



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**POTENCIAL TERAPÉUTICO DE MICRO Y MACROALGAS EN LARVAS
DE CAMARÓN *Penaeus (Litopenaeus) Vannamei* INFECTADAS CON
*Vibrio parahaemolyticus***

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

Presentado por Pozo Miranda Francisco Hernán

Guayaquil - Ecuador

2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer al Dios del cielo, Jehová, por haberme brindado fuerzas para lograr cada una de mis metas y a mis Padres por siempre darme sus sabios consejos y apoyo incondicional.

A las autoridades de la Escuela Superior Politécnica del Litoral y a su personal Académico administrativo por liderar el proceso de formación.

A Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas CENAIM, por brindar el apoyo facilitando la infraestructura y logística para el desarrollo del trabajo de titulación.

Agradecer Stanislaus Sonnenholzner Schold, Ph.D., Director del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, por mantener su colaboración constante para el uso de las instalaciones de CENAIM a fin de desarrollar las actividades de investigación.

Agradecer en particular a Bonny Narcisa Bayot Arroyo PhD., Tutor de tesis, por la guía en el trabajo realizados durante el proceso de titulación.

Agradecer a los Doctores Stanislaus Sonnenholzner Schold, Paúl Guillén Mena, Dra. Jenny Rodríguez León, Carlos Noceda Alonso, Edgar Zapata Vicenes y Juan Ortiz Tirado por sus aportes, enriqueciendo el presente trabajo de investigación. Su experiencia y aportes fueron invaluable, haciendo este estudio más integral y relevante.

A todo el equipo colaborar de CENAIM, quienes mediante el acompañamiento científico aportaron en el trabajo de investigación;

Irma Betancourt, Marta Borbor, Karina Reyes, Ramiro Solórzano,
Rosita Malavé y Juan Muñoz.

A mis padres Sr. Ángel Francisco Pozo Borbor y Sra. Clotilde Bertha
Miranda Mateo, porque supieron darme de muchas formas el estímulo y
apoyo.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Ángel Francisco Pozo Borbor y Cleotilde Bertha Miranda Mateo quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

A mis hermanos Wilmer, Selenita, Ángel, Haydee y Sandra por el apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi amiga Martha Borbor Suárez, por apoyarme en los análisis de laboratorio durante el desarrollo de la tesis.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dra. Maria Isabelita Jimenez Feijoo
DECANO O DELEGADO

Dr. Stanislaus Sonnenholzner School
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

Dra. Bonny Bayot Arroyo
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

Dr. Paúl Guillén Mena
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

Dra. Jenny Rodríguez León
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 3

Dr. Edgar Zapata Vivenes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 4

Dr. Juan Ortiz Tirado
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 5

DECLARACIÓN EXPRESA

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

Francisco Hernan Pozo Miranda

Glosario

Ácido indol-3-acético: Una auxina predominante en las plantas, que regula varios procesos fisiológicos, incluida la división celular, el alargamiento y la diferenciación de tejidos.

Antioxidantes: Sustancias que neutralizan los radicales libres dañinos, protegiendo las células del daño oxidativo y manteniendo la homeostasis celular.

Auxinas: Fitohormona que regulan el crecimiento y el desarrollo, influyendo en procesos como el alargamiento celular, la iniciación de las raíces y la dominancia apical.

Extractos crudos: Mezclas sin refinar obtenidas de fuentes biológicas, que contienen una variedad de compuestos potencialmente útiles en estudios farmacológicos o bioquímicos.

Inmunoestimulantes: Agentes que potencian la actividad del sistema inmunológico, potenciando las defensas frente a patógenos o enfermedades.

Expresión génica: El proceso mediante el cual la información codificada en los genes se utiliza para producir productos funcionales como proteínas o moléculas de RNA.

Macroalgas: Algas marinas multicelulares, macroscópicas con importancia ecológica y diversas aplicaciones en alimentación, medicina e industria.

Microalgas: Organismos fotosintéticos microscópicos que habitan diversos ambientes acuáticos y ofrecen aplicaciones potenciales en biocombustibles, nutrición y biorremediación.

Péptidos antimicrobianos: Pequeñas proteínas con actividad antimicrobiana de amplio espectro, que sirven como componentes importantes de la inmunidad innata en varios organismos.

Profenol oxidasa (proPO): Una enzima crucial en la respuesta inmune de los insectos, que cataliza la producción de melanina para encapsular y neutralizar patógenos.

Supervivencia: La capacidad de un organismo para persistir y prosperar en su entorno, lo que a menudo implica adaptaciones a factores estresantes y desafíos ambientales.

Terapéutico: Relativo al tratamiento o intervención médica encaminada a aliviar síntomas, curar enfermedades o restaurar la salud.

Toxina: Compuestos producidos biológicamente nocivos para los organismos. A menudo lo emplean los patógenos para causar daños y facilitar la infección en los huéspedes.

Virulencia: Una medida de la capacidad de un patógeno para causar enfermedad. Determinado por factores como toxinas, mecanismos de adhesión y estrategias de evasión inmune.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	xii
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvii
Resumen	xix
CAPITULO I Introducción y objetivos.....	1
Antecedentes y justificación.....	5
Justificación.....	6
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
capítulo ii. Marco Teórico	8
1.1 Desafíos sanitarios en la producción de larvas de camarón	8
1.2 Etapas larvarias y vulnerabilidad a infecciones	9
1.3 Sistema inmune de camarones <i>P. vannamei</i>	11
1.4 Factores biológicos que afectan la respuesta inmune de camarones <i>P. vannamei</i>	12
1.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> : Factores de virulencia y mecanismos de infección	14
1.6 Rol de micro y macroalgas.....	19
1.7 Compuestos bioactivos en micro y macroalgas.....	20
Capítulo III. Metodología.....	25
2.1 Evaluación del efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre la virulencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de la AHPND en larvas <i>Penaeus vannamei</i>	25
2.1.1 Muestreo e identificación taxonómica de macroalgas.....	27
2.1.2 Extracción de auxinas totales de las muestras de macroalgas.....	28
2.1.3 Cuantificación y detección de IAA en extractos de auxinas de macroalgas... 28	
2.1.4 Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	29
2.1.5 Efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre el crecimiento de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	30
2.1.6 Efecto los extractos ricos en IAA de macroalgas sobre factores de virulencia de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	31
2.1.6.1 Producción de exopolisacáridos.....	31
2.1.6.2 Niveles de formación de biopelícula	32
2.1.6.3 Motilidad de enjambre.....	32
2.1.6.4 Acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia	33
2.1.7 Análisis de toxicidad de los extractos ricos en IAA de macroalgas en <i>P. vannamei</i>	35
2.1.7.1 Prueba <i>in vitro</i> de toxicidad de los extractos ricos en IAA de macroalgas en hemocitos de <i>P. vannamei</i>	35
2.1.7.2 Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad de la bacteria tratada con los extractos ricos en IAA de macroalgas en postlarvas <i>P. vannamei</i>	35
2.1.8 Prueba de desafío de postlarvas <i>P. vannamei</i> infectadas con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> tratada con extractos ricos en IAA de macroalgas	36
2.1.8.1 Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	36

2.1.8.2 Prueba de desafío	37
2.1.9 Análisis de datos	38
2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana e inmunológica de extractos crudos de micro y macroalgas en larvas infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> causante de la AHPND.....	41
2.2.1. Muestreo de macroalgas.....	43
2.2.2. Producción de Microalgas.....	43
2.2.3 Obtención de extractos crudos de muestras de macroalgas y microalgas	43
2.2.4 Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	44
2.2.5 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre el crecimiento de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	44
2.2.6 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre factores de virulencia de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	45
2.2.6.1 Producción de exopolisacáridos	45
2.2.6.2 Niveles de formación de biopelículas.....	45
2.2.6.3 Motilidad de enjambre.....	46
2.2.7 Análisis de toxicidad de los extractos crudos de macroalgas y microalgas en <i>P. vannamei</i>	46
2.2.7.1 Prueba <i>in vitro</i> de toxicidad en hemocitos de <i>P. vannamei</i>	46
2.2.7.2 Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad en postlarvas <i>P. vannamei</i>	46
2.2.8 Prueba de desafío de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> tratadas con extractos crudos e infectadas con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	47
2.2.8.1 Activación de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	47
2.2.8.2 Prueba de desafío	47
2.2.9 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre la acumulación relativa de transcritos de genes de la respuesta inmune en post larvas <i>P. vannamei</i>	49
2.2.10 Determinación de compuestos de extractos crudos de microalgas y macroalgas por análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	51
2.2.11 Análisis de datos	51
Capítulo iV Resultados y Discusión	55
3.1 Evaluación del efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> causante de la AHPND en larvas <i>P. vannamei</i>	55
3.1.1 Identificación taxonómica de macroalgas.....	55
3.1.2 Cuantificación y detección de IAA en extractos de auxinas de macroalgas... ..	55
3.1.3 Efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre el crecimiento de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	57
3.1.4 Efecto de los extractos ricos en IAA de macroalgas sobre factores de virulencia de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	60
3.1.4.1 Producción de exopolisacáridos	60
3.1.4.2 Niveles de formación de biopelículas.....	61
3.1.4.3 Motilidad de enjambre.....	61
3.1.4.4 Acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia	64

3.1.5 Análisis de toxicidad de los extractos ricos en IAA de macroalgas en <i>P. vannamei</i>	66
3.1.6 Prueba de desafío de postlarvas <i>P. vannamei</i> con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> tratada con extractos ricos en IAA de macroalgas	67
3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana e inmunológica de extractos crudos de macroalgas y microalgas en larvas infectadas con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> causante de la AHPND	72
3.2.1 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre el crecimiento de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	72
3.2.2 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre factores de virulencia de la cepa patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	77
3.2.2.1 Producción de exopolisacáridos	77
3.2.2.2 Niveles de formación de biopelículas.....	77
3.2.2.3 Motilidad de enjambre.....	78
3.2.4 Análisis de toxicidad de los extractos crudos de macroalgas y microalgas en <i>P. vannamei</i>	82
3.2.5 Prueba de desafío de postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> tratadas con extractos crudos e infectadas con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	84
3.2.6 Efecto de los extractos crudos de macroalgas y microalgas sobre la acumulación relativa de transcritos de genes de la respuesta inmune en post larvas <i>P. vannamei</i>	91
3.2.7 Determinación de compuestos de extractos crudos de microalgas y macroalgas por análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	92
Conclusiones	111
RECOMENDACIONES.....	115
Bibliografía.....	117
ANEXOS o apéndices	148
LISTA DE PUBLICACIONES	148

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Conjunto de cebadores utilizados para evaluar la acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i>	34
Tabla II	Conjunto de cebadores utilizados para evaluar la acumulación relativa de transcritos de genes relacionados con la respuesta inmune de <i>P. vannamei</i> .	50
Tabla III	Crecimiento bacteriano (OD _{600nm} , promedio \pm error estándar) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 expuesta a cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA. Control positivo (bacteria no tratada).	59
Tabla IV	Motilidad de enjambre de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres fuentes de IAA y estimada con las pendientes (promedio \pm error estándar, n = 6) de la fase exponencial linealizada de las curvas de motilidad de la bacteria tratada (Gráfico 12).	64
Tabla V	Expresión diferencial (promedios \pm desviación estándar, n = 3) de genes de virulencia (gen housekeeping <i>rpoA</i>) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con IAA sintético y extractos ricos en IAA de las macroalgas <i>P. gymnospora</i> y <i>S. natans</i> relativa al control positivo (bacteria no tratada).	65
Tabla VI	Resultados de la prueba <i>in vitro</i> de toxicidad de MTT de las tres fuentes de IAA en hemocitos de camarón <i>P. vannamei</i> . Valores de unidades de absorbancia medido a OD _{620 nm} están expresados como promedio (\pm error estándar). Control positivo (hemocitos no tratados).	66
Tabla VII	Resultados de la prueba <i>in vivo</i> de toxicidad de las tres fuentes de IAA en postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> (PL9). Valores de supervivencia están expresados como promedio (\pm error estándar).	67
Tabla VIII	Tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada (PL 11, promedio \pm error estándar, n = 6) a 44 horas post infección de postlarvas <i>P. vannamei</i> infectadas en PL9 con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 previamente tratada con dos concentraciones de tres fuentes de IAA. Control positivo (postlarvas infectadas con bacteria no tratada).	69
Tabla IX	Crecimiento bacteriano (OD _{600 nm} , promedio \pm error estándar) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 expuesta a tres concentraciones de extractos crudos de	75

	macroalgas y microalgas. Control positivo (bacteria no tratada).	
Tabla X	Motilidad de enjambre de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas, y estimada con las pendientes (promedio \pm error estándar, n = 6) de la fase exponencial linealizada de las curvas de motilidad (Gráficos 19 y 20).	82
Tabla XI	Resultados de la prueba <i>in vitro</i> de toxicidad de MITT en hemocitos de camarón <i>P. vannamei</i> tratados con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Valores de unidades de absorbancia medido a OD _{620 nm} están expresados como promedio (\pm error estándar, n = 6). Control positivo (hemocitos no tratados).	83
Tabla XII	Resultados de la prueba <i>in vivo</i> de toxicidad de extractos crudos de macroalgas y microalgas en postlarvas de camarón <i>P. vannamei</i> (PL9). Valores de supervivencia están expresados como promedio (\pm error estándar). Control (postlarvas de camarón sin exposición a ningún extracto).	83
Tabla XIII	Tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada a 32 horas post infección de postlarvas <i>P. vannamei</i> (PL 14) tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas y macroalgas (PL11 – PL12) e infectadas con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 (PL13). Control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas).	87
Tabla XIV	Expresión diferencial de genes de la respuesta inmune (promedios \pm desviación estándar, n = 3) de postlarvas <i>P. vannamei</i> (relativa al gen housekeeping β -actin) que recibieron administración de extractos crudos relativa al control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas).	92
Tabla XVI	Identificación de compuestos de macroalgas. El porcentaje de área (\pm DE) indica la abundancia relativa del compuesto. La asignación de las estructuras químicas se efectuó por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas Wiley. 9na edición y NIST 2011 escogiendo aquellos compuestos que presentaron más del 90% de confiabilidad.	95-96
Tabla XVII	Identificación de compuestos de microalgas. El porcentaje de área (\pm DE) indica la abundancia relativa del compuesto. La asignación de las estructuras químicas se efectuó por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas Wiley. 9na edición y NIST 2011 escogiendo aquellos compuestos que presentaron más del 90% de confiabilidad.	97-99

