

Research Article

Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*

**Anayeli Gutiérrez-Dagnino¹, Antonio Luna-González¹, Jesús A. Fierro-Coronado¹
Píndaro Álvarez-Ruíz¹, María del Carmen Flores-Miranda¹, Sarai Miranda-Saucedo¹
Violeta Medina-Beltrán¹ & Ruth Escamilla-Montes¹**

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes 250
Col. San Joaquín, C.P. 81101, Guasave, Sinaloa, México

Corresponding author: Antonio Luna-González (aluna@ipn.mx)

RESUMEN. Se estudió el efecto del prebiótico inulina y ácido fúlvico, adicionados en el alimento, sobre el crecimiento, supervivencia, prevalencia de WSSV y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*. Para esto, se realizó un bioensayo, con tratamientos por triplicado, donde se probaron diferentes concentraciones de los aditivos. Se hizo un análisis de WSSV en organismos infectados con una carga viral relativamente alta utilizando la PCR sencilla y anidada. Al final del bioensayo se extrajo la hemolinfa y se estudió el sistema inmune en hemocitos a nivel bioquímico y genético (PCR cuantitativo). El peso final fue similar en todos los tratamientos y la supervivencia estuvo entre 66,7% y 93,3%. La prevalencia de WSSV disminuyó un 13% respecto al control. El número de hemocitos, la actividad de la fenoloxidasas y la concentración de anión superóxido fueron similares en todos los tratamientos. Los aditivos modularon la expresión de los genes transglutaminasa, superóxido dismutasa y profenoloxidasas, pero no la del receptor Toll. Los aditivos no afectan negativamente el crecimiento y protegen al camarón contra WSSV en organismos infectados con una carga viral relativamente alta. No se observó efecto de los aditivos en los efectores del sistema inmune estudiados a nivel bioquímico pero si modularon la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmune en *L. vannamei*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, inulina, ácido fúlvico, sistema inmune, prebiótico, acuicultura.

Effect of inulin and fulvic acid on survival, growth, immune system, and WSSV prevalence in *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT. The effect of inulin and fulvic acid, added in the feed, on growth, survival, WSSV prevalence, and immune system was studied in *Litopenaeus vannamei*. To the above, a bioassay, with treatments in triplicate, was performed to test different additive concentrations. WSSV analysis was done in organisms infected with a relatively high viral load using single and nested PCR. At the end of the bioassay, hemolymph was extracted and the immune system was studied in hemocytes at biochemical and genetic level (quantitative PCR). The final growth was similar in all treatments and survival was between 66,7% and 93,3%. WSSV prevalence decreased 13% as compared to control. The number of hemocytes, phenoloxidase activity, and superoxide anion concentration were similar in all treatments. Inulin and fulvic acid modulated the expression of transglutaminase, superoxide dismutase, and prophenoloxidase genes, but not the Toll receptor. Additives do not negatively affect growth of white shrimp and they protect them against WSSV when infected with a relatively high viral load. Additives did not affect the immune system effectors studied at biochemical level but they modulated the expression of some immune-related genes in *L. vannamei*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, inulin, fulvic acid, immune system, prebiotic, aquaculture.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la acuicultura representa una actividad económica de gran potencial, rentabilidad y en constante expansión. Respecto a la camaronicultura, ésta ha mostrado un constante incremento durante las últimas décadas (Goarant *et al.*, 2006; Tassanakajon *et al.*, 2013). La principal amenaza para el desarrollo de la industria camaronera son las enfermedades infecciosas especialmente las causadas por virus (Lightner, 2011; Tassanakajon *et al.*, 2013). Actualmente, el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), es una de las enfermedades más devastadoras para los camarones peneidos en cultivo, ocasionando grandes pérdidas económicas (Leu *et al.*, 2009; Lightner, 2011).

Como los problemas virales son una amenaza seria para la camaronicultura, es importante el estudio del sistema inmune del camarón, relacionado con la resistencia a los patógenos (Seibert & Pinto, 2012). En la respuesta inmune de los crustáceos se distinguen dos líneas de defensa. La primera es la cutícula, que constituye una barrera física que impide la entrada del patógeno al organismo y la segunda consiste en efectores celulares y humorales que actúan en conjunto para eliminar agentes extraños. La defensa celular incluye todas las reacciones realizadas directamente por los hemocitos como citotoxicidad, coagulación, encapsulación, fagocitosis, melanización y nodulación (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010). Los mecanismos de defensa humorales, incluyen enzimas hidrolíticas, aglutininas, proteínas de la coagulación, péptidos antimicrobianos y radicales libres del oxígeno y nitrógeno (Muta & Iwanaga, 1996; Destoumieux *et al.*, 2000; Fagutao *et al.*, 2012).

Contra las infecciones virales no existe la alternativa de los antibióticos, por lo tanto es necesario desarrollar estrategias como la adición de sustancias naturales con actividad antiviral en las dietas de los camarones, pues no sólo proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo cultivado, sino que también pueden influir en la salud de los organismos y su resistencia al estrés (Gatlin, 2002).

Un grupo de moléculas que ha demostrado numerosos efectos benéficos en los animales terrestres, así como en algunos animales acuáticos, se conocen como prebióticos, polisacáridos no digeribles adicionados al alimento que influyen benéficamente en el organismo mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad metabólica de una/o varias cepas de bacterias benéficas (probióticos) en el intestino (Gibson & Roberfroid, 1995; Li *et al.*, 2007). Además, algunos prebióticos como los fructo-oligosacáridos (Li *et al.*, 2007) y la inulina (Luna-González *et al.*, 2012; Partida-

Arangure *et al.*, 2013) aumentan la capacidad inmune de *L. vannamei*.

