos han sido definidos como “microorganismos con efectos benéficos sobre el hospedero por la modificación del ambiente huésped-hospedero o la modificación de su comunidad microbiana, por la mejora en la asimilación de alimento o de su valor nutricional, por mejoramiento de la respuesta del hospedero ante enfermedades o por la mejora en la calidad de su medio ambiente” (Vershuere *et al.*, 2000).

Entre los beneficios de los probióticos está la mejora en la calidad del agua del sistema de cultivo y la reducción de concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el agua. (Nimrat *et al.*, 2012). Por otro lado, promueven la salud de los organismos, al hacerlos resistentes a enfermedades y aumentar la sobrevivencia (Xie *et al.*, 2019). La acción de los probióticos se relaciona con la competencia o la inhibición de los microorganismos patógenos. Una vez ingeridos, presentan beneficios para el hospedero ya que participan en la regulación de la permeabilidad del epitelio intestinal, lo que ayuda a las funciones gastrointestinales (Balcázar *et al.*, 2006).

El uso correcto de los probióticos puede presentar mejoras significativas en el cultivo de camarón, evitando el uso de antibióticos, y contribuyendo a la sustentabilidad de esta actividad.

Lactobacillus rhamnosus.

Es una bacteria gram-positiva, en forma de varilla, microaerófila y facultativamente anaeróbica. Puede crecer en forma individual o en cadenas cortas. No forma esporas, ni es móvil y es catalasa-negativa. Es mesófila, pero algunas cepas pueden crecer a temperaturas inferiores a 15 °C o superiores a 40 °C (Valík *et al.*, 2008). Esta especie tiene varias características biológicas que lo convierten en un buen probiótico. Convierte hexosas en ácido láctico y también es capaz de fermentar pentosas. El ácido láctico generalmente se produce hasta 1.5% en presencia de glucosa. En ausencia de glucosa, produce ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y etanol (Jyoti *et al.*, 2003). La especie, *Lactobacillus rhamnosus* ha mostrado resultados prometedores para su uso en organismos acuáticos. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), aumentó la sobrevivencia en presencia de *Aeromonas salmonicida* (Nikoskelainen *et al.*, 2001), y mejoró la respuesta inmune (Panigrahi *et al.*, 2010). En camarón se registró un aumento en los parámetros productivos y mejoró la respuesta inmune (Kumar *et al.*, 2013; Sundaram *et al.*, 2017).

Vibrio parahaemolyticus.

La bacteria *Vibrio parahaemolyticus* es Gram-negativa, habita en ambientes de agua salada. Tiene un solo flagelo polar y es móvil cuando se cultiva en medio líquido (Sudheesh y Xu, 2001).

En la última década *Vibrio parahaemolyticus* ha causado severas mortalidades en los cultivos de camarón de todo el mundo, debido a la enfermedad conocida como necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND). La cual es causada por cepas

altamente virulentas del género *Vibrio*. Estudios recientes han confirmado que es producida por cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbellii*, y es posible que puedan agregarse otras especies o géneros mediante la transferencia de plásmido que codifica las toxinas. Las bacterias infectadas con el plásmido, se alojan en el estómago del camarón y liberan toxinas que lesionan el hepatopáncreas generando desprendimientos celulares masivos (Ahn *et al.*, 2017).

Caracterización de probióticos.

La aplicación de los probióticos en acuicultura está condicionada por las diferencias particulares de las especies de cultivo (ej. microbiota del tracto gastrointestinal) y las condiciones ambientales (principalmente temperatura de cultivo, salinidad y pH).

La presente investigación pretende aportar conocimiento relacionado con el uso de *Lactobacillus rhamnosus* sobre la inhibición *Vibrio parahaemolyticus*, así como su desempeño bajo la influencia de las principales variables ambientales presentes en los estanques de cultivo de camarón.

I.2. Hipótesis.

La bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* es capaz de sobrevivir en las condiciones presentes en los estanques de cultivo de camarón blanco, así como de reducir la tasa de replicación de *Vibrio parahaemolyticus* en condiciones controladas.

I.3. Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la salinidad y de la temperatura en el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y de *Vibrio parahaemolyticus* y determinar si la bacteria probiótica inhibe a la patógena, mediante bioensayos controlados.

Objetivos particulares.

1. Determinar la absorbancia a diferentes concentraciones de *Lactobacillus rhamnosus* y *Vibrio parahemolyticus*, para obtener las curvas de calibración respectivas.
2. Determinar el efecto de la salinidad sobre el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y de *Vibrio parahemolyticus*, mediante bioensayos controlados.
3. Determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y de *Vibrio parahemolyticus*, mediante bioensayos controlados.
4. Determinar el efecto de la densidad de *Lactobacillus rhamnosus* sobre el crecimiento de *Vibrio parahemolyticus* cultivados en conjunto, para determinar el porcentaje de inhibición.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Obtención de las bacterias.

Se obtuvo una cepa comercial de *Lactobacillus rhamnosus* GG (MERCK®). De acuerdo a la etiqueta, cada gramo de polvo liofilizado contiene 1.25×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC). El producto se almacenó en las condiciones indicadas por el fabricante hasta su uso.

La cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus*, fue donada por el Laboratorio de Análisis de Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Antes de cada bioensayo, la cepa fue reactivada en caldo de soya tripticaseina (marca MCD) e incubada por 24 horas a 32 °C.

II.2. Obtención de las curvas de absorbancia vs concentración.

Para determinar la curva de absorbancia, primero se generaron cultivos masivos de cada especie en caldo soya tripticaseina. Los cultivos se realizaron por triplicado en matraces de 250 mL con 200 mL de medio de cultivo. En el caso de *Lactobacillus rhamnosus* se inocularon 0.2 g (1 g/L) de producto liofilizado. En el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, el volumen del inóculo fue de 0.2 mL (1 mL/L) de un cultivo previo (con edad de 24 h). En ambos casos los matraces fueron incubados a 30 °C por un periodo de 24 h.