INDICE DE GRÁFICOS

		<i>Página</i>
Gráfico 1	Estadios larvales de camarones <i>P. vannamei</i> .	10
Gráfico 2	Diagrama de un camarón con factores que afectan el sistema inmune.	14
Gráfico 3	Estructura terciara de la toxina binaria PirAB en <i>V. parahaemolyticus</i> causante de AHPND en camarones, elaborado en https://swissmodel.expasy.org/ .	16
Gráfico 4	Moléculas de indol acético, ácido indol-3-acético (IAA), derivados del IAA.	23
Gráfico 5	Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre la virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> causante de AHPND en larvas <i>P. vannamei</i> .	48
Gráfico 6	Diseño experimental utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de extractos crudos de micro y macroalgas en larvas <i>P. vannamei</i> infectadas con <i>V. parahaemolyticus</i> causante de AHPND.	42
Gráfico 7	Especímenes de <i>P. gymnospora</i> y <i>S. natans</i> colectados en la zona submareal rocosa de Ballenita (Santa Elena, Ecuador).	55
Gráfico 8	Cromatogramas obtenidos para las tres fuentes de IAA con el análisis de UPLC (Water Acquity H UPLC® CLASS – PDA e ⁺ detector). (a) Ácido indol-3-acético sintético usado como control de referencia, (b) extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> y (c) extracto rico en IAA de <i>S. natans</i> .	56
Gráfico 9	Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA.	58
Gráfico 10	Producción de exopolisacáridos (promedio \pm error estándar, n = 6, λ_{exc} 405 nm, λ_{em} 500 nm) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> y extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>).	60
Gráfico 11	Niveles de formación de biopelículas (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> y extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>).	61
Gráfico 12	Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con diferentes	63

	concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> y extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>).	
Gráfico 13	Supervivencia acumulada (promedio \pm error estándar, n = 6) de postlarvas <i>P. vannamei</i> post-infección (PL9) con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> tratada con tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> y extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>).	68
Gráfico 14	Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas <i>P. vannamei</i> sobrevivientes al desafío. Postlarvas tratadas con IAA sintético a 4X (a) y 10X (b), postlarvas tratadas con extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i> a 4X (c) y 10X (d).	71
Gráfico 15	Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas. <i>P. gymnospora</i> y <i>S. natans</i> .	73
Gráfico 16	Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas. <i>I. galbana</i> y <i>T. weissflogii</i> .	74
Gráfico 17	Producción de exopolisacáridos (promedio \pm error estándar, n = 6, \square_{exc} 405 nm, \square_{em} 500 nm) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas.	77
Gráfico 18	Niveles de formación de biopelículas (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Tinción con cristal violeta (0.4%).	78
Gráfico 19	Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas. Control (control positivo, bacteria no tratada).	80
Gráfico 20	Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, n = 6) de la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas.	81
Gráfico 21	Supervivencia acumulada de postlarvas <i>P. vannamei</i> tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas (PL 11 - PL12) e infectadas (PL 13) con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2.	85

Gráfico 22	Supervivencia acumulada de postlarvas <i>P. vannamei</i> tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas (PL 11 - PL12) e infectadas (PL 13) con la bacteria patógena <i>V. parahaemolyticus</i> cepa Ba94C2.	86
Gráfico 23	Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas <i>P. vannamei</i> sobrevivientes al desafío. Postlarvas tratadas con <i>P. gymnospora</i> a 4X (a) y 10X (b), postlarvas tratadas con <i>S. natans</i> a 4X (c) y 10X (d) y postlarvas tratadas con <i>I. galbana</i> 4X (e) y 10X (f).	89
Gráfico 24	Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas <i>P. vannamei</i> sobrevivientes al desafío. Postlarvas tratadas con <i>T. weissflogii</i> a 4X (g) y 10X (h) y postlarvas del control positivo a 4X (i) y 10X (j).	90

ABREVIATURAS

%: Porcentaje.
°C: grados centígrados.
µg: microgramo.
µL: microlitro.
µM: micromol.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
AHPND: Enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda.
AMPs: Péptidos antimicrobianos (siglas en inglés).
ARN: Ácido ribonucleico.
BHT: Hidroxitolueno butilado.
CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
Ct: Número de ciclos.
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
DHA: Ácido docosahexaenoico.
dNTP: Trifosfato de desoxirribonucleósidos (siglas en inglés).
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
EF-1 α : Factor de elongación – 1 alfa.
EPA: Ácido eicosapentaenoico.
EPS: Exopolisacáridos.
flaA: flagelina A.
h: horas.
HCl: Ácido clorhídrico.
IAA: Ácido indol-3-acético (siglas en inglés).
JAK-STAT: Vía del transductor de señal de janus quinasa y del activador de la transcripción (siglas en inglés).
KCL: Cloruro de potasio.
L: Litro.
mg: miligramo.
MH: Agar Mueller Hinton.
Min: minutos.
mL: mililitro.
mm: milímetro.
mM: milimolar.
MTT: Prueba de viabilidad celular in vitro del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
NaCl: Cloruro de sodio.
NF- κ B: Factor nuclear kappa B (siglas en inglés).
nm: nanómetro.
OD: Densidad Óptica (siglas en inglés).
OpaR: Regulador transcripcional OpaR (siglas en inglés).
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (siglas en inglés).

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (siglas en inglés).
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés).
Pen4: Péptido antimicrobiano peneidina Tipo 4.
pH: Potencial de hidrógeno.
PirAB: Proteína recombinante relacionada con el insecto *Photorhabdus* en *Vibrio parahaemolyticus* (PirA y PirB)
PO: fenol oxidasa.
ppm: partes por millón.
proPO: pro-fenol oxidasa (siglas en inglés).
proPO-I: pro Fenol Oxidasa tipo I.
proPO-II: pro Fenol Oxidasa tipo II.
PRRs: Receptores de Reconocimiento de patrones (siglas en inglés).
PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.
PVP: Polivinilpirrolidona
QS: Quorum sensing.
Rho: Factor de terminación rho (ρ).
RNasa: Enzima que cataliza la hidrólisis de ARN.
ROS: Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés).
rpm: Revoluciones por minuto.
rpoA: subunidad de la ARN polimerasa A.
rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal.
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.
RT-qPCR: Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (siglas en inglés).
s: segundos.
SD: Discos estériles.
TDH: Hemolisina directa termoestable (siglas en inglés).
TLR: Receptores tipo peaje (siglas en inglés).
TRH: Hemolisina relacionada con TDH (siglas en inglés).
TSA: Agar triptico de soya.
U: Unidades.
UFC: Unidades formadoras de colonias.
UPLC: Cromatografía líquida de ultra rendimiento (siglas en inglés).
 β -actin: Beta actina.
 Δ Ct: delta Ct.
 $\Delta\Delta$ Ct: delta delta Ct.

RESUMEN

La necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) es una enfermedad bacteriana emergente del camarón de cultivo que provoca importantes pérdidas económicas. La enfermedad es causada principalmente por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* que produce las toxinas binarias *PirA* y *PirB* causantes de la muerte de los camarones afectados, principalmente en cultivos de larvas, una de las etapas productivas afectadas por AHPND, por lo que es urgente desarrollar estrategias terapéuticas de origen natural, como alternativa a los antibióticos. En este contexto, se investigó el potencial terapéutico de dos especies de macroalgas (*Padina gymnospora* y *Sargassum natans*) y dos especies de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Thalassiosira weissflogii*) sobre postlarvas de camarón *Penaeus vannamei* infectadas con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. La investigación se realizó a través de dos estudios, empleando dos tipos de extractos distintos e independientes entre sí. En el primer estudio se prepararon extractos de auxinas, ricos en ácido indol-3-acético (IAA), de las dos especies de macroalgas, y se evaluaron sus efectos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en postlarvas *P. vannamei*. En el segundo estudio se prepararon extractos totales (crudos) de las cuatro especies de algas, para evaluar sus efectos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* y la expresión de los genes de la respuesta inmune de las postlarvas infectadas con la bacteria patógena tratada. Además, se identificaron los compuestos presentes en los extractos crudos mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados muestran que los extractos ricos en IAA de *P. gymnospora* y *S. natans* disminuyeron los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* (producción de exopolisacáridos, motilidad y expresión relativa de genes de virulencia). En particular, el extracto rico en IAA de *P. gymnospora* (20 µg/L) destacó en la prueba de desafío con la bacteria patógena tratada, mostrando una supervivencia acumulada y un tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas significativamente superiores al control positivo. En contraste, los extractos crudos de *I. galbana* y *T. weissflogii* redujeron la virulencia de *V. parahaemolyticus*, disminuyendo los niveles de formación de biopelículas a la concentración más alta evaluada (14 ppm), y la motilidad de enjambre a todas las concentraciones evaluadas.

De igual manera, en la prueba de desafío, la supervivencia acumulada y el tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas fueron significativamente superiores al control positivo cuando recibieron el tratamiento del extracto crudo de *I. galbana* y *T. weissflogii* a la concentración más baja (0.14 ppm). En cuanto a la respuesta inmune de las postlarvas supervivientes a la infección, los cuatro extractos crudos incrementaron la expresión de los genes evaluados. Algunos compuestos presentes en los extractos crudos, especialmente aquellos obtenidos de las microalgas, podrían estar explicando la efectividad observada en el estudio. Al mismo tiempo, los extractos estudiados (ricos en IAA y crudos) no mostraron actividad antibacteriana, bactericida, o bacteriostática, ni fueron tóxicos para *P. vannamei*, revelando un potencial de aplicabilidad para el manejo de enfermedades bacterianas en acuicultura. Particularmente, la efectividad en la prueba de desafío de los extractos crudos de microalgas a la más baja concentración evaluada sugiere que son candidatos potenciales para su uso en terapias antivirulentas contra AHPND.

CAPITULO I INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) provoca altas mortalidades en granjas de cultivo de camarón y pérdidas económicas significativas en todo el mundo, especialmente en Asia (Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015). La enfermedad es causada por cepas bacterianas patógenas pertenecientes a las especies del género *Vibrio*: *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio punensis*, pero especialmente por *Vibrio parahaemolyticus* (Tran et al., 2013; Kondo et al., 2014; Ahn et al., 2017; Restrepo et al., 2018; P. Liu et al., 2022). Estas cepas patógenas poseen plásmidos que expresan las toxinas PirAB (PirA y PirB) que causan un daño severo al hepatopáncreas del camarón, provocando finalmente la muerte de los animales infectados (Tran et al., 2013; Han et al., 2015). En la mayoría de los países afectados, la enfermedad ocurre durante los primeros días después de la siembra de los estanques (Joshi et al., 2014; Nunan et al., 2014; Soto-Rodriguez et al., 2015). Sin embargo, también se observan altas mortalidades en larvas de camarón *Penaeus vannamei* (Reyes et al., 2022). Debido a que el cultivo de larvas es la fase pilar para la producción de camarón, es de gran importancia encontrar estrategias terapéuticas apropiadas que puedan aplicarse para proteger a las larvas de la enfermedad.

El uso de antibióticos es la estrategia más popular para controlar las infecciones bacterianas en la acuicultura (Cabello, 2006). Sin embargo, tiene importantes desventajas, principalmente en la transmisión horizontal de genes de resistencia a antibióticos (Casas et al., 2005; Zhang, Li & Sun., 2011) a las bacterias del sistema de producción. En este contexto, se necesitan urgentemente métodos naturales de prevención y control para las enfermedades bacterianas que afectan a la producción de camarón. Se han sugerido algunas alternativas para controlar la enfermedad de AHPND. Estas incluyen: (1) probióticos (Chumpol et al., 2017; Girija et al., 2018; Domínguez-Borbor et al., 2019; Ramírez et al., 2022), (2) bacteriófagos (Jun et al., 2016), (3) bacterias depredadoras (*Bdellovibrio* spp.) (Kongrueng et al., 2017) y (4) productos derivados de macroalgas (Kumar et al., 2022). El uso de algas marinas, o sus productos derivados, es una estrategia potencial para controlar la enfermedad por la capacidad de producir compuestos bioactivos con propiedades antibacterianas, antioxidantes e

inmunoestimulantes (Deng & Chow, 2010; Kanjana et al., 2011; Chen et al., 2014; Molina-Cardenas et al., 2014; Moussavou et al., 2014; Thanigaivel et al., 2016). Por ejemplo, las postlarvas de *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas con *Chlorella vulgaris* han mostrado un incremento en la respuesta inmune (Maliwat et al., 2017). Además, los extractos de microalgas pueden interferir en la virulencia de *V. harveyi* (Natrah et al., 2011).

Las plantas superiores contienen una gran cantidad de fitohormonas que funcionan como reguladoras del crecimiento de los tejidos vegetales (Lee et al., 2015a; Lee et al., 2015b; Lee et al., 2007; Zhang et al., 2019). Existen ocho grupos de fitohormonas: auxinas, citoquinas, ácido abscísico, etileno, giberelina, brasinoesteroides, jasmonatos, y ácido salicílico (Wang et al., 2021). Las auxinas están predominantemente compuestas por indoles, de las cuales, el ácido indol-3-acético (siglas en inglés IAA) representa aproximadamente el 90% (Östin et al., 1998). Algunos tipos de auxinas han sido identificados en muchas especies de macroalgas (Dawes, 1971; Sanderson et al., 1987; Stirk & Van Staden, 1997; Bagwell et al., 2014), sus funciones biológicas son parecidas al de las plantas superiores (Wang et al., 2021), y la literatura reporta algunos protocolos de extracción (Stuepp et al., 2017; Van Overbeek, 1938). La molécula de IAA también ha sido encontrada en microalgas pertenecientes a los grupos cianofitas y clorófitas (Romanenko et al., 2015; Shoubaky & Salem, 2016), y aunque según análisis genómico las rutas de biosíntesis de las hormonas de las plantas superiores parecen haber evolucionado a partir de las microalgas, no se conoce completamente las rutas de señalamiento de las fitohormonas en estas últimas (Evans & Trewavas, 1991; Lu & Xu, 2015). Además, existen pocos estudios sobre la producción endógena de fitohormonas de microalgas, conociéndose más bien el efecto de fitohormonas exógenas sobre las células de las microalgas (Zhao et al., 2019). Se ha aducido que el poco conocimiento sobre la regulación de las fitohormonas en las microalgas obedece al bajo contenido de fitohormonas en las células de las microalgas, y a la complejidad de los métodos de detección (Wang et al., 2021). Sin embargo, el IAA es una fitohormona particularmente interesante para el manejo de las infecciones bacterianas porque actúa como señal extracelular para regular la virulencia en bacterias (Wang et al., 2001; Mueller et al., 2009), como *Vibrio splendidus* y *V. campbellii* (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2017). Por otro lado, los extractos crudos de macroalgas y las microalgas, así como con los tejidos vegetales de las plantas superiores, se caracterizan

por tener una amplia gama de otras sustancias bioactivas con aplicaciones biotecnológicas, tales como agentes antimicrobianos que han demostrado ser efectivos para la inhibición del crecimiento de patógenos (Hsieh et al., 2001; Hu et al., 2004; Vairappan et al., 2001; Bashir et al., 2018).

Teniendo en cuenta la versatilidad de las macroalgas como herramientas biotecnológicas, se investigó el potencial terapéutico de dos especies de macroalgas (*Padina gymnospora* y *Sargassum natans*) y dos especies de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Thalassiosira weissflogii*) sobre postlarvas de camarón *P. vannamei* infectadas con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. La investigación se realizó a través de dos estudios, empleando dos tipos de extractos distintos e independientes entre sí. En el primer estudio se planteó la hipótesis que, dado el hecho de que las macroalgas contienen IAA, y que éste regula la virulencia en ciertas bacterias patógenas acuícolas, los extractos de auxinas de dos especies de macroalgas marinas (*P. gymnospora* y *S. natans*), ricos en IAA, podrían disminuir la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en larvas de camarón *P. vannamei*. Para probar esta primera hipótesis se prepararon extractos de auxinas, ricos en IAA, de las dos especies de macroalgas usando metanol y ácido fórmico como solventes. Se evaluaron los efectos de los extractos ricos en IAA sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en postlarvas *P. vannamei*. En esta primera parte del estudio no se analizaron especies de microalgas debido al bajo contenido de fitohormonas reportado en la literatura y a la dificultad que se tuvo en encontrar protocolos de extracción de auxinas para microalgas. En el segundo estudio se hipotetizó que las cuatro especies de algas despliegan propiedades antibacterianas y/o mejoran la respuesta inmune en postlarvas de camarón *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND. Para probar esta segunda hipótesis se prepararon extractos totales (crudos) de las cuatro especies de algas usando etanol como solvente. Se evaluaron los efectos de los extractos crudos etanólicos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* y la expresión de los genes de la respuesta inmune de las postlarvas infectadas con la bacteria patógena tratada. Además, se identificaron los compuestos presentes en los extractos crudos mediante análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta forma, se estudiaron dos extractos distintos e independientes entre sí (primer estudio: extractos ricos en IAA de las dos especies de

macroalgas utilizando metanol y ácido fórmico como solventes; segundo estudio: extractos totales (crudos) de las dos especies de macroalgas y de las dos especies de microalgas, utilizando etanol como solvente). Los resultados de estos dos estudios constituyen un aporte al conocimiento de nuevos tratamientos y productos naturales con potencial de aplicabilidad para el manejo práctico de infecciones bacterianas en postlarvas de camarón *P. vannamei*.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En la acuicultura del camarón, las infecciones bacterianas, en particular las causadas por especies del género *Vibrio*, presentan desafíos importantes. Especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio campbellii* y *Vibrio parahaemolyticus* están vinculadas a enfermedades graves como la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que genera pérdidas económicas sustanciales (Tran et al., 2013; Restrepo et al., 2018). Estos patógenos producen toxinas que atacan el hepatopáncreas del camarón, causando altas tasas de mortalidad, especialmente en las primeras fases de producción (Reyes et al., 2022).