El ácido fúlvico es otro compuesto que puede ser incorporado a las dietas, que se forma a partir de materia orgánica en descomposición y tiene la propiedad de formar compuestos de bajo peso molecular con iones de carga positiva, un proceso conocido como quelación. El ácido fúlvico adicionado al agua de cultivo mejora el crecimiento y la respuesta inmune en peces, también promueve una curación más rápida de los peces infectados con ectoparásitos y la eliminación de metales y sustancias químicas en el agua (Meinelt *et al.*, 2004).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la inulina y el ácido fúlvico, adicionados en el alimento, en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *L. vannamei*, cultivado en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y mantenimiento de camarones

Se colectaron 170 camarones ($12,74 \pm 0,84$ g) de una granja del municipio de Guasave (Sinaloa, México) y se aclimataron por 4 días colocándolos en tanque de cultivo (120 L de capacidad) con 80 L de agua de mar filtrada (20 μ m) y salinidad de 30. Los camarones se mantuvieron a temperatura ambiente y con aireación constante. En cada tanque se colocaron 10 organismos y se alimentaron *ad-libitum* dos veces al día (9:00 y 17:00 h) con alimento comercial. Se realizó un análisis preliminar de PCR a 12 camarones para evaluar el estatus del WSSV en los organismos experimentales.

Incorporación de la inulina y ácido fúlvico en el alimento

El alimento comercial (Camaronina[®], Purina, 35% de proteína) se pulverizó en un molino de café y se le agregó la inulina de agave tequilero (IIDEAL, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México) y ácido fúlvico (Fertichem, Cuernavaca, Morelos, México). Se elaboró una pasta con la mezcla, añadiendo 410 mL de agua destilada y 40 g de grenetina a cada kg de alimento. Los pellets se hicieron en un molino de carne y se secaron a temperatura ambiente con un ventilador durante 24 h. Se preparó alimento para 30 días y se almacenó a -20°C. Para el tratamiento control se sustituyó la mezcla de aditivos (inulina y ácido fúlvico) por α -celulosa (Sigma, St. Louis, MO, USA). La longitud y diámetro final del pellet fue de 5 y 3 mm, respectivamente.

Extracción de ADN para WSSV

La extracción del ADN se realizó con DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando 100 mg de tejido (pleópodos) y siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones. El tejido en DNAzol (500 μ L) se maceró con un pistilo, se incubó por 30 min y se centrifugó a 10,000 g, durante 10 min. Se recuperaron 300 μ L del sobrenadante, se adicionaron 250 μ L de etanol absoluto frío (-20°C), se mezcló por inversión y se dejó reposar por 3 min. La muestra se centrifugó a 7,500 g, durante 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 300 μ L de etanol al 75% frío y se centrifugó a 13,000 g durante 5 min. Posteriormente, se descartó el etanol y se secó a temperatura ambiente (5 a 15 min) y luego, se agregó 30 μ L de buffer TE pH 8,0 (tris 10 mM, EDTA 1 mM). La cantidad y calidad del ADN se determinó en un nanofotómetro Pearl (IMPLEN, Inc., Westlake Village, CA, USA) a 260/280 y 260/230 nm. Antes de los análisis de PCR, las muestras se diluyeron con buffer TE para obtener una concentración de 100 ng μ L⁻¹.

Análisis de WSSV

Antes de los bioensayos, los camarones fueron analizados, mediante una PCR sencilla y anidada, para determinar si eran portadores del WSSV. Para la PCR sencilla se utilizaron los oligos WSSV1 out (sentido: 5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3') y WSSV2 out (contrasentido: 5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3'). Para la PCR anidada se utilizaron los oligos WSSV1 in (sentido: 5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC -3') y WSSV2 in (contrasentido: 5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG-3') (Kimura *et al.*, 1996), que amplifican fragmentos de 982 y 570 pb, respectivamente. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0,2 mL e incluyó 18,75 μ L de H₂O, 2,5 μ L de búfer de reacción 10X (Bioline, Tauton, MA, USA[®]), 1,0 μ L de MgCl₂ (50 mM; Bioline), 0,5 μ L de dNTPs (2,5 mM de cada uno; Bioline), 0,5 μ L de cada oligo (10 μ M; Sigma-Genosys[®]), 0,25 μ L de Taq polimerasa (5 U μ L⁻¹, Bioline) y 1 μ L de ADN (100 ng) para un volumen total de 25 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador BIOER LifePro[®], usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, 2 min a 72°C, y una extensión final a 72°C por 4 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron bajo luz UV (DigiDoc-It[®], UVP, Upland, CA, USA) en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g mL⁻¹). En la PCR anidada se redujo a 45 s el tiempo de elongación (72°C).

Control interno de la PCR (gen GAPDH)

Para confirmar la existencia y calidad del ADN se realizó la amplificación del gen GAPDH que codifica

la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en *L. vannamei*. Este gen funciona como un control interno del ADN genómico del camarón (Tang *et al.*, 2000). Se utilizaron los oligos reportados por Tang *et al.* (2000) (GAPDH298F 5'-TCA CCG TCT TCA ACG AGA TG-3' y GAPDH298R 5'-ACC CTC CAG CAT CTC GAA CT-3'), que amplifican un fragmento de 298 pb. La mezcla de reacción y programa de amplificación fueron los mismos de la PCR para WSSV.