Finalizado el periodo de cultivo, para cada especie, se tomaron 3 alícuotas de 10 mL, se colocaron en tubos falcón de 15 mL y se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min. Posteriormente los pellets de los tres tubos se resuspendieron en 100 mL de solución salina estéril al 2% (para evitar interferencias con el medio de cultivo durante la medición de la absorbancia). Se tomó una muestra y se determinó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Hach DR 2800. Con base en la densidad inicial se

realizaron las diluciones respectivas para obtener densidades ópticas de 0.125, 0.250, 0.500 y 1.000, a partir de éstas se realizaron siembras por sextuplicado en placas de agar con medio selectivo.

En el caso de *Lactobacillus rhamnosus* se utilizó el agar de recuento en placa (triptona-glucosa-levadura) para bacterias heterotróficas en agua (Atlas, 2010). En el caso de *Vibrio parahaemolyticus* se utilizó el agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS; DIFCO). Las placas fueron incubadas por 24 h a 32 ± 2 °C. Posteriormente se realizó el conteo de las colonias y se relacionaron con las respectivas absorbancias.

II.3. Determinación del efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las bacterias.

Para cada especie se utilizó un diseño factorial con cuatro salinidades (10, 20, 30 y 40 ‰) y dos periodos de cultivo (24 y 48 h) por triplicado. Las unidades experimentales fueron matraces con 200 mL agua de mar estéril ajustada a la salinidad correspondiente (adicionando agua destilada o cloruro de sodio). El pH se ajustó a 7.5, a cada matraz se le agregaron 10 mL de caldo soya tripticaseína como medio nutritivo y fue inoculado con $100,000 \pm 5,000$ cel/mL. La densidad se ajustó con base en las curvas estandarizadas de ABS a 620 nm para cada especie. Los matraces fueron incubados por en periodos de 24 y 48 h, a temperatura de 32 ± 2 °C, después de cada periodo de cultivo se tomaron muestras y se sembraron por triplicado en agar de recuento en placa para *Lactobacillus rhamnosus* y agar TCBS para *Vibrio parahaemolyticus*. Las placas fueron incubadas por 24 h a 32 ± 2 °C y las colonias fueron contabilizadas.

II.4. Medición del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias.

Para cada especie se utilizó un experimento factorial con tres temperaturas (15, 25, 35 °C) y dos periodos de cultivo (24 y 48 h) por triplicado. Las unidades experimentales fueron matraces con 200 mL de agua de mar, inoculados con $100,000 \pm 5,000$ cel/mL). Se agregaron 10 mL de caldo soya tripticaseina (como solución nutritiva). La salinidad se ajustó a 35 ‰ y el pH a 7.5. Los matraces fueron incubados por 24 y 48 h a la temperatura respectiva. Después del periodo de cultivo respectivo, se tomaron muestras de cada matraz y se sembraron por triplicado de acuerdo a lo descrito en el punto II.4.

II.5. Inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*.

Se sembró una densidad constante de *Vibrio parahaemolyticus* y diferentes concentraciones *Lactobacillus rhamnosus*, para obtener por triplicado las siguientes relaciones de densidad; 1:0; 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Las densidades se ajustaron con base en las curvas estandarizadas de ABS a 620 nm.

Se utilizaron tubos de ensaye de 10 mL a cada uno se les agregaron 7 mL de agua de mar (35 ‰) previamente esterilizada con pH de 7.5. A cada tubo se le agregó un mL de caldo soya tripticaseina, como medio nutritivo.

Los tubos fueron incubados por un periodo de 24 h a 30 °C, posteriormente se tomaron muestras de cada uno de ellos y se cultivaron por sextuplicado en agar TCBS, para lo cual se usó una dilución de 1:100. Las placas se incubaron por 24 h a 30 °C.

II.6 Procesamiento de la información.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Se verificó la normalidad y la homocedasticidad de los datos. Se elaboraron graficas de tendencia. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de

dos vías, para evaluar el efecto de la salinidad y de la temperatura. Se realizaron Análisis de varianza de una vía para evaluar la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* (Zar, 1996). En los casos en que la prueba estadística fue significativa ($P < 0.05$) se aplicaron las pruebas a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey. Los datos se procesaron con el software Statistica 5.1 (Statsoft Inc.).

III. RESULTADOS

III.1 Relación de absorbancia vs concentración.

En la curva de calibración de *Vibrio parahaemolyticus*, se determinó que la ABS de 0.125 (620 nm) correspondió a densidades de 230 a 280 x 10⁶ UFC/mL, mientras que en la ABS de 1.00 las densidades estuvieron entre 1,900 y 2,000 x 10⁶ UFC/mL (Figura 1).

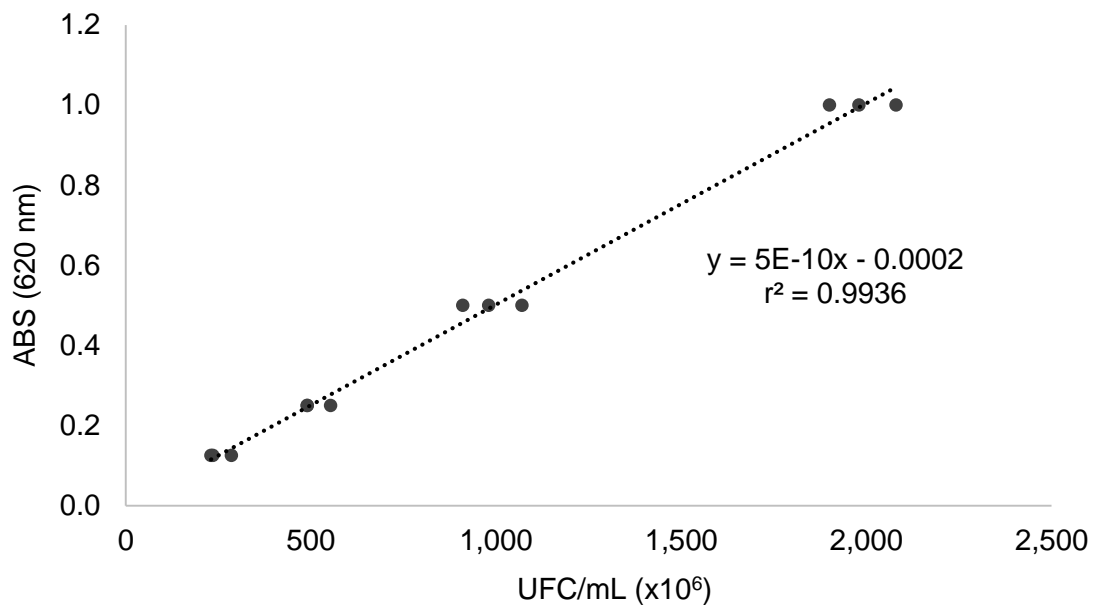


Figura 1. Curva de calibración absorbancia vs concentración para la especie *Vibrio parahaemolyticus*.