Los antibióticos han sido la herramienta principal para controlar los brotes bacterianos en la acuicultura (Cabello, 2006). Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos ha provocado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, lo que genera preocupaciones sobre los riesgos ambientales y para la salud humana (Casas et al., 2005; Zhang, Li y Sun, 2011). La transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos plantea una amenaza importante tanto para las especies acuáticas como para los ecosistemas más amplios.

Dadas estas preocupaciones, los investigadores están explorando enfoques alternativos para controlar las infecciones bacterianas en la acuicultura. Las estrategias biológicas, como el uso de probióticos, han ganado atención por su capacidad para promover comunidades microbianas beneficiosas en camarones y otras especies acuáticas (Chumpol et al., 2017; Domínguez-Borbor et al., 2019). Los probióticos pueden mejorar las respuestas inmunitarias y reducir las infecciones bacterianas (Ramírez et al., 2022). Los bacteriófagos, virus que atacan y eliminan bacterias específicas, también ofrecen una alternativa prometedora (Jun et al., 2016). Este enfoque permite el control específico de bacterias dañinas sin alterar la microbiota beneficiosa.

Otra solución emergente involucra a bacterias depredadoras como *Bdellovibrio spp.*, que se alimentan de bacterias patógenas, lo que ayuda a mantener el equilibrio microbiano (Kongrueng et al., 2017). Además, los productos derivados de las algas marinas, ricos en compuestos antibacterianos e inmunoestimulantes, han demostrado ser prometedores en la reducción de las infecciones bacterianas (Deng y Chow, 2010; Kanjana et al., 2011; Moussavou et al., 2014; Kumar et al., 2022). Las fitohormonas como el ácido indol-3-acético

(IAA) que se encuentran en las macroalgas también pueden desempeñar un papel en el control de la virulencia bacteriana (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2017), lo que proporciona un enfoque natural innovador para el manejo de enfermedades.

JUSTIFICACIÓN

En la acuicultura del camarón, las infecciones bacterianas, en particular las causadas por vibrios, plantean amenazas importantes para la producción y la rentabilidad. Especies como *Vibrio harveyi*, *Vibrio owensii*, *Vibrio campbellii* y *Vibrio parahaemolyticus* son responsables de enfermedades como la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND), que provoca enormes pérdidas económicas (Tran et al., 2013; Restrepo et al., 2018). Estas bacterias liberan toxinas que dañan gravemente el hepatopáncreas del camarón, lo que genera altas tasas de mortalidad, especialmente durante las primeras etapas de producción (Reyes et al., 2022). El uso frecuente de antibióticos ha sido una contramedida estándar (Cabello, 2006); sin embargo, ha contribuido al aumento de la resistencia a los antibióticos, lo que plantea riesgos ambientales y de salud (Casas et al., 2005; Zhang, Li y Sun, 2011).

Alternativas innovadoras como los probióticos, bacteriófagos y bacterias depredadoras (Chumpol et al., 2017; Domínguez-Borbor et al., 2019; Jun et al., 2016; Kongrueng et al., 2017) están ganando terreno como estrategias sustentables de manejo de enfermedades. Además, los compuestos bioactivos de las macroalgas muestran potencial para controlar los vibriones patógenos (Deng y Chow, 2010; Kanjana et al., 2011; Moussavou et al., 2014). Además, las fitohormonas como el ácido indol-3-acético (IAA) influyen en la virulencia bacteriana, presentando nuevas vías para el control de enfermedades (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2017). Estas alternativas pueden revolucionar el manejo de enfermedades bacterianas, reduciendo la dependencia de los antibióticos y mejorando las prácticas sustentables de cultivo de camarón.

A continuación, se resumen las hipótesis, objetivos generales y específicos del estudio.

HIPÓTESIS

- (1) Las macroalgas tienen el potencial de disminuir la virulencia en *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND a través del mecanismo indol.
- (2) Las macro y microalgas despliegan propiedades antibacterianas y/o mejoran la respuesta inmune en larvas infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el potencial terapéutico de las micro y macroalgas en larvas *Penaeus vannamei* infectadas con *Vibrio parahaemolyticus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Evaluar el efecto de extractos de macroalgas, ricos en indol, sobre la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND en larvas *Penaeus vannamei*.
- (2) Evaluar la actividad antimicrobiana e inmunológica de extractos de micro y macroalgas en larvas infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* causante de AHPND.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

1.1 DESAFÍOS SANITARIOS EN LA PRODUCCIÓN DE LARVAS DE CAMARÓN

La acuicultura de camarón ha experimentado una notable expansión en todo el mundo, impulsada principalmente por la creciente demanda en los mercados internacionales (Ababouch et al., 2023). Sin embargo, esta trayectoria de crecimiento plantea una serie de desafíos sanitarios que generan una preocupación crítica por el potencial efecto negativo en los rendimientos de la producción (Iber & Kasan, 2021; Emerenciano et al., 2022). Así, la fase de larvicultura de la producción de camarón resulta particularmente vulnerable a los desafíos sanitarios debido a la naturaleza delicada de las larvas de camarón. Particularmente, las infecciones bacterianas causadas por especies del género *Vibrio* del clado *Harveyi*, como *V. harveyi* (Kumar et al., 2021), *Vibrio alginolyticus* (Tran et al., 2013; Thitamadee et al., 2016) y *V. campbellii* (Dong et al., 2017; Liang et al., 2022; Yu et al., 2023) son comunes en las larviculturas de producción de camarón, causando altas mortalidades. Estas cepas bacterianas han provocado enfermedades, como el síndrome de Bolitas, causado por *V. harveyi* (Robertson et al., 1998) y el síndrome Zoea 2, causado por *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Vandenberghe et al., 1999). Al momento una de las especies del género *Vibrio* más patógenas en larviculturas de camarón es *V. parahaemolyticus* (Reyes et al., 2022). Algunas cepas de *V. parahaemolyticus* son portadoras de los genes *PirAB* codificantes para las toxinas binarias PirAB causantes de AHPND, y por consiguiente provocan altas mortalidades en las larviculturas de camarón *P. vannamei* (Reyes et al., 2022). En este

contexto, es importante el despliegue de estrategias de control que abarquen desde la utilización de probióticos (Butt et al., 2021; Subasinghe et al., 2023; Tamilselvan & Raja, 2024), hasta el uso de inmunoestimulantes o agentes antimicrobianos (Naiel et al., 2021; Kumar et al., 2023).

1.2 ETAPAS LARVIARIAS Y VULNERABILIDAD A INFECCIONES

El camarón *P. vannamei* pasa por un proceso complejo de desarrollo larvario desde la etapa de nauplio, el cual posee una estructura corporal simple caracterizada por tres pares de apéndices, lo que facilita movimientos rápidos de natación para dispersarse en la columna de agua (Lage et al., 2017; Goytortúa-Bores et al., 2023) (Gráfico 1). Los nauplios usan principalmente las reservas de energía endógena almacenadas dentro del saco vitelino y también absorben nutrientes a través de su aparato bucal (Akbar & Fazli, 2023; Arsad et al., 2023).

La etapa de nauplios generalmente persiste durante 12 a 24 horas antes de mudar a la siguiente fase de desarrollo denominada Zoea. Esta etapa está marcada por notables cambios morfológicos y adaptaciones funcionales como el desarrollo de apéndices adicionales, extremidades torácicas para nadar y alimentarse, junto con estructuras sensoriales como ojos compuestos y antenas que les permiten detectar señales ambientales y localizar presas (Lage et al., 2017; Goytortúa-Bores et al., 2023). La etapa de Mysis representa un avance adicional en la diferenciación morfológica y las adaptaciones conductuales, ya que los órganos poseen una estructura corporal robusta con apéndices bien desarrollados, que incluyen periópodos y urópodos para nadar (Lage et al., 2017;

Goytortúa-Bores et al., 2023). En esta etapa larval los órganos presentan una mayor actividad alimentaria, dieta variada con fitoplancton, zooplancton y detritos (Ochoa-Pereira & Velásquez-López, 2023). Finalmente, las larvas llegan a la fase de postlarvas, marcando el cambio de la fase planctónica a la bentónica de su ciclo de vida, con apéndices completamente desarrollados que conducen a una mayor motilidad y comportamiento de búsqueda de alimento (Goytortúa-Bores et al., 2023).

Si bien estas etapas experimentan un rápido crecimiento y desarrollo, sus sistemas inmunes se encuentran incompletos (Song & Li, 2014; Kulkarni et al., 2020), lo que los hace más susceptibles a patógenos y factores estresantes ambientales que potencian aún más la infección, comprometiendo al organismo. Además, las condiciones subóptimas de calidad de agua pueden aumentar la virulencia de los agentes infecciosos para evadir las defensas del huésped, acelerando la transmisión y propagación de enfermedades entre las poblaciones de camarón (Pinto et al., 2020; Zhang et al., 2023 a).

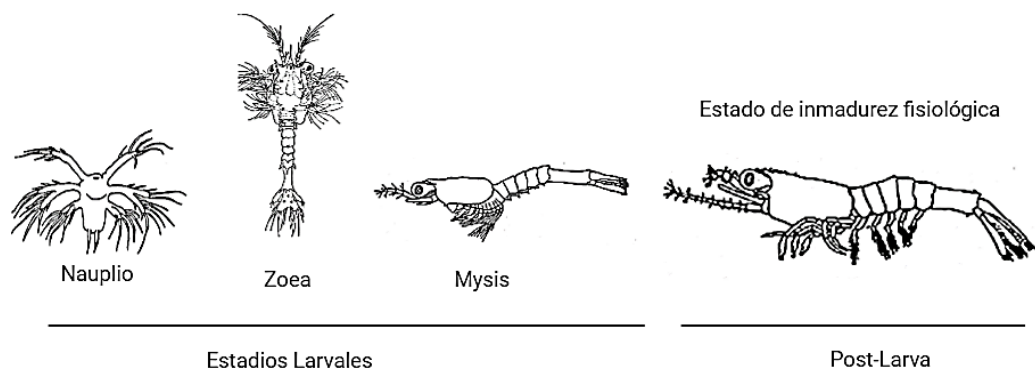


Gráfico 1. Estadios larvales de camarones *P. vannamei*.

1.3 SISTEMA INMUNE DE CAMARONES *P. vannamei*

El camarón *P. vannamei* depende principalmente de su sistema inmune innato para combatir los patógenos y generar una respuesta efectiva, siendo fundamental los receptores de reconocimiento de patrones (siglas en inglés PRRs). Estos reconocen sitios moleculares conservados presentes en la superficie de los patógenos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (siglas en inglés PAMPs) (Anderson & Seijio, 2010; Kulkarni et al., 2020; Tran et al., 2022).

Los PRRs desempeñan un papel crucial en el inicio de las respuestas inmunitarias al unirse a los PAMPs y desencadenar cascadas de señalización posteriores para la regulación del sistema inmune en *P. vannamei* (Kulkarni et al., 2020), la cual es organizada por una compleja red de vías de señalización y moléculas reguladoras. Los receptores tipo peaje (siglas en inglés TLR), la vía del transductor de señal de janus quinasa y del activador de la transcripción (siglas en inglés JAK-STAT), junto al factor nuclear kappa B (siglas en inglés NF- κ B) son las vías de señalización claves implicadas en la activación inmunitaria (Mercy et al., 2020; Zuo et al., 2020; Luo et al., 2022; Tran et al., 2022; Wang et al., 2023) para la expresión génica en respuesta al desafío de patógenos (Farhadi et al., 2023).

La primera respuesta inmune en camarones peneidos corresponde a la activación del sistema de la profenol oxidasa (proPO). Se da por acción de una enzima precursora inactiva que sufre escisión proteolítica tras la activación por serina proteinasas, formando la fenol oxidasa (PO) activa (Alinejad et al., 2020; Wang et al., 2022; Zhou et al., 2021), la cual juega un papel crucial en la melanización, un mecanismo de defensa que encapsula e inmoviliza los patógenos, limitando así su propagación dentro del organismo (Panigrahi et

al., 2020; Cerenius & Söderhäll, 2021; Zhou et al., 2021). La profenol oxidasa I (proPO-I) y la profenol oxidasa II (proPO-II) son dos isoformas de proPO que se encuentran en *P. vannamei* (Lv et al., 2021). Otros componentes principales de la respuesta inmune de los camarones son los péptidos antimicrobianos (siglas en inglés AMPs). Las peneidinas y crustinas son dos familias de AMPs, sintetizadas y secretadas por tejidos relacionados con el sistema inmune como hemocitos, branquias y hepatopáncreas (Sun et al., 2021; Wu et al., 2021; Ghaffarizadeh et al., 2022; Saucedo-Vázquez et al., 2022; Guryanova et al., 2023). Las peneidinas poseen una potente actividad antibacteriana, mientras que las crustinas están involucradas en la defensa contra bacterias Gram-negativa y virus de ADN (Ming et al., 2019), desempeñando un papel importante en la regulación de la respuesta inmune del camarón (Aweya et al., 2021; Saucedo-Vázquez et al., 2022; Quyoom & Iqbal, 2023).

1.4 FACTORES BIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA RESPUESTA INMUNE DE CAMARONES *P. vannamei*

Algunos factores biológicos influyen la respuesta inmune en larvas de camarón *P. vannamei*, entre ellos, la variación genética (Basuki et al., 2023), el estado nutricional (Kersanté et al., 2021; Suantika et al., 2021; Barreto et al., 2023) y la microbiota intestinal (Wang et al., 2020; Garibay-Valdez et al., 2020, 2021; Prathiviraj et al., 2021; Callac et al., 2024) (Gráfico 2). Los nutrientes esenciales desempeñan un papel importante en la proliferación de células inmunitarias (Truong et al., 2023), ya que los macronutrientes proporcionan energía y componentes básicos para las células inmunitarias, mientras que los micronutrientes actúan como cofactores de las enzimas y moduladores de las respuestas inmunitarias (Xie et al., 2020; Braga et al., 2023; Frías-Gómez et al., 2023;

Vijayaram et al., 2023). Por otro lado, la microbiota intestinal también desempeña un papel crucial en la configuración de la respuesta inmune.

Los microorganismos beneficiosos contribuyen a la modulación inmunitaria, la exclusión de patógenos y el metabolismo de los nutrientes, mejorando la resistencia del huésped a las infecciones (Wang et al., 2020; Garibay-Valdez et al., 2020, 2021; Prathiviraj et al., 2021; Callac et al., 2024). En tanto que, una disbiosis o alteración del equilibrio de la microbiota intestinal, pueden comprometer la función inmune y aumentar la susceptibilidad a las enfermedades (Beltrán et al., 2024; Chang et al., 2023; Huang et al., 2020). De igual manera el desarrollo de las primeras etapas larvales es otro factor biológico crucial para la respuesta inmune debido al desarrollo de los órganos inmunitarios como el hepatopáncreas, hemocitos y órgano linfoide (Alvarez-Lee et al., 2020; Anghong et al., 2021; Noble et al., 2023) (Gráfico 2).