Preparación del inóculo viral

Se preparó el inóculo a partir de tejido branquial y muscular de camarones infectados con una carga viral baja de WSSV (detectados en el laboratorio por PCR anidada). Se maceraron los tejidos por 5 min con un homogenizador Pellet Pestle motor (Kontes, NY, USA) y se mezclaron con solución salina (NaCl 2%) en una proporción 1:10 (p/v). La mezcla resultante se dividió en alícuotas de 20 mL colocadas en tubos Falcón y se centrifugaron a 3,900 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se repartió el sobrenadante en tubos Eppendorf (1,5 mL en cada tubo) y se centrifugó a 14,000 g a 4°C por 20 min. El sobrenadante fue filtrado (0,45 μ m) y almacenado en alícuotas a -70°C.

Elaboración de pasta infectada con WSSV

Se infectaron camarones juveniles (5-12 g) inyectando 30 μ L de inóculo viral por vía intramuscular en el segundo segmento abdominal utilizando una jeringa para insulina. Se registró la evolución de la enfermedad dos veces al día. Los camarones moribundos (24-48 h) se sacrificaron, se tomó una muestra de tejido para verificar la presencia de WSSV por PCR y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se tomó el músculo abdominal y se cortó en trozos muy finos con un bisturí hasta formar una pasta. Se extrajeron las branquias de los organismos con unas pinzas de disección y se mezclaron de manera homogénea con el músculo. Se determinó la carga viral alta en la pasta mediante PCR sencillo (Lo *et al.*, 1996a, 1996b) y se congeló a -70°C hasta su uso.

Se realizó el mismo procedimiento en otro grupo de camarones, pero se sacrificaron a las 10 h antes de presentar los signos de la enfermedad (letargia, intestino vacío, nado errático). Se determinó la carga viral baja en la pasta mediante PCR anidada (Lo *et al.*, 1996a, 1996b) y se congeló a -70°C hasta su uso.

Bioensayo

Se realizó un bioensayo de 30 días en tanques de plástico (120 L) sin arena con 80 L de agua de mar filtrada (20 μ m), salinidad de 30 y aireación constante (sistema abierto). En cada tanque se colocaron 10

individuos aparentemente sanos con peso promedio de $12,74 \pm 0,84$ g. En el día 10, los camarones se alimentaron con pasta de tejido infectado de camarón con carga viral baja (2 g tanque^{-1}). En el día 16 se alimentaron con una pasta de tejido infectado con carga viral alta (2 g tanque^{-1}). En el día 17 se adicionaron $800 \mu\text{L}$ de inóculo viral en el agua de cada tanque. Los cuatro tratamientos se realizaron por triplicado: I) Camaronina + celulosa (control); II) Camaronina + inulina ($0,625 \text{ g kg alimento}^{-1}$) + ácido fúlvico ($0,125 \text{ g kg alimento}^{-1}$); III) Camaronina + inulina ($1,25 \text{ g kg alimento}^{-1}$) + ácido fúlvico ($0,25 \text{ g kg alimento}^{-1}$); IV) Camaronina + inulina ($2,50 \text{ g kg alimento}^{-1}$) + ácido fúlvico ($0,5 \text{ g kg de alimento}^{-1}$). La alimentación con la dieta comercial se realizó durante los 30 días del bioensayo de acuerdo al porcentaje de biomasa (tabla de Purina), dos veces al día (9:00 y 17:00 h). Se registró diariamente la temperatura y cada 3 días el oxígeno, salinidad y pH. Se evaluaron las concentraciones de nitritos, nitratos y amonio al principio y al final del bioensayo (Strickland & Parsons, 1972). Los parámetros físicos y químicos, y de calidad de agua se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos según Brock & Main (1994) durante los 30 días que duró el bioensayo.

Se eliminaron los sólidos sedimentados cada 3 días por sifoneo, recuperando el agua perdida. Se realizó un recambio del 50% de agua cada 5 días. El agua del recambio fue clorada y desechada. El incremento en peso se determinó semanalmente para ajustar la ración del alimento. La supervivencia (%) se determinó diariamente. Al final se registraron los pesos, parámetros del sistema inmune y prevalencia de WSSV (porcentaje de organismos infectados por tratamiento).

Tasa de crecimiento específico (TCE)

Al final del bioensayo se determinó la tasa de crecimiento específico (TCE) utilizando la siguiente fórmula (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006):

$$\text{TCE } (\% \text{ día}^{-1}) = 100 (\ln W_2 - \ln W_1)/t$$

donde: W_2 es el peso final, W_1 el peso inicial y t es el número de días de cultivo.

Parámetros del sistema inmune

Obtención de la hemolinfa

Este proceso se realizó manteniendo todos los componentes en hielo. Se extrajo la hemolinfa de camarones experimentales (8 por estanque, 24 por tratamiento) con jeringas para tuberculina (27G x 13 mm) del sinus ventral del camarón (primer segmento abdominal). Antes de la extracción, la jeringa se cargó con una solución isotónica para camarón y un anticoagulante con citrato trisódico pH 7,5 (citrato

trisódico 27 Mm, NaCl 385 mM, glucosa 115 mM) en una proporción 2:1 (2 volúmenes de anticoagulante por cada volumen extraído de hemolinfa, $600 \mu\text{L}:300 \mu\text{L}$) (Huang *et al.*, 2010). La muestra de hemolinfa se colocó en tubos Eppendorf de $1,5 \text{ mL}$. Se utilizaron tres, dos y tres camarones por estanques para el anión superóxido, expresión de genes y actividad de la fenoloxidasas, respectivamente. Para el conteo de hemocitos se utilizaron $50 \mu\text{L}$ de la hemolinfa destinada para medir la actividad de la fenoloxidasas antes de centrifugarla.