En el caso de *Lactobacillus rhamnosus*, la ABS de 0.125 (620 nm) indicó densidades de 145 a 225 x 10⁶ UFC/mL, mientras que en la ABS de 1.00 se alcanzaron concentraciones de 1,795 a 1,920 x 10⁶ UFC/mL (Figura 2).

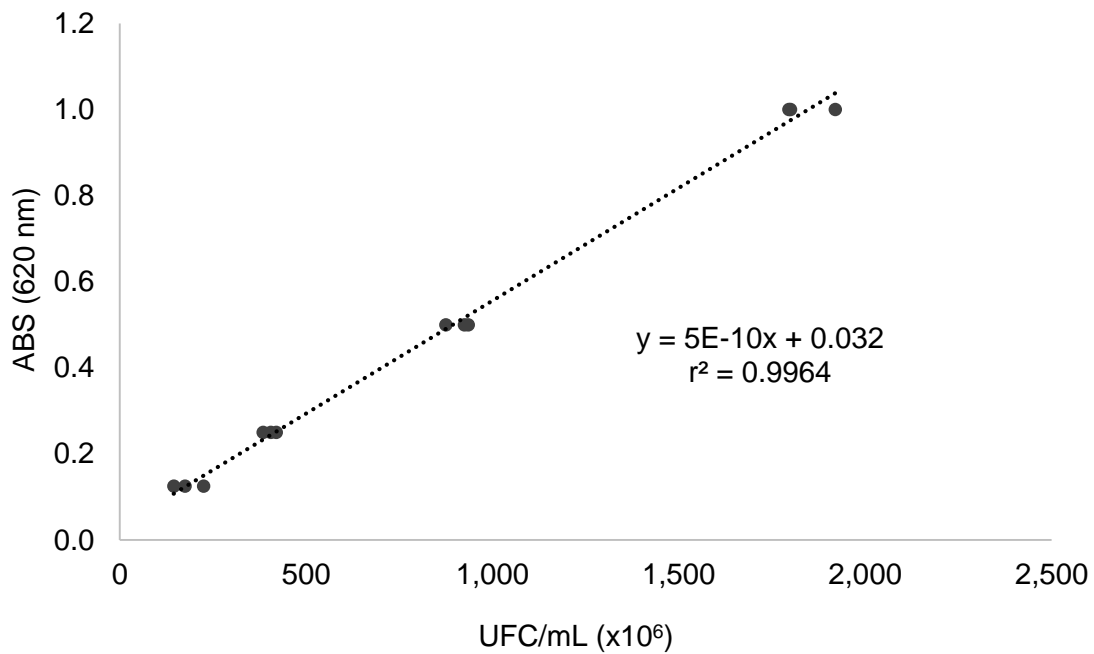


Figura 2. Curva de calibración absorbancia vs concentración para la especie *Lactobacillus rhamnosus*.

III.2 Efecto de la salinidad.

En las primeras 24 h de cultivo la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* alcanzó densidades de 94.3 a 135.7 x 10⁶ UFC/mL (Figura 3). Mientras que a las 48 h en la mayoría de los tratamientos se observaron incrementos significativos, alcanzando concentraciones de 118.0 a 188.0 x 10⁶ UFC/mL. La prueba de ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo debido a la salinidad y al tiempo de cultivo. La menor densidad se registró en 40 ‰ a las 24 h y las mayores densidades se alcanzaron en 20 y 30 ‰ a las 48 h (Tabla 1).

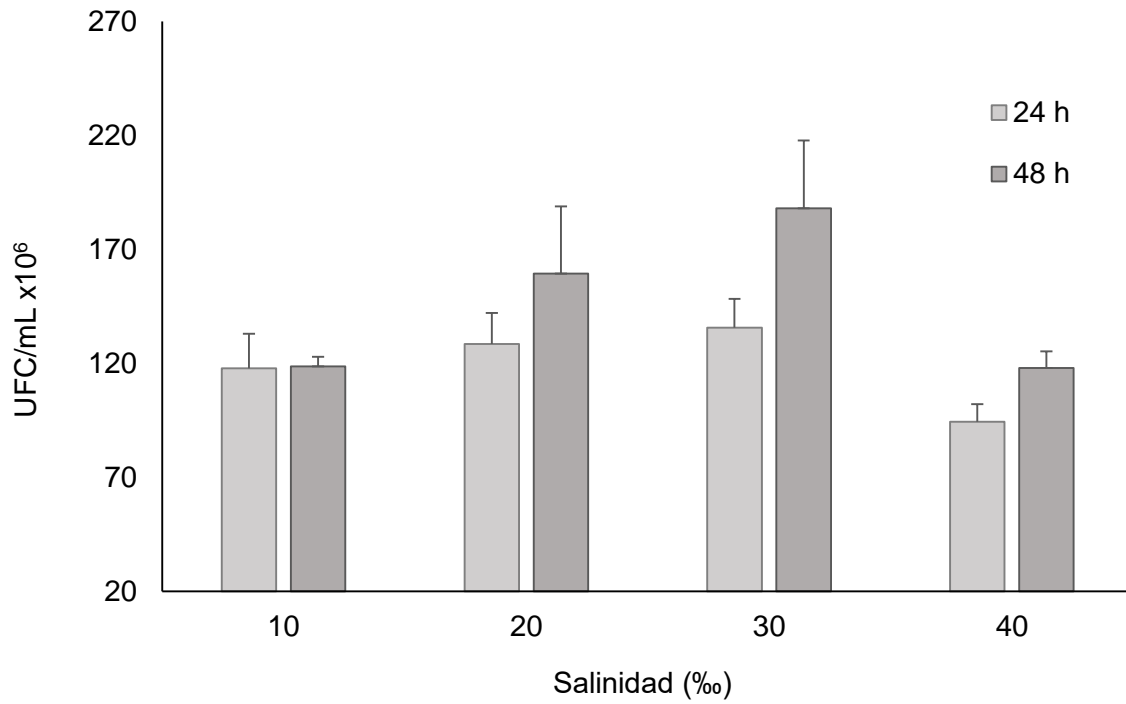


Figura 3. Crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* cultivado a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h.