Principalmente, la variabilidad en la actividad de la profenol oxidasa (Basuki et al., 2023) y las diferencias en la expresión de péptidos antimicrobianos contribuyen a las variaciones individuales en la resistencia a las enfermedades (Deris et al., 2020; Aweya et al., 2021; Sun, et al., 2021; Hossain et al., 2023). En consecuencia, para un diseño efectivo de estrategias de control de enfermedades es importante conocer como influyen los productos naturales potencialmente terapéuticos sobre los factores inmunes con el fin de salvaguardar la salud en los cultivos larvarios de camarón.

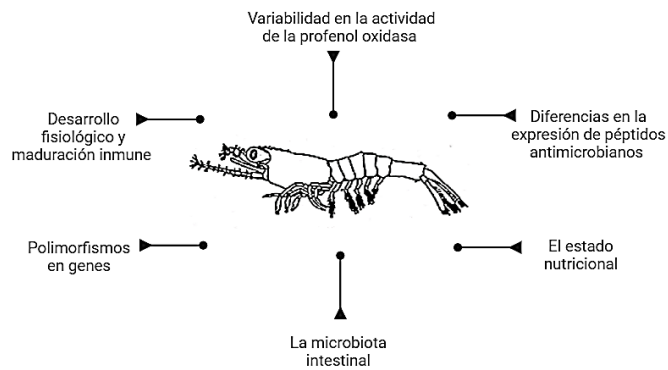


Gráfico 2. Diagrama de un camarón con factores que afectan el sistema inmune.

1.5 *Vibrio parahaemolyticus*: FACTORES DE VIRULENCIA Y MECANISMOS DE INFECCIÓN

V. parahaemolyticus es una bacteria Gram-negativa de ambientes marinos y estuarinos, conocida por ser el agente etiológico de enfermedades gastrointestinales en humanos causadas por el consumo de mariscos poco cocidos (Yang et al., 2020). Los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* incluyen proteínas reguladoras de la comunicación bacteriana (quorum sensing – QS) (Haifa-Haryani et al., 2023; Yang et al., 2023), proteínas de adhesión, sistemas de secreción y toxinas. QS es un mecanismo de comunicación bacteriana por el cual las bacterias patógenas regulan procesos importantes de virulencia a través de la liberación y detección de moléculas señaladoras (Boyer & Wisniewski-Dyé, 2009). Los mecanismos de QS incluyen el control de la expresión de factores de virulencia, tales como la producción de exopolisacáridos (Yang & Defoirdt, 2015), producción de biopelículas (Mizan et al., 2016), y la motilidad (Yang & Defoirdt, 2015). En *V. parahaemolyticus*, OpaR es el máster regulador de QS, que coordina y regula las expresiones patogénicas (Sun et al., 2022).

Las proteínas de adhesión facilitan la unión bacteriana a los tejidos del huésped, lo que permite la colonización y el establecimiento de la infección (Saputra et al., 2023). Los sistemas de secreción, como los de tipo III, permiten a *V. parahaemolyticus* administrar moléculas efectoras directamente a las células del huésped, lo que ayuda a la invasión del patógeno y manipulación de los procesos celulares en el huésped (Kumar et al., 2021; Viana et al., 2021; Rosilan et al., 2024). De igual forma, otras toxinas producidas por *V. parahaemolyticus*, como la hemolisina directa termoestable (siglas en inglés TDH), y la hemolisina relacionada con TDH (siglas en inglés TRH), contribuyen al daño de las células huésped, la destrucción de los tejidos y la patogénesis (Prithvisagar et al., 2021; Zhang et al., 2021; Xue et al., 2023).

Recientemente, las cepas de *V. parahaemolyticus* obtuvieron un nuevo factor de virulencia que causa AHPND mediante la adquisición de plásmidos portadores de genes codificantes para las toxinas PirAB, originalmente identificadas en la bacteria *Photobacterium luminescens* (González-Gómez et al., 2020; Luangtrakul et al., 2021; Li et al., 2022; Nguyen et al., 2023). Estas toxinas PirAB son las responsables de provocar la muerte en los animales afectados por AHPND (Tran et al., 2013; Han et al., 2015). PirAB es una proteína efectora del sistema de secreción de tipo III (Luangtrakul et al., 2021; Soto-Rodriguez et al., 2022 b) que consta de dos subunidades: PirA y PirB, que actúan sinérgicamente para inducir el daño tisular y la muerte huésped (Soto-Rodriguez et al., 2022 b; Tran et al., 2020) (Gráfico 3). Al ingresar a las células huésped, PirAB altera la homeostasis celular (Kumar et al., 2021; Miao et al., 2023), induce apoptosis y desencadena respuestas inflamatorias, lo que provoca destrucción del tejido (Soto-Rodriguez et al., 2022 b). La regulación genética y la expresión de las toxinas PirAB en *V. parahaemolyticus* están influenciadas por señales

ambientales, factores del huésped, y reguladores de genes de virulencia, que modulan la producción y patogenicidad de la toxina (Soto-Rodriguez et al., 2022 a).

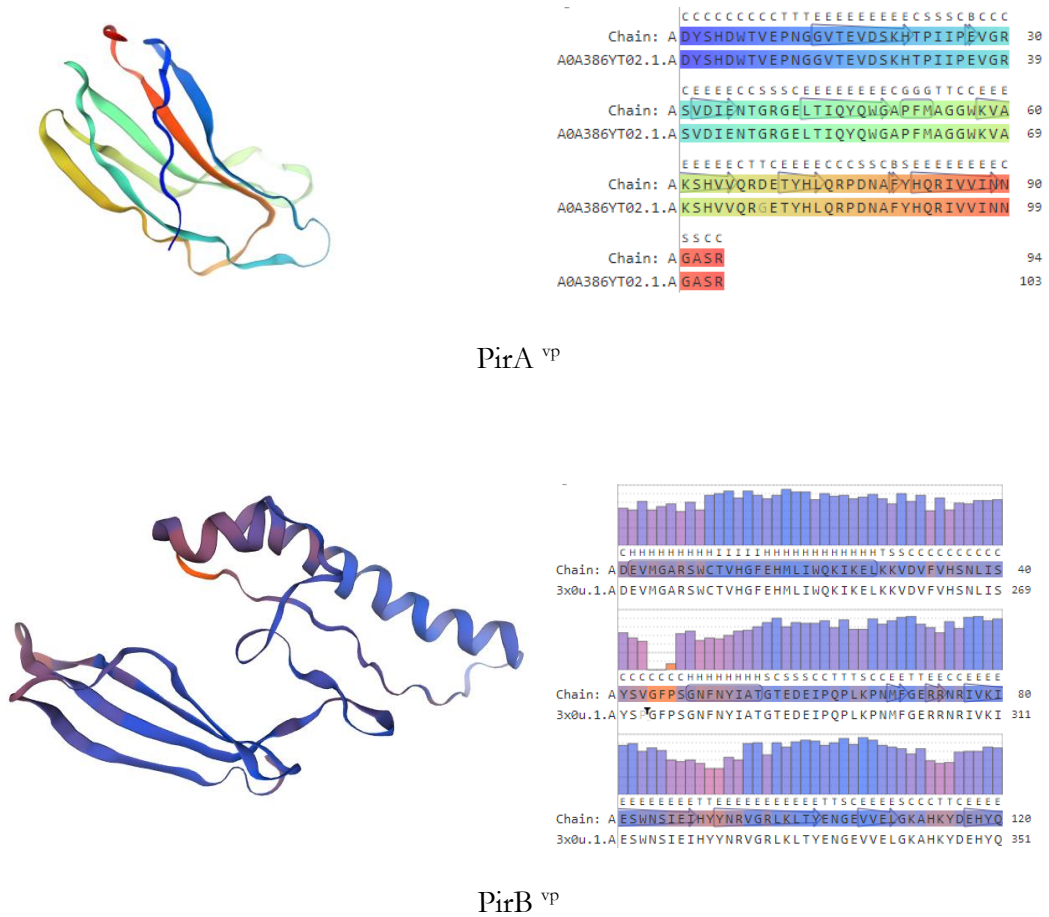


Gráfico 3. Estructura terciara de la toxina binaria PirAB en *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en camarones, elaborado en <https://swissmodel.expasy.org/>.

La interacción entre *V. parahaemolyticus* y el huésped inicia con la comunicación celular mediante la detección de QS, permitiendo a la bacteria coordinar la expresión de genes de virulencia y regular la patogenicidad en respuesta a señales ambientales y abundancia

bacteriana (Ashrafudoulla et al., 2021; Paopradit et al., 2021; Pazhani et al., 2021; Billaud et al., 2022; Wang et al., 2022).

En ese momento, la bacteria emplea varias estrategias para evadir las defensas inmunes del huésped y establecer la infección (Müller et al., 2023; Muthukrishnan et al., 2022; Paopradit et al., 2021), como la producción de exopolisacáridos (EPS) (Han et al., 2022), la formación de biopelículas (Wang et al., 2022; Faleye et al., 2023; Song et al., 2024), la alteración de los antígenos de superficie, y la modulación de las respuestas inmunes del huésped (Ahmed et al., 2021). La generación de EPS es un factor de virulencia que desempeña un papel crucial en las interacciones huésped-patógeno (Jiang et al., 2021; Han et al., 2022; Li et al., 2024). Los EPS sirven como componentes estructurales de la matriz de la biopelícula, proporcionando adherencia, estabilidad y cohesión a los agregados bacterianos, promoviendo la colonización y la infección (Jiang et al., 2021; Wu et al., 2022; Li et al., 2024). La biosíntesis de EPS en *V. parahaemolyticus* está regulada por determinantes genéticos que codifican enzimas involucradas en la síntesis y exportación de polisacáridos (Xue, et al., 2023; Li et al., 2024), así como por señales ambientales, disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH (Li et al., 2020; Leighton et al., 2023).

Tras la producción y excreción de EPS se inicia la formación de biopelículas. Las biopelículas consisten en comunidades microbianas complejas encerradas dentro de una matriz extracelular autoproducida que comprende exopolisacáridos, proteínas y ADN (Li et al., 2020; Ruhel & Kataria, 2021; Wang et al., 2022). Esto permite la formación de agregados bacterianos para iniciar adhesión a las células epiteliales del huésped, mediada por estructuras superficiales de la bacteria (Soutourina & Bertin, 2003; Hernández-

Cabanyero et al., 2023), así como la evasión de la respuesta inmune y su persistencia en ambientes hostiles.

Tras la adherencia, se despliega sistemas de secreción para administrar factores de virulencia, toxinas y moléculas efectoras en las células, modulando las vías de señalización y las respuestas inmunitarias de la célula huésped (Rosilan et al., 2024). De esta forma *V. parahaemolyticus* coloniza masivamente el tracto intestinal del camarón para protegerse del estrés ambiental, los agentes antimicrobianos y las defensas inmunitarias del huésped (Qian et al., 2020; Li et al., 2020; Faleye et al., 2023).

Finalmente, el mecanismo de infección conlleva a la actividad de motilidad de enjambre que aporta a la capacidad de la bacteria para colonizar y propagarse en superficies sólidas o semisólidas (M. Li et al., 2022; Wang et al., 2022; Pozo et al., 2024). La motilidad en enjambre permite que las células de *V. parahaemolyticus* migren rápidamente de forma multicelular coordinada, lo que facilita la extensión de la colonización del huésped y la persistencia ambiental (Rahul & Varsha, 2020; Zhang et al., 2020; Zhang et al., 2021; Liu et al., 2022). La regulación de la motilidad de los enjambres implica redes genéticas complejas que incluyen, la detección de quórum, la biosíntesis flagelar y las vías de quimiotaxis (Rahul & Varsha, 2020), controladas por la expresión de genes asociados a los enjambres y la coordinación del comportamiento de motilidad (Pozo et al., 2024; Rahul & Varsha, 2020). Además, la bacteria genera flagelos que optimizan su capacidad de migración, lo que permite que cause infecciones sistémicas (Yang et al., 2022).

Dado que las postlarvas de camarón en condiciones de cultivo y de infección con *V. parahaemolyticus* se ven afectadas por una gran variedad de factores de virulencia (Wang et al., 2022; Yang et al., 2022; Liu et al., 2023), es importante profundizar en la comprensión

de los factores de virulencia y los mecanismos moleculares para el desarrollo de estrategias de control efectivas que apuntalen la salud en los cultivos larvarios de camarón. Particularmente, el descubrimiento de moléculas capaces de interferir con el QS constituye una estrategia de biocontrol prometedora para tratar infecciones bacterianas.

1.6 ROL DE MICRO Y MACROALGAS

Las micro y macroalgas son reconocidas por su alta biodiversidad y por ser componentes esenciales de la red alimentaria acuática ya que son una fuente rica de nutrientes esenciales, que incluyen proteínas, carbohidratos y lípidos (Sánchez-Muros et al., 2020; Veluchamy & Palaniswamy, 2020), así como vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (Diaz et al., 2023). Los nutrientes de las microalgas están presentes en formas fácilmente digeribles para las postlarvas *P. vannamei*, lo que facilita su absorción y utilización eficiente (Huang et al., 2022; Arsad et al., 2023). Los compuestos bioactivos y componentes funcionales que contienen las microalgas son críticos para los procesos fisiológicos y metabólicos de las postlarvas *P. vannamei* (AftabUddin et al., 2021b; Abbas et al., 2023). Por ejemplo, las microalgas del género *Spirulina* y *Chlorella* son fuentes ricas en proteínas de alta calidad, aminoácidos esenciales, vitaminas y antioxidantes, que además de promover el crecimiento (Jaski et al., 2021; Zidan et al., 2021; Eissa et al., 2023; Yuan et al., 2023), favorecen la respuesta inmune de las postlarvas de camarón. De igual manera las macroalgas de los géneros *Ulva* y *Gracilaria*, proporcionan carbohidratos, fibras dietéticas, vitaminas y minerales esenciales para los procesos metabólicos (Morais et al., 2020; Klongklaew et al., 2021; Henry-

Silva et al., 2023; Thi-Ngoc et al., 2023), la producción de energía y la salud digestiva (Serrano & Tumbokon, 2022) de las postlarvas de camarón.

Las micro y macroalgas son fuentes abundantes de lípidos y ácidos grasos esenciales omega-3 como el EPA (ácido eicosapentaenoico) y el DHA (ácido docosahexaenoico), y omega-6, importantes para la respuesta inmune de *P. vannamei* (Ansari et al., 2021; Mai et al., 2021). Así, microalgas de los géneros *Nannochloropsis* e *Isochrysis* exhiben un alto contenido de ácidos grasos esenciales (Ahmad et al., 2022; Ma & Hu, 2023), proporcionando valiosas fuentes dietéticas de EPA y DHA. Por su lado, las macroalgas contienen lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Akbari et al., 2021; Ahmed et al., 2023; Ersoy-Kormaz, 2023) que contribuyen al metabolismo de los lípidos (Akbari et al., 2023), al almacenamiento de energía y al crecimiento general del camarón (Akbari et al., 2024). Por otro lado, especies de microalgas de los géneros *Dunaliella* y *Haematococcus* son conocidas por su alto contenido de carotenoides (Wu et al., 2020; Grujić et al., 2022), incluidos β -caroteno y astaxantina (Casella et al., 2020; Y, Li et al., 2020; Grujić et al., 2022) que contribuyen a la protección antioxidante y la mejora inmune en las postlarvas de camarón (Arsad et al., 2023). Mientras que polisacáridos, como la carragenina y el alginato, poseen propiedades prebióticas que promueven el crecimiento de una microbiota intestinal beneficiosa, y mejoran la salud digestiva del animal (Salehpour et al., 2021; Shannon et al., 2021; Tran et al., 2022).