Separación de plasma y obtención del sobrenadante del lisado de hemocitos (SLH)

Se separaron los hemocitos del plasma centrifugando a 800 g por 10 min a 4°C (Hernández-López *et al.*, 1996). El plasma se colocó en otro tubo y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Al paquete celular se adicionó 1 mL de anticoagulante frío y se centrifugó nuevamente a 800 g por 10 min a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se adicionó $300 \mu\text{L}$ de búfer de fosfato de potasio $0,1 \text{ M}$ pH 7,6 ($86,6 \text{ mL}$ de K_2HPO_4 1M , $13,4 \text{ mL}$ de KH_2PO_4). Para lisar los hemocitos se centrifugó a $14,000 \text{ g}$ por 10 min a 4°C , se recuperó el SLH y se guardó a -80°C hasta su análisis. Las muestras de plasma y SLH se utilizaron para el análisis de la actividad de la fenoloxidasas.

Conteo total de hemocitos (CTH)

Para el CTH se tomaron $50 \mu\text{L}$ de hemolinfa y se mezclaron con $150 \mu\text{L}$ (1:3) de formol al 6%. El conteo se realizó individualmente en una cámara Neubauer.

Actividad de la fenoloxidasas

La actividad de la fenoloxidasas (FO) se determinó según Hernández-López *et al.* (1996). La actividad de la FO presente en el plasma se midió espectrofotométricamente por la formación de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa, Sigma®, St. Louis, MO, USA). A $50 \mu\text{L}$ de muestra, se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de búfer de fosfato de potasio $0,1 \text{ M}$ (pH 7,6) y $50 \mu\text{L}$ de L-Dopa [3 mg mL^{-1} en buffer de fosfato de potasio ($0,1 \text{ M}$ pH 6,6 $38,1 \text{ mL}$ de K_2HPO_4 1M , $61,9 \text{ mL}$ de KH_2PO_4 1M ,)]. Se incubó durante 10 min a 37°C y se determinó la absorbancia a 492 nm . Para activar la profenoloxidasas (proFO) en el SLH se tomó $50 \mu\text{L}$ de muestra, se adicionó $50 \mu\text{L}$ de tripsina (1 mg mL^{-1}) en buffer de fosfato de potasio ($0,1 \text{ M}$, pH 7,6) y se incubó por 30 min a 37°C . La actividad de la FO en el SLH se determinó como se describió anteriormente para el plasma. Se utilizó como blanco $100 \mu\text{L}$ de buffer de fosfato de potasio y $50 \mu\text{L}$ de L-Dopa. Las muestras individuales de nueve camarones se procesaron por triplicado.

Anión superóxido intracelular

El anión superóxido se cuantificó mediante la metodología de Song & Hsieh (1994). La hemolinfa se centrifugó a 800 g, por 5 min a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y los hemocitos se lavaron dos veces con 900 µL de anticoagulante. Se centrifugó nuevamente a 800 g, por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Los hemocitos se tiñeron con 100 µL de una solución de nitroblue tetrazolium al 0,3% (NBT, Sigma®) durante 30 min a 37°C. La reacción de tinción se finalizó eliminando la solución NBT y adicionando 100 µL de metanol absoluto. Después de tres lavados con metanol al 70%, los hemocitos fueron secados a temperatura ambiente por 30 min. Se adicionó 120 µL de KOH (2 M) y 140 µL de dimetil sulfóxido (DMSO, sigma®) para disolver el formazán citoplasmático. Se colocaron 200 µL de cada muestra por triplicado en una microplaca y se utilizó como blanco 200 µL de la mezcla (300 µL de KOH y 350 µL de DMSO). La densidad óptica del formazán disuelto se cuantificó a 630 nm.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para evaluar la expresión de los genes en hemocitos, se separaron del plasma por centrifugación (800 g por 10 min a 4°C) y se adicionó 300 µL de Trizol para extraer el ARN total de acuerdo al protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La concentración y pureza del ARN total se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro Pearl (Implen®, Westlake Village, CA, USA) y se almacenó a -70°C hasta su uso en la transcripción reversa.

Para sintetizar el ADN complementario (ADNc), el ARN se trató con ADNsa 1 (1 U µL⁻¹, Sigma) y se utilizó la transcriptasa reversa Improm II siguiendo la metodología del fabricante (Promega®, Madison, WI, USA), a partir de 500 ng de ARN total con oligo dT₂₀. El ADNc se resuspendió en 80 µL de agua ultrapura y se almacenó a -70°C hasta el análisis de PCR en tiempo real.

Expresión de genes mediante PCR en tiempo real

Se evaluó la expresión relativa de genes del sistema inmune del camarón en hemocitos. Los resultados fueron normalizados contra la expresión del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18s como gen de referencia. Los oligos (Sigma Genosys®) específicos se muestran en la Tabla 1. Las amplificaciones se realizaron en un equipo CFX96 Touch Real-Time System (BIO-RAD®) utilizando el software CFX Manager versión 3.0 (BIO-RAD) para la obtención de los datos.