Por otro lado, *Lactobacillus rhamnosus* alcanzó densidades de 20.4 a 69.5 x 10⁶ UFC/mL en las primeras 24 h de incubación (Figura 4). A las 48 h las densidades incrementaron en todos los tratamientos alcanzando un intervalo de 39.8 a 110.7 x 10⁶ UFC/mL. La prueba de ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo debido a la salinidad y al periodo de cultivo. La menor densidad se registró en 10 ‰ a las 24 h de cultivo, mientras que las mayores concentraciones se alcanzaron en 20 y 30 ‰ a las 48 h (Tabla 1).

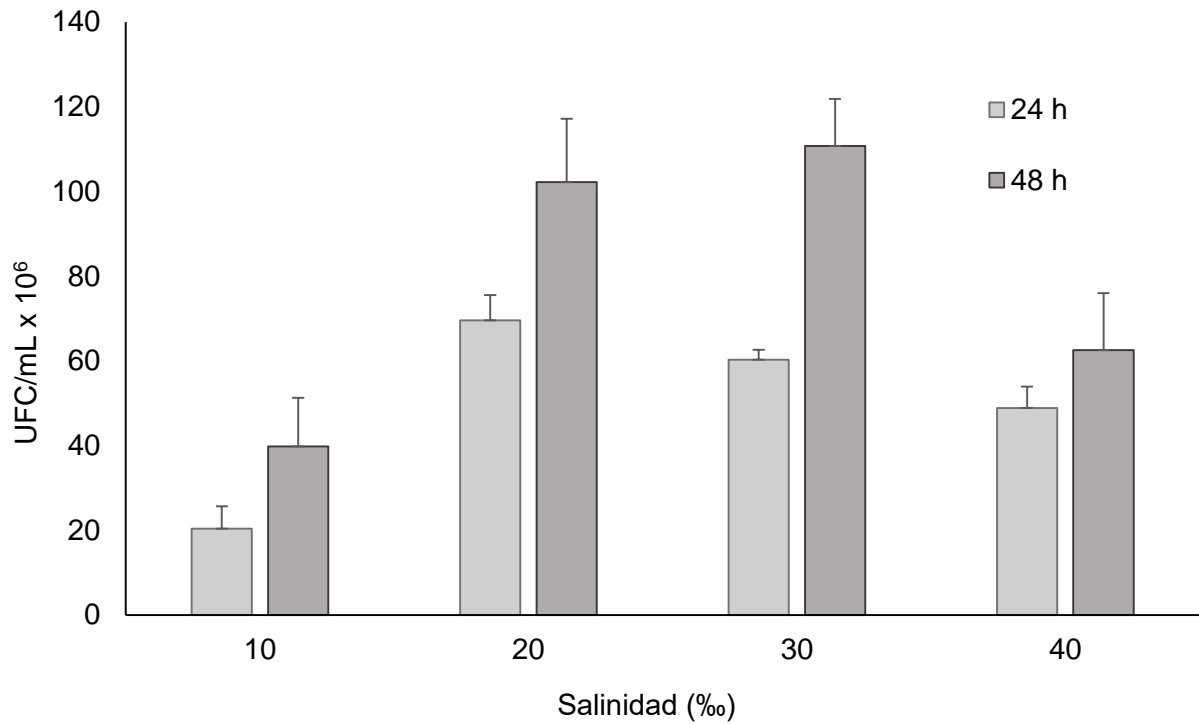


Figura 4. Crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* cultivado a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h.

En todas las condiciones experimentales, se observó que *Vibrio parahaemolyticus* alcanzó mayores densidades respecto a *Lactobacillus rhamnosus*. Las diferencias entre las concentraciones de ambas bacterias estuvieron entre 45.4 y 97.4 x 10⁶ UFC/mL (Tabla 1).

Tabla 1. Densidades de *Vibrio parahaemolyticus* y *Lactobacillus rhamnosus* obtenidas a diferentes salinidades en periodos de 24 y 48 h (cultivados a 30±2 °C y pH 7.5; letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, ANOVA de 2 vías, P<0.5).

Salinidad (%)	Periodo de cultivo (h)	Densidad de Vp (UFC/mL x 10 ⁶)	Densidad de Lr (UFC/mL x 10 ⁶)	Dif. Vp-Lr (UFC/mL x 10 ⁶)
10	24	117.8 ±15.2 ^{ab}	20.4 ±5.2 ^a	97.4
20	24	128.4±13.6 ^{ab}	69.5±5.9 ^c	58.9
30	24	135.7±12.6 ^{ab}	60.3±2.3 ^{bc}	75.4
40	24	94.3±7.7 ^a	48.9±5.0 ^{bc}	45.4
10	48	118.6±41.6 ^{ab}	39.8 ±11.4 ^b	78.8
20	48	159.3±29.4 ^{bc}	102.2±14.9 ^d	57.1
30	48	188.0±29.8 ^c	110.7±11.1 ^d	77.3
40	48	118.0±7.2 ^{ab}	62.5±4.4 ^{bc}	55.5

III.3 Efecto de la temperatura.

La temperatura y el periodo de cultivo influyeron significativamente sobre el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*. La densidad más baja se registró en 15 °C a las 24 h de cultivo mientras que las mayores se alcanzaron en las temperaturas de 25 y 35 °C a las 48 h de incubación (Figura 5; Tabla 2).