1.7 COMPUESTOS BIOACTIVOS EN MICRO Y MACROALGAS

Dentro de los vastos ecosistemas de ambientes acuáticos, las micro y macroalgas han surgido como fuentes prometedoras de compuestos bioactivos con propiedades

terapéuticas. Las macroalgas poseen una notable complejidad estructural y diversidad metabólica de compuestos biológicamente activos (Manam & Sumathi, 2024; Nelson et al., 2024) que exhiben una amplia gama de propiedades terapéuticas, y que incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas y antivirulencia (Al-hashdy et al., 2022; Nagahawatta et al., 2023; Manam & Sumathi, 2024). Por ejemplo, los polisacáridos como los carragenanos y los ulvanos, extraídos de macroalgas rojas y verdes, respectivamente, tienen propiedades inmunomoduladoras al interactuar con las células inmunes, modulando la producción de citocinas, por lo que presentan un gran potencial para aplicaciones biomédicas (Cindana Mo'o et al., 2020; Hentati et al., 2020; Otero et al., 2023; Xie et al., 2023). De manera similar, los compuestos polifenólicos que se encuentran en las macroalgas pardas ejercen efectos positivos al inducir regulación o apoptosis celular (Begum et al., 2021; Lomartire & Gonçalves, 2023; Pereira & Cotas, 2023). Las microalgas también contienen compuestos bioactivos tales como, ácidos grasos, carotenoides, vitaminas y ficobiliproteínas, con bioactividades de tipo antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria, entre otras (Richmond & Hu, 2013).

La identificación y caracterización de compuestos bioactivos derivados de micro y macroalgas ha surgido como una vía prometedora en la investigación acuícola, particularmente en el contexto de mejorar la salud y la producción de camarones peneidos por sus propiedades antibacterianas, antioxidantes e inmunoestimulantes (Deng & Chow, 2010; Kanjana et al., 2011; Chen et al., 2014; Molina-Cardenas et al., 2014; Thanigaiavel et al., 2016). Extractos etanólicos crudos de la macroalga roja *Gracilaria fischeri* presentan propiedades antibacterianas contra *V. harveyi* en postlarvas PL15 y juveniles de camarón *Penaeus monodon* (Kanjana et al., 2011). Alginatos (polisacáridos) extraídos de *Sargassum*

siliquosum incrementan la inmunidad innata y la expresión de genes relacionados con el sistema inmune en juveniles *P. vannamei* (Yudiati et al., 2016). En el mismo sentido, derivados de alginato extraídos de la macroalga café *Sargassum wightii* favorecen una mejor respuesta inmune (conteos de hemocitos totales, actividad profenoloxidasa, generación de anión superóxido, actividad superóxido dismutasa y actividad fagocítica) en camarones juveniles (PL30) de *P. monodon* (Kadharsha Kudus et al., 2017). En tanto que, extractos de proteínas (lectinas y ficobiliproteínas) de *G. fischeri* muestran capacidad antibacteriana contra una cepa de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, y disminuyen la virulencia en postlarvas (PL5) de *P. vannamei* (Boonsri et al., 2017). Otro de los compuestos presentes en las macroalgas con interesantes características es el compuesto fenólico floroglucinol, que protege a larvas de *Artemia franciscana* y *M. rosenbergii* de infecciones provocadas por una cepa de *V. parahaemolyticus* positiva a AHPND (Kumar et al., 2018).

Las microalgas producen compuestos antimicrobianos como alcaloides, ácidos grasos, indoles, macrólidos, péptidos, fenoles, pigmentos y terpenos (Androutsopoulou & Mackridis et al., 2023; Rojas et al., 2020) para defenderse de microorganismos del medio circundante (Little et al., 2021). Las microalgas también producen proteínas con capacidad antibacteriana que al unirse con las membranas bacterianas inhiben los procesos celulares bacterianos (Shannon & Abu-Ghannam, 2016). Extractos crudos metanólicos y hexanólicos de algunas especies de microalgas marinas usadas en acuicultura como *Tetraselmis suecica*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis maculata*, entre otras, poseen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Kellam & Walker, 1989). Además, los extractos de lactonas de *Chlorella saccharophila*, *Nannochloris atomus* y *N. oculata* pueden interferir en la virulencia de *V. harveyi* (Natrah et al., 2011).

Un compuesto prometedor es el ácido indol-3-acético (IAA), molécula aromática heterocíclica categorizada bajo las fitohormonas auxinas, y producida por bacterias, plantas terrestres, macroalgas y microalgas (Zhao, 2019; Yalçın et al., 2020; Salih et al., 2023) (Gráfico 4). Los derivados sintéticos del IAA han llamado la atención por las potenciales propiedades terapéuticas y la capacidad para modular diversos procesos fisiológicos (Krell et al., 2023). El IAA y sus derivados presentan efectos antioxidantes que ayudan a neutralizar las especies reactivas de oxígeno (Siglas en inglés ROS) y proteger las células del daño oxidativo causado por factores estresantes ambientales (Ji et al., 2020).

Los compuestos de IAA tienen un gran potencial para tratar *Vibrio* patógenos acuícolas (Zhang et al., 2021), ya que actúan como señales extracelulares para la regulación de la virulencia en bacterias (Wang et al., 2001; Mueller et al., 2009). En este sentido, IAA reduce la actividad de los factores de virulencia de *V. campbellii*, un patógeno de crustáceos (Yang et al., 2017) y *V. splendidus*, patógeno de los pepinos de mar *Apostichopus japonicus* (Zhang et al., 2017).

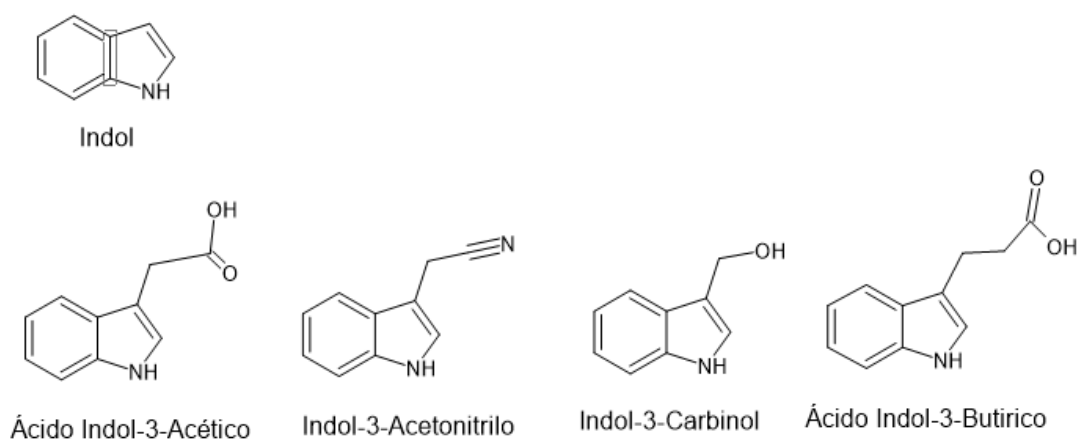


Gráfico 4. Moléculas de indol acético, ácido indol-3-acético (IAA), derivados del IAA.

Sin embargo, aún quedan varios desafíos por abordar en la exploración de compuestos bioactivos de micro y macroalgas, particularmente para el control de la AHPND. Considerando la versatilidad de los recursos metabólicos de las micro y macroalgas marinas se estudió su potencial terapéutico en larvas de camarón *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND. Específicamente, dada la evidencia de que las macroalgas contienen indoles, los cuales reducen la actividad de factores de virulencia de patógenos acuícolas, se evaluó el efecto de los extractos de macroalgas ricos en indol (IAA) sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND en larvas *P. vannamei*. Además, considerando que las micro y macroalgas contienen una variedad de otros compuestos bioactivos, principalmente con características antimicrobianas e inmunoestimulantes, se evaluaron estas bioactividades utilizando extractos totales (crudos) de micro y macroalgas en larvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de la AHPND.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE LA VIRULENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA AHPND EN LARVAS *Penaus vannamei*

Se colectaron muestras de las dos especies de macroalgas más abundantes en la playa costera de Ballenita (Santa Elena, Ecuador, Gráfico 5). La identificación taxonómica inicial se realizó mediante análisis morfológico, confirmando con secuenciación Sanger del gen 23S rRNA. Se extrajeron las auxinas (totales) de las muestras de macroalgas. Se realizó un cribado inicial para determinar la presencia de IAA y comprobar que los extractos de auxinas de las macroalgas eran ricos en IAA mediante la cuantificación del compuesto con el ensayo colorimétrico de Salkowski, confirmando su presencia mediante análisis de cromatografía, utilizando un IAA sintético como referencia. Se prepararon cuatro concentraciones de IAA sintético y de extractos ricos en IAA de *P. gymnospora* y *S. natans* para posteriores pruebas *in vitro* e *in vivo*. Se utilizó la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 causante de la AHPND en camarones *P. vannamei*. Se estudió el crecimiento, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelículas, la motilidad de enjambre, y la acumulación relativa de los transcritos de los genes de virulencia de la bacteria patógena tratada con las tres fuentes de IAA. Se evaluó la toxicidad de las tres fuentes de IAA en hemocitos y postlarvas *P. vannamei*. Finalmente, se realizó una prueba de desafío con postlarvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* tratada con las concentraciones más bajas de IAA, evaluando la supervivencia y confirmando la infección mediante PCR e histopatología.

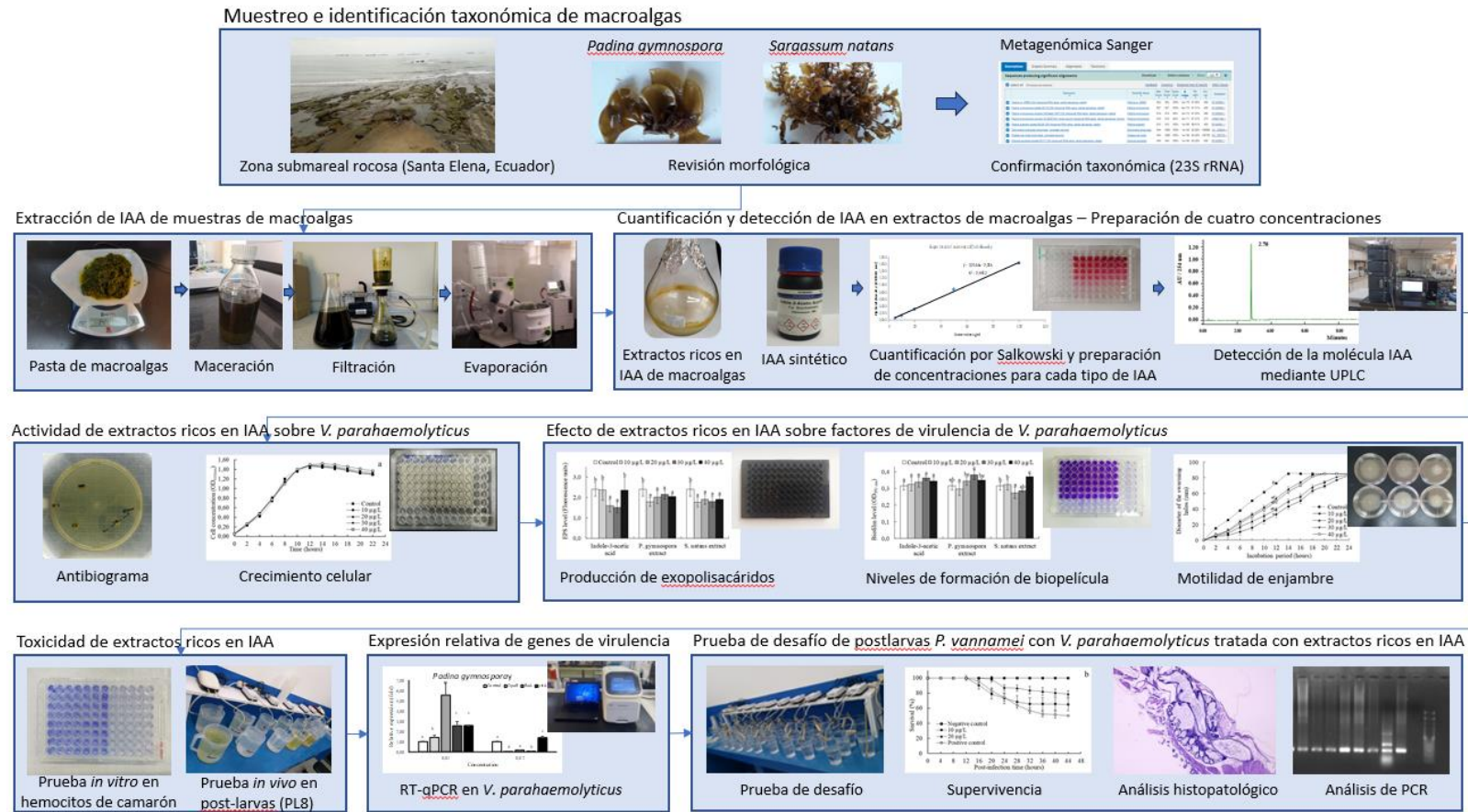


Gráfico 5. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de extractos ricos en IAA de macroalgas sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en larvas *P. vannamei*.

2.1.1 MUESTREO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MACROALGAS

Se colectaron muestras de dos especies de macroalgas (*Padina gymnospora* y *Sargassum natans*) en la zona submareal rocosa de Ballenita (2° 12' 23.41" S - 80° 52' 42.55" W, Santa Elena, Ecuador). Estas fueron las especies de macroalgas más abundantes encontradas durante el muestreo. Las macroalgas fueron lavadas con agua de mar estéril y solución de etanol (75%). El exceso de agua de las macroalgas fue eliminado, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Las muestras de macroalgas fueron revisadas morfológicamente para la identificación taxonómica inicial, y posterior confirmación con secuenciación Sanger (23S rRNA). Para la identificación taxonómica molecular se extrajo el ADN genómico según el protocolo descrito por Ferdous et al. (2012) con ligeras modificaciones. Brevemente, de cada muestra de macroalgas se molieron 0.5 g y se agregaron a 400 µL de tampón de extracción (200 mM Tris.HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 200 mM NaCl y 0.5% SDS), 400 µL de solución 2X CTAB (100 mM Tris.HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% CTAB y 1% PVP) y 400 µL de cloroformo/alcohol isoamílico/fenol (24:1:5). La mezcla se centrifugó a 8400 g durante 15 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se duplicó el volumen de isopropanol, se homogeneizó, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 8400 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el sedimento se lavó con etanol al 70%, y se secó al aire durante 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 25 µL de agua ultrapura, se añadió 1 µL de solución de RNasa A y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso. La región 23S rRNA se amplificó utilizando los cebadores universales (Sherwood & Presting, 2007) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 45 s, y extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados se comprobaron en un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por IDGen (Quito, Ecuador). Las secuencias de ADN se curaron y ensamblaron (secuencias consenso) utilizando el software Geneious Prime. Se compararon las secuencias consenso obtenidas para las dos muestras de

macroalgas con la base de datos pública GenBank utilizando la herramienta Standard Nucleotide BLAST (Blastn).

2.1.2 EXTRACCIÓN DE AUXINAS TOTALES DE LAS MUESTRAS DE MACROALGAS

Se extrajeron las auxinas totales de las muestras de macroalgas siguiendo los procedimientos de Li et al. (2016) con modificaciones. Brevemente, las macroalgas congeladas fueron trituradas con un triturador de tejidos (Krupps). Se tomaron 10 g de macroalga triturada y se llevaron a una botella con 10 mL de metanol/agua/ácido fórmico (15:4:1) conteniendo 0.1 % de hidroxitolueno butilado (BHT), se colocaron en un ultrasonicador (Baño de limpieza, Branson Sonics™ M Series, Fisher Scientific) durante 20 min, y se maceraron a -20 °C durante 16 horas. Las muestras fueron filtradas (papel de filtro cualitativo Whatman No. 3 - 0,45 µM). Las muestras fueron luego concentradas a presión reducida, primero en un evaporador rotatorio a 30 °C (Rotavapor® R-300 Buchi RII), y luego en un concentrador SpeedVac (Savant SPD121P Thermo Scientific). Las muestras fueron disueltas en una solución de agua/acetonitrilo (3:1), y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior en los ensayos, y en metanol para la confirmación de la presencia de la molécula de IAA por cromatografía líquida de ultra rendimiento.