Las amplificaciones se efectuaron por duplicado en placas de 96 pozos con un volumen de reacción final de 15 µL, conteniendo 7,5 µL de PCR Master Mix 2x [3

µL de buffer de reacción 5x; 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM; 0,3 µL de dNTPs 10 mM; 0,75 µL de EvaGreen 20x (Biotium In., Hayward, CA, USA); 0,15 µL de Go Taq; 1,8 µL de agua ultrapura], 0,7-1,0 µL de primers [sentido y contrasentido, 10 µM c/u (Sigma Genosys®)]; 1,5-1,8 µL de agua ultrapura y 5 µL de templado (ADNc). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 95°C por 10 s, 60°C por 15 s, 72°C por 30 s y un paso adicional de 79°C por 5 s para adquirir la fluorescencia. Después de cada reacción, se realizó un análisis de disociación (Curva de Melting) de 65 a 95°C, con un aumento de 0,5°C cada 5 s para confirmar la ausencia de dímeros de oligos o fragmentos inespecíficos.

La eficiencia de las amplificaciones se determinó mediante una curva de calibración, calculando una pendiente con cinco diluciones seriales (factor 5) de una mezcla representativa, formada con 5 µL de cada ADNc del experimento. La cantidad de oligos para cada gen fue optimizada realizando curvas con diferentes cantidades de oligos y tomando como referencia la mejor eficiencia de reacción.

Adicionalmente, para corregir pequeñas variaciones de C_q entre una y otra placa, se preparó un pool de reacciones con una misma muestra como templado (ajustadores), se formaron alícuotas de 50 µL y se congelaron a -20°C. Se descongeló una alícuota para cada placa y se corrieron tres muestras de 15 µL. Finalmente, se sumó a cada valor en la placa, la diferencia entre el promedio general de los ajustadores menos el promedio de ajustadores en cada placa.

Los valores de C_q se transformaron a cantidades relativas usando la fórmula de Pfaffl. La expresión relativa se calculó normalizando contra la cantidad relativa en el tratamiento control (como un calibrador con nivel de expresión de 1) (Pfaffl, 2001).

Análisis estadístico

Los resultados en porcentaje se transformaron a arco-seno $\sqrt{\%/100}$ para normalizar su distribución y se sometieron a un análisis de varianza (Ostle, 1965). Los datos de crecimiento, supervivencia (%) y sistema inmune se analizaron con un ANDEVA de una vía para determinar diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) y una prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Supervivencia y prevalencia de WSSV de los camarones experimentales

La supervivencia obtenida fue de 66 a 93% mientras que la prevalencia de WSSV varió entre 53,3 y 66,7%

Tabla 1. Oligos utilizados en el estudio de expresión de genes con PCR cuantitativa (Wang *et al.*, 2010).

Gen	Secuencia de los oligos
18s ARN (control interno)	F 5'-AGCAGGCTGGTTTTTGCTTA-3' R 5'-ATGCTTTCGCAGTAGGTCGT-3'
Profenoloxidasa (proFO)	F 5'-GAGATCGCAAGGGAGAAGTG-3' R 5'-CGTCAGTGAAGTCGAGACCA-3'
Transglutaminasa (TGasa)	F 5'-CCTCAGGATCTCCTTCACCA-3' R 5'-TTGGGAAAACCTTCATTTTCG-3'
Superóxido Dismutasa (SOD)	F 5'-ATCCACCACACAAAGCATCA-3' R 5'-AGCTCTCGTCAATGGCTTGT-3'
Toll receptor (LvToll)	F 5'-ATGTGCGTGCGGATACATTA-3' R 5'-GGGTGTTGGATGTCGAGAGT3'

Tabla 2. Supervivencia, tasa de crecimiento específico, prevalencia de WSSV, conteo total de hemocitos, anión superóxido y actividad de la fenoloxidasa en el camarón blanco *L. vannamei*. Tratamientos: I) Control; II) inulina (0,625 g kg⁻¹ alimento⁻¹) + ácido fúlvico (0,125 g kg alimento⁻¹); III) inulina (1,25 g kg alimento⁻¹) + ácido fúlvico (0,25 g kg alimento⁻¹); IV) inulina (2,50 g kg alimento⁻¹) + ácido fúlvico 0,5 g kg alimento⁻¹). Los valores se indican como promedio ± EE. TCE: tasa de crecimiento específico. SLH: sobrenadante del lisado de hemocitos. FO: fenoloxidasa.

Parámetro estudiado	Tratamientos			
	I	II	III	IV
Supervivencia (%)	83,30 ± 16,66	66,67 ± 17,63	86,67 ± 8,81	93,33 ± 8,16
Prevalencia de WSSV (%)	66,66 ± 1,44	55,00 ± 2,60	55,00 ± 1,75	53,33 ± 0,71
TCE (% diario)	0,33 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,31 ± 0,05	0,25 ± 0,02
Hemocitos mL ⁻¹ (x 10 ⁶)	27,73 ± 2,16	28,90 ± 2,20	25,17 ± 1,28	27,69 ± 3,50
Anión superóxido (Abs 630 nm)	1,17 ± 0,09	1,22 ± 0,05	1,26 ± 0,07	1,32 ± 0,07
FO total (Abs 492 nm)	2,04 ± 0,08	2,23 ± 0,14	2,33 ± 0,07	2,13 ± 0,06

(Tabla 2). No se observaron diferencias significativas de la supervivencia en los tratamientos ($P > 0,05$).

Tasa de crecimiento específico

La TCE (% diario) en los tratamientos estuvo entre 0,25 y 0,35. No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos (Tabla 2).

Conteo total de hemocitos (CTH)

Los resultados mostraron que el número de hemocitos por mililitro de hemolinfa fue similar entre los tratamientos ($P > 0,05$) (Tabla 2).