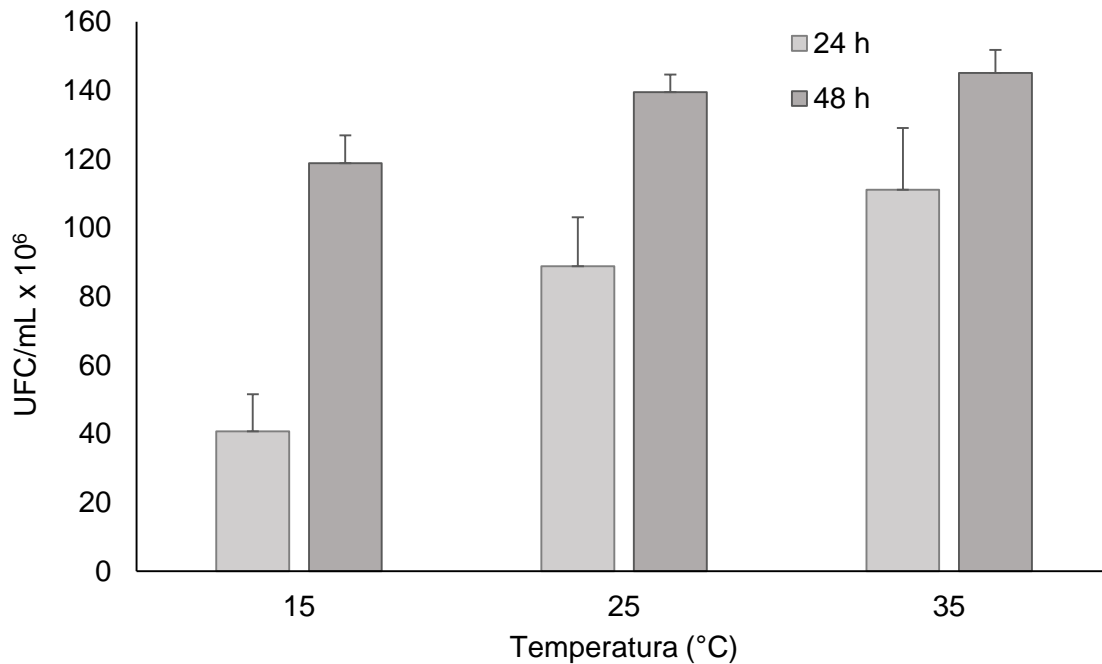


Figura 5. Crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* cultivado a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h.

En el caso de *Lactobacillus rhamnosus*, en general la menor densidad se obtuvo a las 24 h de cultivo, con incrementos significativos a las 48 h (Figura 6, Tabla 2). En todas las condiciones experimentales, *Vibrio parahaemolyticus* mostró mayores concentraciones respecto a *Lactobacillus rhamnosus*, las diferencias entre ambas especies estuvieron 24.7 y 89.9 x 10⁶ UFC/mL (Tabla 2).

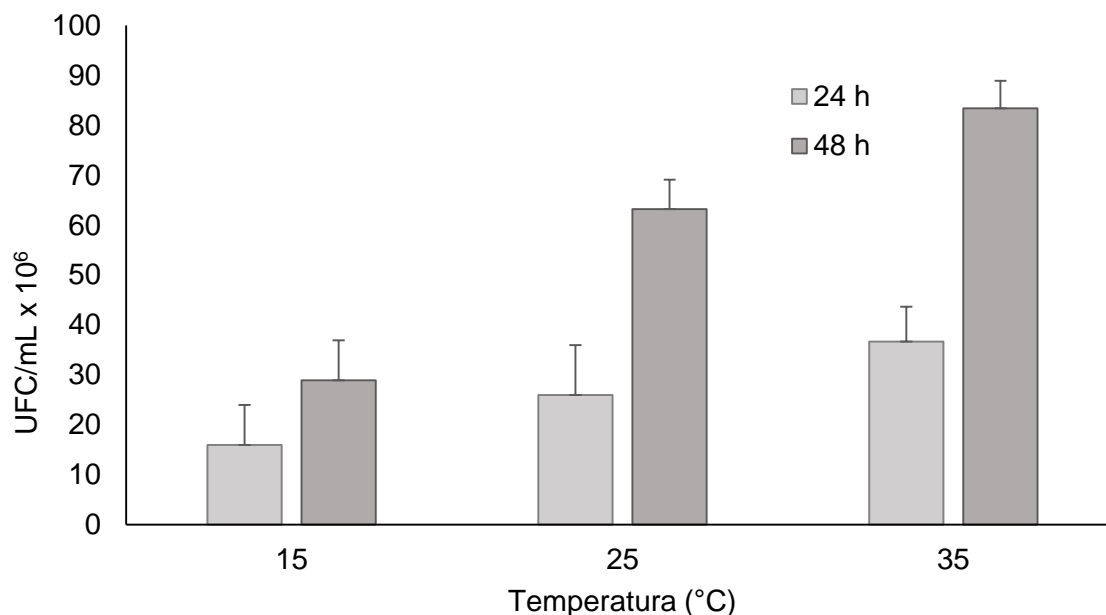


Figura 6. Crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* cultivado a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h.

Tabla 2. Densidades de *Vibrio parahaemolyticus* y *Lactobacillus rhamnosus* obtenidas a diferentes temperaturas en periodos de 24 y 48 h (cultivados a 35 ‰ y pH 7.5; letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, ANOVA de 2 vías, P<0.5).

Temperatura (°C)	Periodo de cultivo (h)	Densidad de Vp (UFC/mL x 10 ⁶)	Densidad de Lr (UFC/mL x 10 ⁶)	Dif. Vp-Lr (UFC/mL x 10 ⁶)
15	24	40.7 ±10.7 ^a	16.0 ±8.0 ^a	24.7
25	24	88.7±14.3 ^b	26.0±10.1 ^a	62.7
35	24	111.1±17.9 ^{bc}	36.6±7.0 ^a	74.5
15	48	118.8±8.1 ^{bcd}	28.9 ±8.0 ^a	89.9
25	48	139.5±5.0 ^{cd}	63.2±5.9 ^b	76.3
35	48	145.1±6.7 ^d	83.4±5.5 ^b	61.7

III.4 Inhibición de *Vibrio parahaemolyticus*.

Cuando ambas especies se cultivaron en conjunto la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* redujo significativamente la densidad de *Vibrio parahaemolyticus*. La máxima densidad que se obtuvo sin presencia de *Lactobacillus rhamnosus* (tratamiento control) fue de 403×10^6 UFC/mL, en un periodo de 24 h; mientras que con una relación de 1:10 (*Vibrio parahaemolyticus* : *Lactobacillus rhamnosus*) la densidad disminuyó a 271×10^6 UFC/mL y continuó bajando hasta llegar a 75.1×10^6 UFC/mL, en la máxima relación ensayada (1:10000; Tabla 3).