2.1.3 CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE IAA EN EXTRACTOS DE AUXINAS DE MACROALGAS

Se realizó un cribado inicial de los extractos de auxinas de las macroalgas para determinar la presencia y comprobar que los extractos de auxinas de las macroalgas eran ricos en IAA, mediante la cuantificación del compuesto con el ensayo colorimétrico de Salkowski que se basa en la oxidación de ácido perclórico y cloruro férrico en presencia de IAA (Chrastil, 1976; Glickmann & Dessaux, 1995). Las concentraciones de IAA de los extractos de macroalgas fueron determinadas mediante una curva estándar (seis réplicas, absorbancia a

530 nm, $R^2 = 0.975$) usando un IAA sintético (Loba Chemie CAS 87-51-4) con un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX).

Posteriormente, la presencia de la molécula IAA fue confirmada en los dos extractos ricos en IAA de macroalgas mediante análisis de cromatografía líquida de ultra rendimiento (siglas en inglés UPLC) (Water Acquity H UPLC® CLASS – PDA el detector). Un total de 10 µL de cada extracto de macroalga fue resuspendido en metanol, filtrado e inyectado en una columna UPLC (UPLC CSH Phenyl-Hexyl, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm). El IAA sintético fue utilizado como control de referencia y procesado siguiendo el protocolo descrito para los dos extractos de macroalgas. Finalmente, se obtuvieron los cromatogramas del estándar de IAA y de los extractos ricos en IAA.

En base a la curva estándar se prepararon cuatro concentraciones (10, 20, 30 y 40 µg/L) para cada una de las fuentes de IAA (IAA sintético y extractos ricos en IAA de *P. gymnospora* y *S. natans*) utilizando caldo LB Broth Lennox (Difco, Le Pont de Claix, Francia). Estas cuatro concentraciones fueron utilizadas en las posteriores pruebas *in vitro* (antibiogramas, crecimiento, producción de exopolisacáridos, formación de biopelículas, motilidad de enjambre y acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia de la bacteria patógena tratada con las tres fuentes de IAA, así como para la toxicidad sobre hemocitos de camarón *P. vannamei*) e *in vivo* (toxicidad y prueba de desafío) que se realizaron para evaluar su efecto sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en postlarvas de camarón *P. vannamei*.

2.1.4 ACTIVACIÓN DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

La bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2, causante AHPND en camarones *P. vannamei* (Restrepo et al., 2018), fue activada en agar tríptico de soya - TSA (Difco) suplementado al 2% con Bacto agar (Difco) y 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH), e incubada durante 24 h a 30 °C. Posteriormente, una colonia se transfirió a 100 mL de caldo LB suplementado al 2% con NaCl y se incubó con movimiento constante durante 8 h a 30 °C. La suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 1.00 ± 0.01 unidades a 600

nm ($OD_{600\text{ nm}}$), equivalente a 10^9 UFC/mL, utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX).

2.1.5 EFECTO DE EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

El efecto de las tres fuentes de IAA sobre el crecimiento de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 fue evaluado mediante dos pruebas *in vitro*: antibiogramas y curvas de crecimiento. Los antibiogramas se realizaron por el método disco-difusión en agar, de acuerdo con Ruangpan & Tendencia (2004). Se impregnaron discos estériles (SD, diámetro 6 mm, Biogram) con 20 μ L de cada una de las cuatro concentraciones (10, 20, 30 y 40 μ g/L) de las tres fuentes de IAA. Como control positivo se utilizó un disco estéril impregnado con florfenicol 99% a 70 ppm. Como control negativo se utilizó un disco estéril impregnado con el disolvente de alcohol etílico absoluto. La suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.23 ± 0.01 unidades a $OD_{600\text{ nm}}$, equivalente a 10^8 UFC/mL, utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX) y diluyendo a 10^6 UFC/mL. La suspensión bacteriana (100 μ L) fue inoculada en Agar Mueller Hinton (MH), y extendida sobre la superficie del agar con hisopos de algodón estéril. Los discos impregnados con extractos y los discos de control positivo y negativo se ubicaron sobre la superficie del agar con pinzas estériles. Las placas de MH se incubaron durante 24 y 48 h a 30 °C. Cada tratamiento y control tuvo seis réplicas. La inhibición bacteriana se determinó mediante la diferencia entre los diámetros de la zona de inhibición y el disco (6 mm).

Para la elaboración de las curvas de crecimiento de la cepa patógena tratada con las tres fuentes de IAA, un total de 180 μ L de cada concentración (10, 20, 30 y 40 μ g/L) fue depositado en microplacas de 96 pocillos (Nunclon™ Delta Surface Thermo Scientific), junto con 20 μ L de la suspensión bacteriana, hasta alcanzar una dilución final de 0.1 $OD_{600\text{ nm}}$, y se incubó durante 24 h a 30 °C. Luego se evaluó el crecimiento bacteriano cada 2 horas utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX).

Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ningún tipo de IAA) y un control negativo (solo medio de cultivo estéril). Cada tratamiento (12 tratamientos = 3 fuentes de IAA x 4 concentraciones) y control tuvieron 6 réplicas.

2.1.6 EFECTO LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

2.1.6.1 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

La producción EPS de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con las tres fuentes de IAA fue cuantificada mediante el método de tinción con blanco de calcoflúor (Chalhoub et al., 2017; Yang et al., 2017), con modificaciones. Para cada una de las tres fuentes de IAA, un total de 270 μL de cada una de las cuatro concentraciones fue cultivado en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) con 20 μL de la suspensión bacteriana, hasta alcanzar una dilución final de 0.1 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$, y se incubó durante 24 h a 30 °C. Luego se agregó 0.75 μL de tinte blanco de calcoflúor (Sigma – Aldrich Chemie) y 150 μL de tampón PBS (137 mM NaCl, 10 mM phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.0), y se incubó durante 60 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 20800 g durante 10 minutos (microcentrífuga refrigerada de alta velocidad DLAB D3024R). Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 μL de PBS (pH 7.4). La suspensión se transfirió a una placa negra de 96 pocillos (Nuncclon™ Delta surface Thermo Scientific/black) y se midió la fluorescencia con un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX, λ_{exc} 405 nm, λ_{em} 500 nm). Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ninguna fuente de IAA) y un control negativo (solo medio estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.1.6.2 NIVELES DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA

Los niveles de formación de biopelículas de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con las tres fuentes de IAA fueron cuantificados mediante tinción con cristal violeta según el procedimiento descrito por Yang et al. (2017), con modificaciones menores. Para cada una de las tres fuentes de IAA, un total de 180 μL de cada una de las cuatro concentraciones fue cultivado en microplacas de 96 pocillos (Nunclon™ Delta Surface Thermo Scientific) con 20 μL de la suspensión bacteriana, hasta alcanzar una dilución final de 0.1 OD_{600 nm}. Las microplacas se incubaron por 24 h a 30 °C. Las bacterias que no fueron adheridas a las paredes de las placas fueron eliminadas con tres lavados sucesivos de PBS (137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Las bacterias adheridas a las paredes de la placa se fijaron con 200 μL de metanol (grado HPLC, Merck) durante 20 minutos. Los cultivos se secaron y se tiñeron con 200 μL de cristal violeta (Kristallviolett C.I. 2555, Merck) al 0.4% durante 15 minutos. El exceso de cristal violeta fue removido con PBS y se secó al aire. Las bacterias teñidas fueron resuspendidas en 200 μL de etanol (95%). La absorbancia se midió a OD_{570 nm} utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX). Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ninguna fuente de IAA) y un control negativo (solo medio de cultivo estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.1.6.3 MOTILIDAD DE ENJAMBRE

La motilidad de enjambre de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con cada una de las cuatro concentraciones para las tres fuentes de IAA fue cuantificada siguiendo el protocolo descrito en Pozo et al. (2024). La activación de la bacteria patógena se realizó como fue descrita anteriormente. Se inoculó una suspensión bacteriana (3 μL) en el centro de placas Petri conteniendo caldo LB Lennox (Difco, Le Pont de Claix, Francia) al 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), Bacto agar al 0,4% (Difco, Le Pont de Claix, Francia), y la respectiva concentración de las tres fuentes de IAA según el tratamiento

correspondiente. Después de la inoculación, las placas Petri se mantuvieron en una cámara de flujo laminar vertical (Air Tech Biological Security Camera, BGM-1002 W) durante una hora para permitir que las células bacterianas del inóculo se adhieran a la superficie. Luego las cajas Petri se invirtieron y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Los diámetros de los halos del enjambre se midieron cada 2 h durante el período de incubación de 24 horas. Se incluyó un control positivo (placa Petri sin ninguna fuente de IAA) y un control negativo (placa Petri solo con medio de cultivo estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.1.6.4 ACUMULACIÓN RELATIVA DE TRANSCRITOS DE GENES DE VIRULENCIA

La acumulación relativa de los transcritos de los genes de virulencia de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con las dos concentraciones más bajas (10 y 20 µg/L) de cada una de las tres fuentes de IAA (seis tratamientos = 3 fuentes de IAA x 2 concentraciones) fue evaluada mediante análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (siglas en inglés RT-qPCR). Para la activación de la cepa patógena, una colonia fue transferida a 100 mL de caldo LB Lennox (Difco, Le Pont de Claix, Francia) suplementada con 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), y se incubó sin agitación durante 8 h a 30 °C. La suspensión bacteriana se ajustó en tubos de 3 mL, a una densidad óptica de 1.00 ± 0.01 unidades a OD_{600 nm} (equivalente a 10⁹ UFC/mL) utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas. Cada fuente de IAA, a concentraciones finales de 10 y 20 mg/L según el tratamiento correspondiente, fue añadido a la suspensión bacteriana (tres réplicas biológicas), y se incubó sin agitación durante 24 h a 30 °C. Se incluyó un control positivo (suspensión bacteriana sin recibir ninguna fuente de IAA, tres réplicas biológicas). Cada muestra se procesó por duplicado (réplicas técnicas). Posteriormente, se tomó 1 mL de cada suspensión bacteriana para realizar la extracción de ARN y el análisis de acumulación de los transcritos de los siguientes genes de virulencia de la cepa patógena: *OpaR* (máster regulador de *quorum sensing* en *V. parahaemolyticus* - control de opacidad), *flaA* (flagelo polar) y los genes codificantes para las toxinas *PirA* y *PirB* (Tabla I). Los controles internos housekeeping

fueron los genes: subunidad alfa de la ARN polimerasa (*rpoA*) y factor de terminación de la transcripción (*Rho*) que fueron previamente validados y referenciados indicados en literatura con comprobación de la estabilidad de sus transcritos (Tabla I). El ARN fue extraído en 200 μ L de reactivo TRI según el protocolo del fabricante (TRI Reagent® Sigma-Aldrich), y se convirtió en ADNc utilizando el kit RevertAid First Strand cADN (Thermo Scientific, EE. UU.) conteniendo 1 μ L de RevertAid Reverse Transcriptase (200 U μ L), 1 μ L de RiboLock RNase Inhibitor (20 U μ L), 1 μ L de cebadores (100 uM) (Tabla I), 2 μ L de mezcla de dNTP (10 mM), 6 μ L de agua libre de nucleasas y 4 μ L de tampón de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT) a 42 °C durante 1 h, seguido de 70 °C durante 5 minutos. La reacción de RT-PCR se realizó según las especificaciones del kit KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ para el termociclador LightCycler® Nano (Roche). Las condiciones de reacción de la PCR fueron el primer ciclo de 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos con desnaturalización de 30 s a 95 °C. La temperatura de alineamiento y el número de ciclos fueron diferentes para cada conjunto de cebadores (Tabla I). La extensión se realizó a 72 °C por 60 s, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Para cada una de las réplicas se colectaron los valores de Ct (número de ciclos) para los cuales la fluorescencia empezó a ser detectada.

Tabla I. Conjunto de cebadores utilizados para evaluar la acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus*.

Genes	Cebadores	Secuencias de los cebadores 5'-3'	Tm (°C)	Referencia
<i>OpaR</i>	opaR-F	TGTCTACCAACCGCACTAACC	58	(Zhang et al., 2016)
	opaR-R	GCTCTTTCAACTCGGCTTCAC		
<i>flaA</i>	flaA-F	CTGCGGGTCTTCAAATCTC	60	Yang & Defoirdt, 2015
	flaA-R	GTTAGTGGTCTCGTTCATIGC		
<i>PirA</i>	VpPirA-284F	TGACTATTCTCACGATTGGACTG	58	(Han, et al., 2015)
	VpPirA-284R	CACGACTAGCGCCATTGTTA		
<i>PirB</i>	VpPirB-392F	TGATGAAGTGATGGGTGCTC	60	(Han, et al., 2015)
	VpPirB-392R	TGTAAGCGCCGTTTAACTCA		
<i>rpoA</i>	Forward	CGTAGCTGAAGGCAAAGATGA	60	(Defoirdt et al., 2007)
	Reverse	AAGCTGGAACATAACCACGA		
<i>Rho</i>	Rho-F	CCAGCATCTCGTCACGTACA	60	El presente autor
	Rho-R	TTTGCATCCACACCACCTGT		

2.1.7 ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS EN *P. vannamei*

2.1.7.1 PRUEBA *IN VITRO* DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS EN HEMOCITOS DE *P. vannamei*

La toxicidad de cada una de las tres fuentes de IAA sobre hemocitos de *P. vannamei* fue evaluada mediante la prueba de viabilidad celular *in vitro* del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio – MTT (Domínguez-Borbor et al., 2018). Brevemente, un cultivo primario de hemocitos de camarón *P. vannamei* (□ 8 g) con anticoagulante citrato de sodio (50 µL) fue activado con solución de sales balanceadas sigma de Hank (50 µL) durante 75 minutos, y tratado durante 2 h con la respectiva concentración para las tres fuentes de IAA, según el tratamiento correspondiente. Luego se agregaron 10 µL de MTT (5 mg/mL, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) y se incubó durante 125 min a 25 °C en la oscuridad. El sobrenadante y los cristales de formazán fueron diluidos con isopropanol mezclado con ácido clorhídrico 0.04 N. La reacción colorimétrica fue leída en un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX) a OD_{620 nm}. Se utilizó un control positivo (cultivo de hemocitos no expuesto a ninguna fuente de IAA). Cada tratamiento y control positivo tuvieron 6 réplicas.