Actividad total de la fenoloxidasa (plasma + SLH)

No se observaron diferencias significativas en la actividad de la fenoloxidasa en los tratamientos ($P > 0,05$) (Tabla 2).

Anión superóxido en SLH

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la concentración del anión superóxido entre los tratamientos ($P > 0,05$) (Tabla 2).

Análisis de la expresión de genes del sistema inmune

Los resultados de expresión muestran que la inulina y el ácido fúlvico modularon significativamente la expresión de los genes profenoloxidasa, SOD y transglutaminasa entre los tratamientos (Tabla 3). La expresión de los genes mostró una tendencia a disminuir en el tratamiento IV (mayor cantidad de aditivos) respecto a los tratamientos I y II.

DISCUSIÓN

No existen reportes sobre el efecto de la mezcla de inulina y ácido fúlvico, adicionados a la dieta, en el crecimiento (TCE), supervivencia, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *L. vannamei*.

En este estudio se observó que la TCE no aumentó significativamente en los camarones alimentados con inulina y ácido fúlvico, coincidiendo con los resultados reportados por Li *et al.* (2007) y Luna-González *et al.* (2012), quienes probaron fructo-oligosacáridos e inulina en *L. vannamei*, respectivamente. Sin embargo, los resultados contrastan con los de Zhou *et al.* (2007) quienes observaron un aumento significativo en el cre-

Tabla 3. Expresión relativa de genes relacionados con el sistema inmune de *L. vannamei* alimentado con inulina y ácido fúlvico. Tratamientos: I) Control; II) inulina (0,625 g kg alimento⁻¹) + ácido fúlvico (0,125 g kg alimento⁻¹); III) inulina (1,25 g kg alimento⁻¹) + ácido fúlvico (0,25 g kg alimento⁻¹); IV) inulina (2,50 g kg alimento⁻¹) + ácido fúlvico 0,5 g kg alimento⁻¹. La expresión del gen 18S fue usada como control interno (gen de referencia). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Barras de error = promedio \pm EE.

Genes	Expresión relativa a 18 S			
	I	II	III	IV
Transglutaminasa	1 ^b	1,50 \pm 0,14 ^a	1,17 \pm 0,11 ^{ab}	0,45 \pm 0,08 ^c
Receptor Toll	1	0,69 \pm 0,06	0,63 \pm 0,15	0,96 \pm 0,10
Superóxido dismutasa	1 ^{ab}	1,32 \pm 0,14 ^a	0,76 \pm 0,03 ^b	0,71 \pm 0,10 ^b
Profenoloxidasa	1 ^{ab}	1,62 \pm 0,24 ^a	1,33 \pm 0,20 ^{ab}	0,64 \pm 0,22 ^b

cimiento de *L. vannamei* alimentado con fructo-oligosacáridos (0,4 g kg alimento⁻¹) y también con los obtenidos por Meinelt *et al.* (2004) quienes alimentaron al pez cola de espada *Xiphophorus helleri* con sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos) y lograron aumentar su crecimiento significativamente. Las diferencias en los resultados se explicarían por el tipo y cantidad de prebiótico utilizado, cantidad de ácido fúlvico probado y mezcla del mismo con la inulina. Respecto a la supervivencia, ésta fue mejor en el tratamiento con la concentración más alta de aditivos aunque la diferencia no fue significativa respecto al control y los otros tratamientos. Los resultados son similares a los obtenidos por Li *et al.* (2007) quienes obtuvieron supervivencias altas pero similares entre tratamientos en *L. vannamei* alimentado con fructo-oligosacáridos adicionados en la dieta (0,025; 0,0500; 0,075; 0,100; 0,200; 0,400 y 0,800%). Sin embargo, es importante mencionar que, a diferencia de este trabajo, los investigadores mencionados no infectaron a los camarones con WSSV.

La duración del bioensayo fue de 30 días y la diferencia en la prevalencia de WSSV entre el tratamiento IV y el control fue de 13,3% en camarones infectados con una carga viral relativamente alta (PCR sencilla: >1000 copias de ADN viral, Lo *et al.*, 1996a, 1996b), lo que contrasta con el 41% reportado por Luna-González *et al.* (2012) en la misma especie, utilizando como aditivo inulina, en un bioensayo de 60 días con camarones que venían infectados con baja carga viral (PCR anidada: 10-50 copias de ADN viral, Lo *et al.*, 1996a, 1996b) desde la granja y no se re-infectaron en el laboratorio. Por otro lado, el ácido fúlvico tiene propiedades antivirales (Van Rensburg *et al.*, 2002), debido a que bloquea la entrada de los virus a la célula al interactuar con lípidos o carbohidratos o ambos de glucoproteínas de superficie de virus envueltos (Kotwal, 2008). Por lo anterior, es probable que el efecto en la disminución en la prevalencia de WSSV haya sido inferior a lo reportado por Luna-

González *et al.* (2012) debido a la menor duración del bioensayo, a la mayor cantidad de partículas virales en los camarones debido a la reinfección y/o a la mutua neutralización entre la inulina (carbohidrato) y el ácido fúlvico.