Tabla 3. Densidades de *Vibrio parahaemolyticus* obtenidas en presencia de *Lactobacillus rhamnosus* con relaciones de 1:0, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000 (densidad inicial de *Vibrio parahaemolyticus* = 10,000 UFC/mL; letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa, ANOVA de una vía $P < 0.01$).

Relación Vp:Lr	Densidad de Vp en 24 h (UFC/mL x 10^6)	Diferencia respecto al control (UFC/mLx 10^6)	Inhibición de Vp (%)
Control (1:0)	403.1 ± 182.5^d	-	-
1:10	271.4 ± 122.2^c	131.7	32.6
1:100	159.1 ± 74.0^b	244.0	60.5
1:1,000	117.2 ± 53.5^{ab}	285.9	70.9
1:10,000	75.1 ± 42.5^a	328.0	81.3

Considerando las diferencias entre el tratamiento control y aquellos que recibieron *Lactobacillus rhamnosus*, se observó una relación directa entre la densidad de esta

bacteria y el porcentaje de inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* (Figura 7). La mínima inhibición registrada fue de 32.6% (relación de 1:10), y la máxima de 81.3% (relación 1:10000).

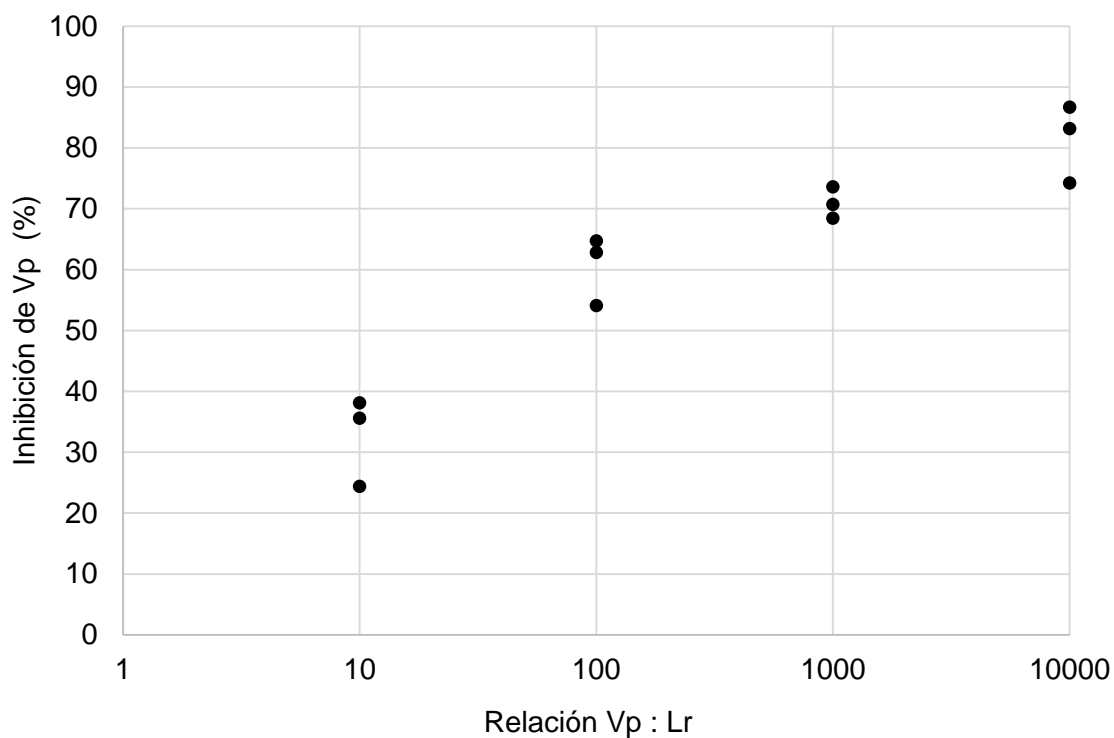


Figura 7. Porcentaje de inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* cultivado con diferentes relaciones de *Lactobacillus rhamnosus* después de un periodo de incubación de 24 h.

IV. DISCUSIÓN

En microbiología, el método de recuento en placa, es ampliamente utilizado para determinar la abundancia de bacterias y de hongos microscópicos (levaduras). En general ésta técnica permite obtener información confiable cuando los microorganismos son cultivados en condiciones adecuadas (nutrientes, tiempo y temperatura), así como de otras variables asociadas a la biología de las especies (salinidad y pH). Actualmente, existe una gran variedad de medios para cultivar varias especies de bacterias, los cuales, dependiendo de su formulación se dividen en químicamente definidos y complejos. En este estudio, para los cultivos masivos de ambas bacterias se utilizó un medio complejo (caldo soya tripticaseína), su composición permite el cultivo de una amplia diversidad de bacterias (Atlas, 2010).

La técnica de recuento en placa se basa en la toma de alícuotas de un cultivo puro o de un lugar determinado, las cuales se ajustan a diferentes diluciones y se siembran en condiciones estériles en un medio sólido. A pesar de que ésta técnica, es precisa, es necesario tener entrenamiento adecuado, y esperar varias horas o días para que las colonias sean visibles y puedan ser cuantificadas. Cuando la cantidad de muestras es grande, o se requieren datos inmediatos, esta metodología no es práctica.

Considerando las limitantes de la técnica de siembra en placas, es común realizar estandarizaciones mediante espectrofotometría. Con ésta práctica es posible relacionar la absorbancia con la densidad de células. La absorbancia utilizada comúnmente es de 620 nm (Bao *et al.*, 2012). Esta metodología es sencilla y rápida, se basa en ajustar una población microbiana en caldo de cultivo o en solución salina a diferentes absorbancias, y posteriormente realizar la siembra en placa. Una de las

desventajas es la imposibilidad para distinguir entre células vivas y muertas. A pesar de ello es muy utilizada cuando los cultivos son de corta duración.