2.1.7.2 PRUEBA *IN VIVO* DE TOXICIDAD DE LA BACTERIA TRATADA CON LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS EN POSTLARVAS *P. vannamei*

En base a los resultados de las pruebas *in vitro*, las dos concentraciones más bajas (10 y 20 µg/L) de cada una de las tres fuentes de IAA fueron utilizadas para evaluar sus toxicidades mediante prueba *in vivo* en postlarvas de camarón *P. vannamei*. Las postlarvas de *P. vannamei*, en estadio PL8, fueron adquiridas en un laboratorio comercial de producción de larvas (Santa Elena, Ecuador), y se transportaron (15 min) a una sala experimental del Centro Nacional

de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM, Santa Elena, Ecuador). Un total de 1260 de estas postlarvas fueron distribuidas aleatoriamente en 42 recipientes plásticos (unidades experimentales) que contenían 300 mL de agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific America, SQ500C), a una densidad de 30 postlarvas por unidad experimental. Las postlarvas fueron aclimatadas durante 24 horas (30 ± 1 °C, 34 g/L de salinidad). Luego del periodo de aclimatación de 24 h se realizó un recambio de agua del 50%, y posteriormente se añadió la respectiva concentración de las tres fuentes de IAA, según el tratamiento correspondiente, hasta alcanzar una concentración final de 10 y 20 µg/L en las unidades experimentales (seis tratamientos = 3 fuentes de IAA x 2 concentraciones). Se incluyó un control (unidades experimentales sin inoculación de ninguna fuente de IAA). Todas las unidades experimentales recibieron aireación continua durante todo el experimento. Las postlarvas fueron alimentadas con Epibal-300[®] (Epicore BioNetworks Inc) cada dos horas durante todo el experimento. Luego de 24 horas posteriores a la administración de las tres fuentes de IAA se contó el número de postlarvas supervivientes en cada unidad experimental. Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.1.8 PRUEBA DE DESAFÍO DE POSTLARVAS *P. vannamei* INFECTADAS CON LA BACTERIA PATÓGENA *V. parahaemolyticus* TRATADA CON EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS

2.1.8.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

La bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 fue activada en TSA (Difco, Le Pont de Claix, Francia), suplementada con Bacto agar al 2% (Difco, Le Pont de Claix, Francia) y 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), e incubada durante 24 h a 30 °C. Una colonia fue transferida a 10 mL de Bacto peptone (Difco, Le Pont de Claix, Francia), suplementada con 2% de NaCl (VWR Chemicals BDH, Estados Unidos), e incubada a 120 rpm durante 8 h a 30 °C. Se utilizaron las dos concentraciones más bajas de 10 y 20 µg/L de cada una de las tres fuentes de IAA para tratar a la bacteria patógena (seis tratamientos =

3 fuentes de IAA x 2 concentraciones). El volumen total de la suspensión bacteriana fue transferido a 1 L de Bacto peptone (Difco, Le Pont de Claix, Francia) conteniendo el tratamiento correspondiente, y se incubó a 120 rpm durante aproximadamente 4 h a 30 °C, a una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

2.1.8.2 PRUEBA DE DESAFÍO

Una vez descartada la toxicidad de las tres fuentes de IAA se realizó una prueba de desafío. Las postlarvas *P. vannamei* (PL8) fueron adquiridas en un laboratorio comercial de producción de larvas (Santa Elena, Ecuador) y transportadas (15 min) a una sala experimental del CENAIM. Un total de 0.2 g del stock inicial de las postlarvas fueron utilizadas para la detección por análisis de PCR de los genes codificantes para las toxinas PirAB utilizando los cebadores AP4 F1/R1 - AP4 F2/R2 (Dangtip et al., 2015). En tanto que, 20 postlarvas de ese stock inicial fueron preservadas en solución Davidson, y posteriormente examinadas mediante análisis histopatológico para evaluar su estado de salud. Un total de 1440 postlarvas fueron distribuidas aleatoriamente en 48 recipientes plásticos (unidades experimentales) conteniendo 300 mL de agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific America, SQ500C), a una densidad de 30 postlarvas por unidad experimental. Se evaluaron seis tratamientos de postlarvas infectadas con la bacteria tratada (3 fuentes de IAA x 2 concentraciones: 10 y 20 µg/L), un control positivo (postlarvas infectadas con bacteria no tratada) y un control negativo (postlarvas no infectadas). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas. Las postlarvas se aclimataron durante 24 horas (30 ± 1 °C, 34 g/L de salinidad). Luego del periodo de aclimatación de 24 h se realizó un recambio de agua del 50% y cada unidad experimental fue inoculada con la suspensión bacteriana hasta una concentración final en las unidades experimentales de 1×10^6 UFC/mL. Todas las unidades experimentales recibieron aireación continua durante todo el experimento. Las postlarvas fueron alimentadas con Epibal-300® (Epicore BioNetworks Inc) cada dos horas. Luego de 24 horas posteriores a la infección se realizó un recambio de agua al 50% de agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific

America, SQ500C). En cada unidad experimental se registró la supervivencia cada cuatro horas hasta las 44 h post infección. Para cada tratamiento y control se colectaron muestras de postlarvas sobrevivientes a la cosecha (PL11) para la detección de los genes *PirA* y *PirB* por análisis de PCR y análisis histopatológico.

2.1.9 ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias entre los doce tratamientos (3 fuentes de IAA x 4 concentraciones: 10, 20, 30 y 40 µg/L) y el control positivo de: crecimiento (6 h, 10 h, 12 h, 16 h, 18 h, 20 h y 22 h), así como la absorbancia registrada en la prueba *in vitro* de toxicidad, fueron evaluadas mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), o con la prueba no paramétrica de suma de rangos de Kruskal-Wallis (crecimiento de la bacteria patógena a 2 h, 4 h, 8 h y 14 h). Previo al ANOVA se evaluaron las asunciones de homogeneidad de varianza y normalidad entre tratamientos utilizando las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos después de que las pruebas de ANOVA resultaron significativas. En tanto que, se utilizó la prueba de comparación de rangos de Nemenyi para comparar el crecimiento bacteriano a las 14 h dado que el resultado de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis resultó significativa.

La producción de EPS se analizó por separado para cada fuente de IAA debido a que las muestras se distribuyeron en diferentes microplacas. Para cada fuente de IAA, las diferencias en la producción de EPS entre tratamientos (4 concentraciones: 10, 20, 30 y 40 µg/L) y el control positivo se analizaron mediante ANOVA de una vía luego que los supuestos paramétricos fueron alcanzados mediante verificación de las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk. Se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios entre tratamientos y control positivo. El análisis de datos de los niveles de formación de biopelículas se realizó de la misma manera que para la producción de EPS.

El análisis de datos de la motilidad de enjambre de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* se realizó según lo sugerido por Pozo et al. 2024, comparando las pendientes de la fase exponencial de las curvas de motilidad de la bacteria tratada con los doce tratamientos (3 fuentes de IAA x 4 concentraciones: 10, 20, 30 y 40 µg/L) y el control positivo. Con base en esta consideración, los puntos XY de las curvas a las 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h y 14 h (puntos XY correspondiente a la fase exponencial) se utilizaron para el análisis de datos. La prueba F de falta de ajuste a una regresión con réplicas (Kutner et al., 2005) fue utilizada para probar si una función de regresión lineal simple resultó un buen ajuste para cada tratamiento y control positivo. En todos los casos, se obtuvieron resultados no significativos con la prueba F, por lo que se realizó una regresión lineal simple para cada réplica de tratamientos y control positivo. Las pendientes de las regresiones lineales (transformadas a X^3) se compararon entre tratamientos y el control positivo mediante ANOVA de una vía, evaluando previamente las asunciones de homogeneidad de varianza y normalidad entre tratamientos con las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios entre tratamientos y control positivo. La supervivencia de las postlarvas en la prueba de toxicidad *in vivo* se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis por no cumplirse los supuestos paramétricos.

Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular la expresión relativa de los genes de virulencia (Livak & Schmittgen, 2001). Los valores de Ct (genes de virulencia) de los duplicados fueron promediados. En base a los valores de Ct obtenidos con los genes housekeeping más estables, se utilizó el gen *rpoA* como control interno por presentar mayor estabilidad que *Rbo*, promediando los valores de Ct de este control interno (duplicados y réplicas técnicas). Las diferencias (ΔCt) en Ct entre los genes de virulencia y housekeeping se calcularon para cada muestra como: Ct (gen de virulencia) - Ct (promedio housekeeping). Cada ΔCt se normalizó contra el ΔCt del control positivo para obtener $\Delta\Delta Ct$, el cual se calculó como: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (tratamiento) - ΔCt (control positivo). La expresión de cada gen de virulencia relativa al control positivo se obtuvo para cada muestra como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias en la expresión (relativa al gen housekeeping *rpoA*) entre los seis tratamientos (3 fuentes de IAA x 2 concentraciones: 10 y 20 µg/L) y el control positivo se evaluaron

para cada gen de virulencia mediante ANOVA de una vía. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para probar la normalidad y la prueba de Levene para probar la homogeneidad de la varianza entre tratamientos.

La supervivencia acumulada de las postlarvas de *P. vannamei* a las 44 h posteriores a la infección con la cepa patógena *V. parahaemolyticus* se analizó mediante ANOVA de una vía. Las probabilidades de supervivencia se analizaron mediante el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier, y las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank. Los efectos de los tratamientos se consideraron significativos a $p < 0.05$. Todos los valores se expresaron como media \pm error estándar de la media, excepto la expresión relativa de los genes de virulencia que fueron expresados como promedios \pm desviación estándar. Se utilizó el software R versión 4.3.0 para el análisis de datos (R Core TeamR, 2022).

2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INMUNOLÓGICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE MICRO Y MACROALGAS EN LARVAS INFECTADAS CON *V. parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA AHPND

Para este segundo estudio se escogieron las dos especies de macroalgas locales utilizadas en el primer estudio (*P. gymnospora* y *S. natans*), y dos especies de microalgas ampliamente utilizadas en acuicultura (*Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana*, Gráfico 6). Las microalgas escogidas fueron las que mostraron mayor bioactividad en un screening previo (motilidad de enjambre) realizado con 20 cepas de microalgas de la colección de microalgas del CENAIM. La identificación taxonómica de estas dos especies fue realizada previamente por CENAIM. Se obtuvieron extractos crudos etanólicos (totales), y se prepararon tres concentraciones de cada extracto. Se utilizó la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2. Se estudió el crecimiento bacteriano, producción de EPS, formación de biopelículas y motilidad de enjambre de la bacteria patógena tratada con los extractos crudos. Se evaluó la toxicidad de los extractos crudos en hemocitos y postlarvas *P. vannamei*. Se realizó una prueba de desafío con postlarvas tratadas con los extractos crudos, e infectadas con *V. parahaemolyticus*. Postlarvas supervivientes de los tratamientos fueron utilizadas para analizar la acumulación relativa de transcritos de genes de la respuesta inmune en los tratamientos de extractos crudos, comparados con el control positivo (postlarvas no tratadas, pero si infectadas). Finalmente, se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos presentes en los extractos crudos.

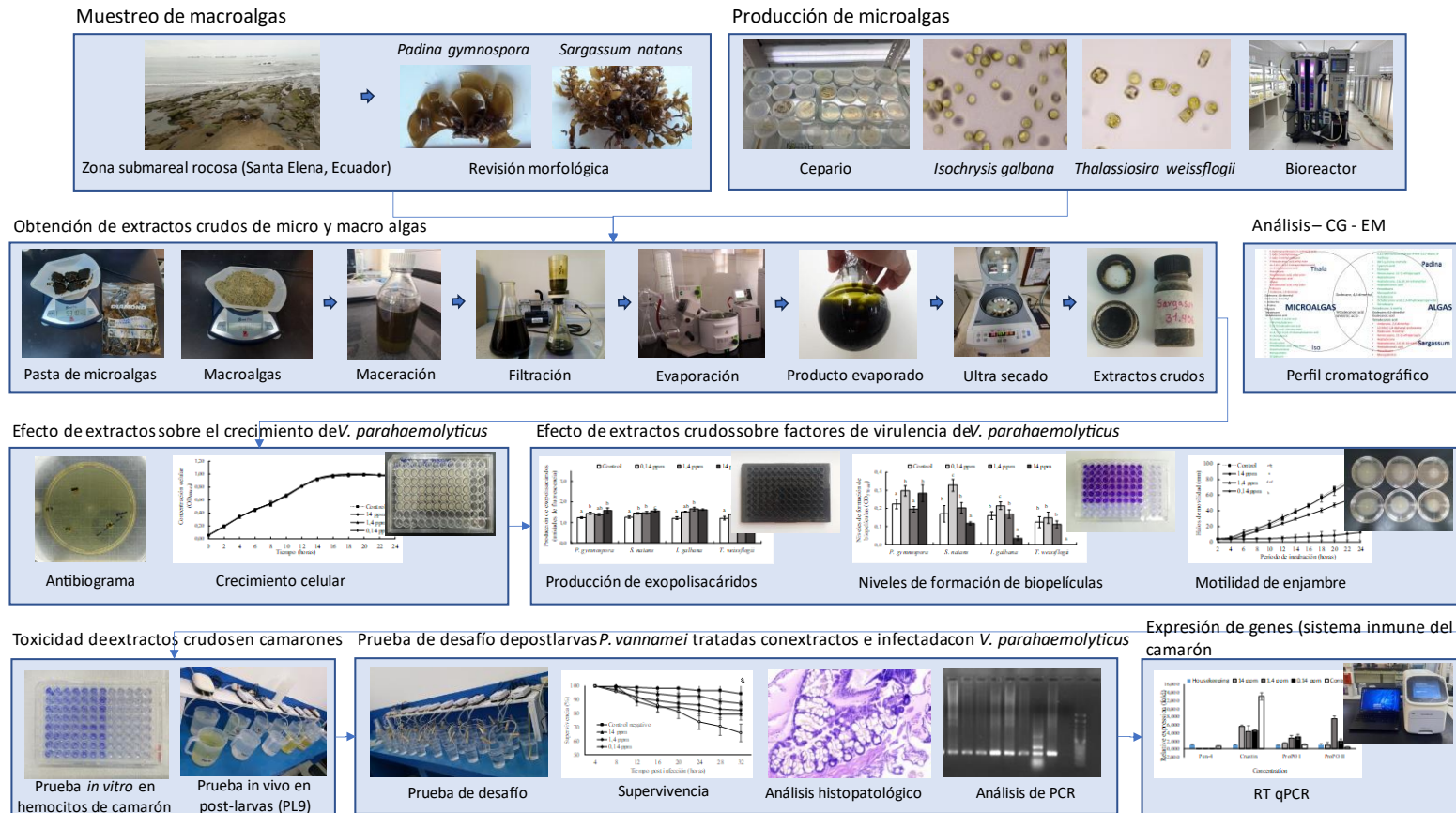


Gráfico 6. Diseño experimental utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de extractos crudos de micro y macroalgas en larvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND.

2.2.1. MUESTREO DE MACROALGAS

El muestreo de las dos especies de macroalgas fue realizado como es descrito en la sección 2.1.1. Adicionalmente, las macroalgas fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente durante 72 horas.

2.2.2. PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

Se realizó la producción de dos especies de microalgas (*T. weissflogii* e *I. galbana*) provenientes del cepario del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM, Santa Elena, Ecuador). La producción se realizó siguiendo el protocolo de Guillard (1975) adicionando el medio Guillard F/2 (Sigma-Aldrich) al cultivo de agua de mar. Los cultivos se realizaron a 22 °C utilizando un fotobiorreactor (Biorreactor Industrial Plankton Inc) de 1 m³ de capacidad. Las microalgas fueron cosechadas en la fase exponencial (60 días de producción) y cosechadas mediante centrifugación para la obtención de pastas de microalgas. La pasta obtenida para cada una de las dos especies fue inmediatamente preservada mediante congelación a -20 °C hasta su uso posterior.

2.2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS DE MUESTRAS DE MACROALGAS Y MICROALGAS

Los extractos crudos se obtuvieron siguiendo los procedimientos de Li et al., (2018). Brevemente, muestras de las cuatro especies de algas (*P. gymnospora*, *S. natans*, *T. weissflogii* e *I. galbana*) fueron pulverizadas con un triturador de tejidos (Krupps). Para cada alga se tomaron 20 g y se llevaron a una botella con 300 mL de etanol al 85% (disolvente polar), dejando macerar por 72 horas a temperatura ambiente (Li et al., 2018). A continuación, las muestras se filtraron (papel filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm Whatman), se evaporaron, primero en

un evaporador rotatorio a 30 °C (Rotavapor® R-300 Buchi RII), y luego en un concentrador SpeedVac (Savant SPD121P Thermo Scientific) a 30 °C. Se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior. Para cada uno de los cuatro extractos crudos de algas se prepararon tres concentraciones (0.14 ppm, 1.4 ppm y 14.0 ppm) en caldo LB Broth Lennox (Difco, Le Pont de Claix, Francia). Estas tres concentraciones fueron usadas en las posteriores pruebas *in vitro* (antibiograma, curvas de crecimiento, factores de virulencia, expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune de camarón y toxicidad con hemocitos de camarón) e *in vivo* (toxicidad y prueba de desafío con postlarvas *P. vannamei*) para evaluar sus actividades antimicrobianas, antivirulentas e inmunoestimulantes en postlarvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* causante de AHPND.