El estudio del sistema inmune del camarón es un elemento clave para establecer estrategias para el control de enfermedades (Peña *et al.*, 2013; Tassanakajon *et al.*, 2013). Al respecto, los hemocitos son responsables de la coagulación, endurecimiento del exoesqueleto y eliminación de materiales extraños (Song & Hsieh, 1994). Un incremento en el número de hemocitos aumenta la respuesta inmune de los crustáceos durante los periodos de estrés y los hace más resistentes a las enfermedades (Le Moullac *et al.*, 1998). En el bioensayo, el número total de hemocitos fue similar en todos los tratamientos, lo que coincide con lo reportado por Luna-González *et al.* (2012), quienes no encontraron diferencias significativas entre tratamientos cuando alimentaron camarones blancos sólo con inulina (2,5 g kg alimento⁻¹). Aunque no hubo un aumento de los hemocitos respecto al control, no se observó un efecto negativo de los aditivos ya que Campa-Córdova *et al.* (2002) mencionan que la disminución en el número de hemocitos, está asociada a la susceptibilidad momentánea de los camarones a los patógenos.

El anión superóxido se produce durante el proceso de fagocitosis en los hemocitos, es una molécula oxidante y tiene efecto bactericida (Wang *et al.*, 2010). En el bioensayo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en la concentración del anión superóxido. Contrariamente a lo encontrado, Ibrahim *et al.* (2010) mencionan que la inulina (5 g kg alimento⁻¹) incrementó significativamente el estallido respiratorio (fagocitosis) en la tilapia *Oreochromis niloticus*, en comparación con el grupo control. En *L. vannamei*, Li *et al.* (2007) mencionan que la adición de FOS de cadena corta (0,1 y 0,8%) en el alimento, incrementa significativamente el estallido respiratorio

de los hemocitos, lo cual se asocia a un aumento en la generación de anión superóxido durante el proceso de fagocitosis. A nivel molecular, se observó una disminución en la expresión del gen de la SOD (que tiene como sustrato al anión superóxido) en los tratamientos III y IV (con mayor concentración de aditivos), respecto al tratamiento II (con menor concentración de aditivos). Es probable que la invariabilidad del anión superóxido y la disminución en la expresión del gen SOD se deba al ácido fúlvico, ya que algunos resultados obtenidos en ratones indican que este ácido secuestra radicales libres, inhibe la fagocitosis específica y funciones celulares linfocíticas (Van Rensburg *et al.*, 2001).

El sistema profenoloxidasas (proFO) es uno de los mecanismos defensivos más importantes en crustáceos (Okumura, 2007). En *L. vannamei*, el sistema proFO está involucrado en la defensa inmune contra *Vibrio alginolyticus* (Yeh *et al.*, 2009), pero se inhibe por la infección con WSSV (Ai *et al.*, 2008, 2009). La actividad de la fenoloxidasas fue similar en todos los tratamientos. Lo anterior no coincide con lo reportado por Luna-González *et al.* (2012) quienes encontraron un aumento significativo en la actividad de FO en los camarones infectados con baja carga de WSSV y tratados con inulina (2,5 g kg alimento⁻¹) respecto al control sin el prebiótico. En este estudio, se observó una disminución significativa en la expresión del gen en el tratamiento con la mayor concentración de aditivos (tratamiento IV), respecto al de menor concentración (tratamiento II). Es probable que, junto con el efecto inhibidor de WSSV, la disminución en la expresión del gen se deba al ácido fúlvico, ya que como se mencionó anteriormente, éste interactúa con lípidos y carbohidratos, como la inulina. Los resultados del análisis bioquímico y molecular son diferentes pero hay que considerar que el sistema proFO se almacena en gránulos dentro de los hemocitos.

La proteína de la coagulación (PC) se encuentra en el plasma en crustáceos decápodos y su polimerización se realiza mediante la acción de la enzima transglutaminasa en presencia de calcio. La transglutaminasa se encuentra en el interior de las células hialinas del camarón y se libera al plasma por daño tisular o como una respuesta de los hemocitos ante la presencia de lipopolisacáridos y β -1,3-glucanos (Yeh *et al.*, 1998; Montañó-Pérez *et al.*, 1999; Fagutao *et al.*, 2012). Según Fagutao *et al.* (2012) el silenciamiento génico de la transglutaminasa hace al camarón más susceptible a infecciones bacterianas y virales; por tanto, esta enzima es un componente esencial de su sistema inmune y está implicada en la regulación de otros genes (crustina y lisozima). En este trabajo, el gen de la transglutaminasa presentó una expresión significativamente mayor en el

tratamiento II (menor concentración de aditivos) respecto al control sin aditivos y al tratamiento IV (mayor concentración de aditivos). Los resultados indican una mayor capacidad de coagulación en el tratamiento II respecto al I y IV y una mejor respuesta ante WSSV. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia en el tratamiento II fue menor respecto al tratamiento IV.

En relación con la expresión del gen LvToll, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. El sistema inmune innato identifica los agentes infecciosos mediante receptores celulares, los cuales son proteínas que se unen a macromoléculas de patógenos microbianos. La familia de receptores, llamada Toll, fue originalmente identificada y descrita en la mosca de la fruta (*Drosophila* sp.) como receptora necesaria para el desarrollo dorso-ventral durante la embriogénesis, y en adultos como activadores de la respuesta inmune antifungal (Hashimoto *et al.*, 1988). Los resultados muestran que los aditivos probados no parecen interactuar con los receptores Toll de los hemocitos.

En conclusión, la mezcla de inulina y ácido fúlvico en el alimento disminuyen la prevalencia de WSSV en camarones infectados con una carga viral relativamente alta. No se observó un efecto de los aditivos en el sistema inmune a nivel bioquímico pero si modularon la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmune en *L. vannamei*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el soporte económico. Anayeli Gutiérrez Dagnino agradece a la SIP-IPN y al CONACyT por las becas otorgadas para la realización de estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Ai, H.S., Y.C. Huang, S.D. Li, S.P. Weng, X.Q. Yu & J.G. He. 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 28-39.
- Ai, H.S., J.X. Liao, X.D. Huang, Z.X. Yin, S.P. Weng, Z.Y. Zhao, S.D. Li, X.Q. Yu & J.G. He. 2009. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 33: 59-68.
- Brock, J. & K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*.