Es importante realizar curvas de calibración para cada especie, esto permite tener mayor precisión en las estimaciones. En este estudio las curvas de calibración indicaron que *Vibrio parahaemolyticus* tiene más UFC/mL por unidad de absorbancia en comparación con *Lactobacillus rhamnosus*. La diferencia puede deberse al tamaño y a la forma de las células de cada especie. De acuerdo a Thomson y Trenholm (1971) los miembros de *Vibrio parahaemolyticus* presentan forma de cocoide, con tamaños de 1.0 a 1.5 μm de largo; por otro lado Valík *et al.* (2008) indican que *Lactobacillus rhamnosus* tiene un tamaño de 0.8 a 1.0 μm de ancho y de 2.0 a 4.0 μm de largo.

Comúnmente las curvas de crecimiento de las bacterias alcanzan su nivel máximo entre 12 y 24 h, sin embargo esto solo ocurre en condiciones óptimas; en condiciones sub-óptimas, se han alcanzado las densidades máximas en periodos de hasta 120 h (Valík *et al.*, 2008). En este estudio algunos tratamientos de cada bioensayo presentaban condiciones sub-óptimas, además de que la cantidad de nutrientes fue limitado (50 mL caldo nutritivo/L de agua) con el fin de simular las posibles condiciones presentes en los cultivos de camarón. Esto explica el crecimiento observado (en todos los bioensayos) entre las lecturas de 24 y 48 h, aunque en todos los casos el mayor incremento se obtuvo en las primeras 24 h (Fig. 3, 4, 5 y 6).

Respecto al efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las bacterias estudiadas, en general las mayores densidades de *Vibrio parahaemolyticus* se obtuvieron en 20 y 30 ‰, aunque fue posible observar crecimiento a 10 y 40 ‰. De acuerdo a Miles *et al.* (1997), *Vibrio parahaemolyticus* es una especie halofílica que se encuentra

principalmente en zonas estuarinas y lugares costeros de baja profundidad. En México, los cultivos de camarón se realizan en salinidades de 15 a 40 ‰ (dependiendo de la ubicación de las granjas). Los resultados de este estudio coinciden con los reportado y corroboran que *Vibrio parahaemolyticus* puede crecer en los mismos niveles de salinidad que el camarón.

Para que una cepa de bacterias probióticas pueda ser usada, es necesario verificar su capacidad de sobrevivir en las condiciones ambientales del huésped. En esta caso se utilizó la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus*, la cual pudo crecer en las salinidades evaluadas, aunque el mejor crecimiento se registró entre 20 y 30 ‰.

Existen pocos estudios relacionados con el efecto de la salinidad sobre los lactobacilos, sin embargo un estudio desarrollado por Villarreal (2002), concluyó que *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* pudieron ser cultivados en medios adicionados con sales, al 1%, 2% y 3% (10, 20 y 30 ‰). Cabe mencionar que las sales utilizadas en su experimento fueron NaCl y KCl, mientras que en este estudio se utilizó agua de mar estéril. Por otro lado Gomes *et al.* (1995) y Gomes *et al.* (1998) evaluaron la sobrevivencia de *Lactobacillus acidophilus* tanto en leche como quesos elaborados con diferentes metodologías y reportaron que esta bacteria, se mantuvo sin cambios en sus recuentos celulares en presencia de 3% de NaCl, por un periodo de 9 semanas. Los resultados previos así como los de este estudio indican que algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de tolerar altas salinidades.

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que influyen en el metabolismo y en el crecimiento de los organismos. Al respecto Colwell *et al.* (1984) reportaron que *Vibrio parahaemolyticus* presenta ciclos anuales de abundancia en el medio natural, en su estudio concluyeron que existe correlación entre la temperatura

del agua y la presencia de células viables. Los estudios de Miles *et al.* (1997) indicaron que esta especie puede crecer desde 8.3 a 45.3 °C, con un intervalo óptimo entre 37 y 39 °C. Los resultados del presente estudio concuerdan con estos autores, ya que en el periodo de cultivo de 24 h, el mejor crecimiento se obtuvo a 35 °C (esta fue la máxima temperatura ensayada debido a que el cultivo de camarón se desarrolla en esta temperatura como máximo).

Por otro lado, Valík *et al.* (2008) realizaron cultivos de *Lactobacillus rhamnosus* en leche a temperaturas de 6 a 41 °C (pH, 6.5). Bajo estas condiciones, las mejores tasas de crecimiento se obtuvieron en las temperaturas, de 30, 35 y 40 °C. Aunque las condiciones del presente experimento fueron en agua de mar (35 ‰) y pH de 7.5, las mayores densidades se obtuvieron en la temperatura de 35 °C, lo cual indica que *Lactobacillus rhamnosus* puede sobrevivir y multiplicarse bajo las condiciones presentes en las granjas de camarón.

Existen varios estudios relacionados con los beneficios en la salud humana. Se ha comprobado que la cepa GG de *Lactobacillus rhamnosus* tiene alta capacidad de colonización de tracto digestivo, forma biopelículas, tiene interacción inmunomodulatoria con las células epiteliales y presenta exclusión competitiva de patógenos como *Enterococcus faecium* (Lebeer *et al.*, 2012). También se ha confirmado que *Lactobacillus rhamnosus* GG es capaz de inhibir la adhesión de *Clostridium histolyticum*, *Clostridium difficile* y *Salmonella enterica* (Collado *et al.*, 2007).

Respecto a la inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* en presencia de *Lactobacillus rhamnosus*, se demostró que en agua de mar a 35‰, temperatura de 30 °C y pH de 7.5, la bacteria probiótica es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena.

Además de que el aumento en la relación *Lactobacillus rhamnosus*: *Vibrio parahaemolyticus* provocó menor crecimiento de la bacteria patógena.

La máxima inhibición fue de 81.3% en la relación de 1:10,000. La inhibición de *Vibrio parahaemolyticus* puede deberse a la producción de bacteriocinas, las cuales son producidas por un gran cantidad de bacterias para inhibir la presencia de especies competidoras (Klaenhammer *et al.*, 1993). Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias ácido lácticas, tienen acción en amplios rangos de pH y además presentan alta termo-estabilidad (Preciado *et al.*, 2013).