- World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 242 pp.
- Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis & F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 12(4): 353-366.
- Destoumieux, D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodríguez, P. Bulet, M. Comps & E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.*, 113: 461-469.
- Fagutao, F.F., M.B.B. Maningas, H. Kondo, T. Aoki & I. Hirono. 2012. Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 711-715.
- Gatlin, D.M. III. 2002. Nutrition and fish health. In: J.E. Halver & R.W. Hardy (eds.). *Fish nutrition*. Academic Press, San Diego, pp. 671-702.
- Gibson, G.R. & M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-1412.
- Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. Decker, D. Saulnier & F. Le Roux. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29: 570-580.
- Hashimoto, C., K.L. Hudson & K.V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorso-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52: 269-279.
- Hernández-López, J., T. Gollás-Galván & F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113: 61-66.
- Huang, J., Y. Yang & A. Wang. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 28(1): 240-244.
- Ibrahim, M.D., M. Fathi, S. Mesalhy & A.M. El-Aty. 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 241-246.
- Jiravanichpaisal, P., B.L. Lee & K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213-236.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraokay & K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathol.*, 31: 93-98.
- Kotwal, G.J. 2008. Genetic diversity-independent neutralization of pandemic viruses (e.g., HIV), potentially pandemic (e.g., H5N1 strain of influenza) and carcinogenic (e.g., HBV and HCV) viruses and possible agents of bioterrorism (variola) by enveloped virus neutralizing compounds (EVNCs). *Vaccine*, 26: 3055-3058.
- Le Moullac, G., C. Soyeux, D. Saulnier, D. Ansquer, J.C. Avarre & P. Levy. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 621-629.
- Leu, J.H., F. Yang, X. Zhang, X. Xu, G.H. Kou & C.F. Lo. 2009. Whispovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 328: 197-227.
- Li, J., G.S. Burr, D.M. Gatlin III, M.E. Hume, S. Patnaik, F.L. Castille & A.L. Lawrence. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *J. Nutr.*, 137: 2763-2768.
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, 106(1): 110-130.
- Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, C.H. Chen, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chou, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996a. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 25: 133-141.
- Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. Chiu, C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang & G.H. Kou. 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, 27: 215-225.
- Luna-González, A., J.C. Almaraz-Salas, J.A. Fierro-Coronado, M.C. Flores-Miranda, H.A. González-Ocampo & V. Peraza-Gómez. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 362-363: 28-32.
- Meinelt, T., K. Schreckenbach, K. Knopf, A. Wienke, A. Stuber & C.E.W. Steinberg. 2004. Humic substances affect constitution and sex ratio of swordtail *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). *Aquat. Sci.*, 66: 239-245.
- Montaño-Pérez, K., T. Reyes-Izquierdo & F. Vargas-Albores. 1999. El proceso de coagulación en camarones penaeidos. *Ciencia*, 50: 23-28.

- Muta, T. & S. Iwanaga. 1996. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 41-47.
- Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 68-76.
- Ostle, B. 1965. *Estadística aplicada*. Limusa-Wiley, México, 629 pp.
- Partida-Arangure, B.O., A. Luna-González, J.A. Fierro-Coronado, M.C. Flores-Miranda & H.A. González-Ocampo. 2013. Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of WSSV in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. *Afr. J. Biotechnol.*, 12(21): 3366-3375.
- Peña, N., R. Vargas & A. Varela. 2013. Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev. Agron. Mesoam.*, 24(1): 133-147.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9): 2002-2007.
- Seibert, C. & A.R. Pinto. 2012. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. *Braz. J. Microbiol.*, 43(3): 857-864.
- Song, Y.L. & Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbiocidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201-209.
- Strickland, J.H.D. & T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 167: 310 pp.
- Sun, J., A. Wang & T. Zhang. 2010. Flow cytometric analysis of defense functions of hemocytes from the Penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 41(1): 92-105.
- Tang, K.F.J., S.V. Durand, B.L. White, R.M. Redman, C.R. Pantoja & D.V. Lightner. 2000. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190: 203-210.
- Tassanakajon, A., K. Somboonwiwat, P. Supungul & T. Sureerat. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, 34(4): 954-967.
- Van Rensburg, C.E.J., J. Dekker, R. Weis, T.L. Smith, E.J. Rensburg & J. Schneider. 2002. Investigation of anti-HIV properties of oxihumate. *Exp. Chemother.*, 48: 138-143.
- Van Rensburg, C.E.J., S.C.K. Malfeld & J. Dekker. 2001. Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. *Drug Dev. Res.*, 53: 29-32.
- Wang, K.H.C., C.W. Tseng, H.Y. Lin, I.T. Chen, Y.H. Chen, Y.M. Chen, T.Y. Chen & H.L. Yang. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.*, 34: 49-58.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen & I.H. Tsia. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 121: 169-176.
- Yeh, M.S., C.Y. Lai, C.H. Liu, C.M. Kuo & W. Cheng. 2009. A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 49-55.
- Zhou, Z., Z. Ding & L.V. Huiyuan. 2007. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 38(2): 296-301.
- Ziaei-Nejad, S., M.H. Rezaei, G.A. Takami, D.L. Lovett, A.R. Mirvaghefi & M. Shakouri. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252: 516-524.

Received: 25 March 2015; Accepted: 5 September 2015