No se encontraron estudios previos realizados bajo las mismas condiciones de este bioensayo para hacer comparaciones. Sin embargo, los resultados indican que existe un amplio potencial para que *Lactobacillus rhamnosus* sea usada en contra de *Vibrio parahaemolyticus*. Experimentos *in vivo* en los cuales se incluyó *Lactobacillus rhamnosus* en el alimento de camarón mostraron una mejora significativa en los parámetros productivos, así como en la actividad de las enzimas antioxidantes en comparación con los cultivos control (Kumar *et al.*, 2013; Sundaram *et al.*, 2017). Por otro lado Nikoskelainen *et al.* (2001) evaluaron su consumo en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), sus resultados indicaron que la especie tratada mostró resistencia en contra de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida*.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1. Conclusiones.

La bacteria *Vibrio parahaemolyticus* mostró más UFC por unidad de absorbancia en comparación con *Lactobacillus rhamnosus*.

Las bacterias *Vibrio parahaemolyticus* y *Lactobacillus rhamnosus* mostraron crecimiento en salinidades de 10, 20, 30 y 40 ‰, temperaturas de 15, 25 y 35 °C y pH de 7.5.

En todas las condiciones ensayadas *Vibrio parahaemolyticus* tuvo más UFC en comparación con *Lactobacillus rhamnosus*.

La bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* inhibió el crecimiento de la bacteria patógena *Vibrio parahaemolyticus* en agua de mar a 35‰, temperatura de 30 °C y pH de 7.5.

Lactobacillus rhamnosus puede ser un buen candidato para ser usada en contra de *Vibrio parahaemolyticus* en el cultivo de camarón blanco.

V.2. recomendaciones.

Evaluar la colonización de *Lactobacillus rhamnosus* en el hepatopáncreas e intestino de camarón.

Evaluar diferentes métodos para incluir *Lactobacillus rhamnosus* en el alimento peletizado de camarón.

Verificar el efecto del consumo de *Lactobacillus rhamnosus* sobre la resistencia del camarón blanco infectado con *Vibrio parahaemolyticus*, mediante bioensayos *in vivo*.

VI. LITERATURA CITADA.

- Aguirre-Guzman G., Sánchez-Martínez J.G., Campa-Córdova A. & Luna-González A. (2009). Penaeid shrimp immune system: a minireview. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39(3): 205-215.
- Ahn, Y. S., Piamsomboon, P., Tang, K. T. F., Han, J. E., Kim, J. H. (2017). Complete Genome Sequence of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - Causing *Vibrio campbellii* LA16-V1, Isolated from *Penaeus vannamei* Cultured in a Latin American Country. *Genome Announcement*, 5(37): e01011-17.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*, (4th ed). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3-4): 173-186.
- Bao, Y., Zhang, Y., Li, H., Liu, Y., Wang, S., Dong, X. & Zhang, H. (2012). In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk. *Annals of Microbiology*, 62(3): 1311-1320.
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J. M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, M. A., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infeccioso: una revisión/defense mechanisms of penaeid shrimp during the infective process: a review. *Biotecnica*, 18 (1): 32-42.
- Colwell, R.R., West, P.A., Maneval, D., Remmers, E.F., Elliot, E.L. & Carlson, N.E., (1984). Ecology of pathogenic *vibrios* in Chesapeake Bay. In: Colwell, R.R., (Ed.).

- Vibrios In The Environment. John Wiley and Sons Inc. New York, USA, pp 367–387.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40: 629-636.
- CONAPESCA. (2017). Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2017. Comisión Nacional de Pesca y Acuacultura. Sinaloa, México, 293 p.
- FAO. 2018. State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) – FAO 2018. FAO. Rome Italy.
- Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X.; Klaver, F.A. & Grande, H.J. (1995). Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. Strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *The Netherland Milk Dairy Journal*, 49: 71-95.
- Gomes, A.M.P.; Teixeira, M.G.M. & Malcata, F.X. (1998). Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22: 221-240.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B. E., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(3): 255-266.
- Huerta-Rábago, J. A., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M. E., & Martínez-Córdova, L. R. (2019). Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. *Aquaculture*, 502: 391-399.

- Jyoti, B. D., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (2003). Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5): 509-514.
- Kipper, T. G. J., da Silva, L. P., Bender, S., Vinderola, C. G., & de Fariña, L.O. (2020). Cell counting and bacterial inoculum standardization by spectrophotometric method for *Bifidobacterium animalis* ssp. *Lactis* INL1. *Brazilian Journal of Development*, 6(10): 77634-77643.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3): 39-85.
- Kumar, P. N. J., Jyothsna, R. S., Reddy, M. H., & Sreevani, S. (2013). Effect of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus rhamnosus* incorporated probiotic diet on growth pattern and enzymes in *Penaeus vannamei*. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 3(4): 6-11.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L., Verhoeven, T. L., Marien, E., von Ossowski, I., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1): 185-193.
- Lyle-Fritch, L. P., Romero-Beltrán, E., & Páez-Osuna, F. (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering*, 35(2): 135-146.
- Miles, D. W., Ross, T., Olley, J., & Mc Meekin, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 38(2-3): 133-142.

- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G. & Salminen, S. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture* 198: 229–236.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159 (3-4): 443-450.
- Ninawe, A. S., & Selvin, J. (2009). Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(1): 43-66.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., & Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4): 969-977.
- Preciado, G. M., Escalante Minakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59): 64-70.
- Sudheesh, P. S., & Xu, H. S. (2001). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*, 196(1-2): 37-46.
- Sundaram, M., Panigrahi, A., Ganesh, J., Rekha, P. N., Sivagnanam, S., Rajamanickam, S., & Gopal, C. (2017). Evaluation of different probiotic strains for growth performance and immunomodulation in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Indian Journal of Fisheries*, 6:, 89-96.

- Thomson, W. K., & Trenholm, D. A. (1971). The isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic bacteria from Canadian Atlantic shellfish. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(4): 545-549.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2005). Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Annals of Microbiology*, 55(4): 283.
- Valík L., Medvedřová A. & Liptáková D. (2008). Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk at suboptimal temperatures. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47: 60-67.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671.
- Villarreal F. (2002). Aislamiento y Caracterización de Lactobacilos intestinales con Potencial Probiótico. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
- Xie, J. J., Liu, Q. Q., Liao, S., Fang, H. H., Yin, P., Xie, S. W., & Niu, J. (2019). Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 90: 456-465.
- Zar J. (1996). *Biostatistical analysis*. Third edition. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., & Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive

enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 33(4): 683-689.