2.2.4 ACTIVACIÓN DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

La bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2, causante AHPND en camarones *P. vannamei* (Restrepo et al., 2018), fue activada tal como se describió en la sección 2.1.4.

2.2.5 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

El efecto de los cuatro extractos crudos sobre el crecimiento de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 fue evaluado mediante dos pruebas *in vitro*: antibiogramas y curvas de crecimiento. Los antibiogramas se realizaron por el método disco-difusión en agar, tal como se describe en la sección 2.1.5. Los discos estériles (SD) (diámetro 6 mm, Biogram) fueron impregnados con 20 µL de cada una de las tres concentraciones (0.14 ppm, 1.4 ppm y 14.0 ppm) de los cuatro extractos crudos.

Para la elaboración de las curvas de crecimiento de la cepa patógena tratada con los cuatro extractos crudos, un total de 180 µL de cada concentración (0.14 ppm, 1.4 ppm y 14.0 ppm) fueron depositados en microplacas de 96 pocillos (Nunclon™ Delta Surface Thermo

Scientific) junto con 20 μL de la suspensión bacteriana, hasta alcanzar una dilución final de 0.1 $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$, y se incubó durante 24 h a 30 °C. Luego se evaluó el crecimiento bacteriano cada 2 horas utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas (Thermo Scientific, Varioskan LUX). Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ningún extracto crudo) y un control negativo (solo medio de cultivo estéril). Cada tratamiento (12 tratamientos = 4 extractos crudos x 3 concentraciones) y control tuvieron 6 réplicas.

2.2.6 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

2.2.6.1 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

La producción de EPS de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con los cuatro extractos crudos fue cuantificada mediante el método de tinción con blanco de calcoflúor (Chalhoub et al., 2017; Yang et al., 2017), como se describe en la sección 2.1.6.1. Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ningún extracto crudo) y un control negativo (solo medio estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.2.6.2 NIVELES DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Los niveles de formación de biopelículas de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con los cuatro extractos crudos fueron cuantificados mediante tinción con cristal violeta, descrito previamente en la sección 2.1.6.2. Se incluyó un control positivo (cultivo bacteriano sin ningún extracto crudo) y un control negativo (solo medio de cultivo estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.2.6.3 MOTILIDAD DE ENJAMBRE

La motilidad de enjambre de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* Ba94C2 tratada con cada una de las tres concentraciones para los cuatro extractos crudos fue cuantificada siguiendo el protocolo de (Pozo et al., 2024), y descrito previamente en la sección 2.1.6.3. Se incluyó un control positivo (placa Petri sin ningún extracto crudo) y un control negativo (placa Petri solo con medio de cultivo estéril). Cada tratamiento y control tuvieron 6 réplicas.

2.2.7 ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS EN *P. vannamei*

2.2.7.1 PRUEBA *IN VITRO* DE TOXICIDAD EN HEMOCITOS DE *P. vannamei*

La toxicidad sobre hemocitos de *P. vannamei* de cada una de las tres concentraciones para los cuatro extractos crudos fue evaluada mediante la prueba de viabilidad celular *in vitro* del bromuro de MTT (Domínguez-Borbor et al., 2018), tal como se describió en la sección 2.1.7.1. Se utilizó un control positivo (cultivo de hemocitos no expuesto a ningún extracto crudo). Cada tratamiento y control positivo tuvieron 6 réplicas.

2.2.7.2 PRUEBA *IN VIVO* DE TOXICIDAD EN POSTLARVAS *P. vannamei*

En base a los resultados de las pruebas *in vitro*, las dos concentraciones más altas (1.4 ppm y 14.0 ppm) de cada uno de los cuatro extractos crudos de las algas fueron utilizadas para evaluar la toxicidad mediante una prueba *in vivo* en postlarvas de camarón *P. vannamei*. Las postlarvas, en estadio PL9, se obtuvieron de un laboratorio comercial de producción de larvas (Santa Elena, Ecuador) y se transportaron a una sala experimental del CENAIM (Santa Elena, Ecuador). Un total de 1350 de estas postlarvas fueron distribuidas en 45

recipientes plásticos (unidades experimentales) que contenían 300 mL de agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific America, SQ500C), a una densidad de 30 postlarvas por unidad experimental. Las postlarvas fueron aclimatadas durante 1 día hasta que el agua de cultivo llegó a 30 ± 1 °C, y 34 g/L de salinidad. Luego del periodo de aclimatación se realizó un recambio de agua del 50%, y posteriormente se añadió la respectiva concentración de los extractos crudos, según el tratamiento correspondiente, hasta alcanzar una concentración final de 1.4 ppm y 14.0 ppm en las unidades experimentales (ocho tratamientos = 4 extractos crudos x 2 concentraciones). Se incluyó un control (unidades experimentales sin inoculación de ningún extracto crudo). Todas las unidades experimentales recibieron aireación continua durante todo el experimento. Las postlarvas fueron alimentadas con Epibal-300® (Epicore BioNetworks Inc) cada dos horas durante todo el experimento. Luego de 24 horas posteriores a la administración de los extractos crudos se contó el número de postlarvas supervivientes en cada unidad experimental. Cada tratamiento y control tuvieron 5 réplicas.

2.2.8 PRUEBA DE DESAFÍO DE POSTLARVAS DE CAMARÓN *P. vannamei* TRATADAS CON EXTRACTOS CRUDOS E INFECTADAS CON LA BACTERIA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

2.2.8.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

La bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 fue activada tal como se describió en la sección 2.1.8.1.

2.2.8.2 PRUEBA DE DESAFÍO

Las postlarvas *P. vannamei* (PL10) se obtuvieron de un laboratorio comercial de producción de larvas (Santa Elena, Ecuador) y fueron transportadas (15 min) a una sala experimental

del CENAIM. Un total de 0.2 g del stock inicial de las postlarvas fueron utilizadas para la detección por análisis de PCR de los genes codificantes para las toxinas PirAB utilizando los cebadores AP4 F1/R1 - AP4 F2/R2 (Dangtip et al., 2015). En tanto que, 20 postlarvas de ese stock inicial fueron preservadas en solución Davidson, y posteriormente examinadas mediante análisis histopatológico para evaluar su estado de salud. Las postlarvas se aclimataron durante 1 día (30 ± 1 °C, 34 g/L de salinidad). Posteriormente, un total de 5040 postlarvas fueron distribuidas en 14 recipientes plásticos conteniendo cada uno 4 L de agua de mar estéril, a una densidad de 360 postlarvas por recipiente. Inmediatamente, los extractos crudos de macroalgas y microalgas, a las tres concentraciones, fueron adicionados por dos días consecutivos (1 vez/día) a 12 de estos recipientes según el tratamiento correspondiente. Durante ese periodo, los dos recipientes restantes no recibieron la adición de ningún extracto.

Después de los dos días de administración de los extractos crudos, un total de 180 postlarvas de cada uno de los 14 recipientes plásticos fueron transferidas a 6 recipientes plásticos de 500 mL (unidad experimental) conteniendo 300 mL de agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific America, SQ500C), a una densidad de 30 postlarvas por unidad experimental. Las postlarvas restantes en cada uno de los 14 recipientes plásticos de 4000 mL fueron contadas. Un total de 78 unidades experimentales recibieron la suspensión bacteriana de *V. parahaemolyticus* (Ba94C2) hasta una concentración final de 10^6 bacterias/mL. La prueba de desafío incluyó 12 tratamientos (4 extractos crudos x 3 concentraciones y dos controles: control positivo (postlarvas de camarón que no recibieron administración de extractos pero que si fueron infectadas con la bacteria patógena), y control negativo (postlarvas de camarón que no recibieron administración de extractos ni fueron infectadas). Se empleó 6 réplicas para cada control y tratamiento. Las unidades experimentales se airearon continuamente y las postlarvas se alimentaron con Epibal-300® (Epicore BioNetworks Inc.) cada dos horas durante todo el experimento. Luego de 24 horas posteriores a la infección se realizó un recambio del 50% con agua de mar esterilizada por autoclave (Yamato Scientific America, SQ500C). En cada unidad experimental se registró la supervivencia cada cuatro horas hasta las 36 h post infección (cosecha). A la cosecha, tres pools de postlarvas sobrevivientes de cada

tratamiento (10 postlarvas/pool) fueron colectadas para análisis de la expresión relativa de genes relacionados con la respuesta inmune de *P. vannamei*. Además, para cada tratamiento y control se colectaron muestras de postlarvas sobrevivientes para la detección de los genes *PirA* y *PirB* por análisis de PCR y análisis histopatológico.

2.2.9 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE LA ACUMULACIÓN RELATIVA DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE EN POST LARVAS *P. vannamei*

Se evaluó la expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune de *P. vannamei* para los tres pools de postlarvas (réplicas biológicas) colectados en cada uno de los 12 tratamientos y en los dos controles (positivo y negativo) mediante análisis de RT-qPCR, según lo descrito por Rudtanatip et al. (2017). Cada muestra se procesó por duplicado (réplicas técnicas). Los genes de la respuesta inmune analizados fueron: *PEN-4* y *Crustin* (ambos codificantes para los correspondientes péptidos antimicrobianos), y *proPO-I* y *proPO-II* (sistema de profenoloxidasa) (Tabla II). Mientras que, los genes housekeeping del camarón fueron: *EF-1a* (factor de elongación) y *β -actin* (Tabla II). Se extrajo el ARN con 200 μ L de reactivo TRI según el protocolo del fabricante (TRI Reagent[®] Sigma-Aldrich). Se tomaron 5 μ L de ARN a una concentración de 200 ng/mL para obtener ADNc utilizando el kit RevertAid First Strand cADN (Thermo Scientific, EE. UU.) conteniendo 1 μ L de RevertAid Reverse Transcriptase (200 U μ L), 1 μ L de RiboLock RNase Inhibitor (20 U μ L), 1 μ L de cebadores (100 uM) (Tabla II), 2 μ L de mezcla de dNTP (10 mM), 6 μ L de agua libre de nucleasas y 4 μ L de tampón de reacción 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT) a 42 °C durante 1 h, seguido de 70 °C durante 5 minutos. Se amplificó 1 uL de ADNc de los genes previamente descritos. La qPCR se desarrolló con 25 μ L de reacción que contenía 0.125 mL de ADN polimerasa (2 U mL), 0.25 mL de Mezcla dNTP 10 mM, 0.625 mL de primer Forward y 10 mM Reverse, 7.375 ml de agua libre de nucleasas y 2.5 mL de tampón 5x conteniendo MgCl₂ 7.5 mM (Thermo Scientific). Las condiciones de reacción de la PCR

fueron: 98 °C durante 30 s, seguido de 28-40 ciclos a 98 °C durante 10 s. La temperatura de hibridación se describe en la Tabla II. El número de ciclos fueron diferentes para cada conjunto de cebadores. La extensión se realizó a 72 °C durante 30 s, seguido de la extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Se obtuvieron los valores umbrales de número de ciclos (Ct) para cada una de las réplicas biológicas y técnicas de los 12 tratamientos y los dos controles, correspondientes a los cuatro genes relacionados a la respuesta inmune, así como para los dos genes housekeeping estables en situación de infección.

Tabla II. Conjunto de cebadores utilizados para evaluar la acumulación relativa de transcritos de genes relacionados con la respuesta inmune de *P. vannamei*.

Genes	Cebadores	Secuencias de los cebadores 5'-3'	Tm (°C)	Referencia	
<i>PEN-4</i>	Forward	ATGCTACGGAATTCCCTCCT	60	Rudtanatip et al. (2017)	
	Reverse	ATCCTTGCAACGCATAGACC			
<i>Crustin</i>	Forward	GTCGCAGTGCAGGTACTGGT	60		
	Reverse	TAGTCGTTGGAGCACGTCTG			
<i>proPO-I</i>	Forward	GCCTTGGCAACGCTTTCA	60		
	Reverse	CGCGCATCAGTTCAGTTTGT			
<i>proPO-II</i>	Forward	GAGAGGCTGAACCGAGACTGA	60		
	Reverse	AAGAAAACGGCCCCCAATT			
<i>EF-1a</i>	Forward	GAAGTAGCCGCCCTGGTTG	60		
	Reverse	CGGTTAGCCTTGGGGTTGAG			
□ <i>-actin</i>	Forward	AGATGTGTGACGACGAAGTAGCCG	60		El presente autor
	Reverse	TCACGAACGATTTCTCGCTCG			

2.2.10 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE EXTRACTOS CRUDOS DE MICROALGAS Y MACROALGAS POR ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La determinación de compuestos de los extractos crudos de microalgas y macroalgas se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM (Agilent Technologies, sistema 7890A GC y 5975C inerte XL MSD con detector de triple eje), usando una columna DB-5MS (30 m longitud x 0.25 mm diámetro interno) con 0.25 μm de espesor de película, gas de arrastre de helio (He), con un flujo de 1.2 mL/min. Las temperaturas fueron: inyección a 250 °C en modo Splitless, temperatura inicial del horno a 70 °C por 2 minutos, gradiente del horno a 5 °C/min, final del horno a 300 °C por 6 minutos, de transferencia a 300 °C, del detector a 230 °C. El voltaje de electroionización fue a 70 eV, a un rango de screening de 50-550 u.m.a.

2.2.11 ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias entre los doce tratamientos (4 extractos crudos x 3 concentraciones: 0.14 ppm, 1.4 ppm y 14 ppm) y el control positivo de: crecimiento y supervivencia registrada en la prueba *in vivo* de toxicidad, fueron evaluadas mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), o con la prueba no paramétrica de suma de rangos de Kruskal-Wallis (crecimiento a 10 h y 12 h). Previo al ANOVA se evaluaron las asunciones de homogeneidad de varianza y normalidad entre tratamientos utilizando las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios de los tratamientos después de que las pruebas de ANOVA resultaron significativas.

La producción de EPS se analizó por separado para cada extracto crudo debido a que las muestras se distribuyeron en diferentes microplacas. Para los valores de EPS obtenidos con los extractos crudos de *S. natans* y *T. weissflogii*, las diferencias entre tratamientos (3

concentraciones: 0.14 ppm, 1.4 ppm y 14 ppm) y el control positivo se analizaron mediante ANOVA de una vía luego que los supuestos paramétricos fueron alcanzados mediante verificación de las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk; en estos casos se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios entre tratamientos y el control positivo. Para los valores de EPS obtenidos con los extractos crudos de *P. gymnospora* e *I. galbana*, las diferencias entre tratamientos (3 concentraciones: 0.14 ppm, 1.4 ppm y 14 ppm) y el control positivo se analizaron mediante la prueba no paramétrica de suma de rangos de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación de rangos de Nemenyi para identificar diferencias significativas entre tratamientos.

El análisis de datos de los niveles de formación de biopelículas también se analizó por separado para cada extracto crudo debido a que las muestras se distribuyeron en diferentes microplacas. Las diferencias de los niveles de formación de biopelículas entre tratamientos y el control positivo se analizaron mediante ANOVA de una vía luego que los supuestos paramétricos fueron alcanzados mediante verificación de las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk; en estos casos también se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios entre tratamientos y el control positivo.

El análisis de datos de la motilidad de enjambre de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* se realizó según lo sugerido por Pozo et al. (2024), comparando las pendientes de la fase exponencial de las curvas de motilidad de la bacteria tratada con los doce tratamientos (4 extractos crudos x 3 concentraciones: 0.14 ppm, 1.4 ppm y 14 ppm) y el control positivo. Con base en esta consideración, los puntos XY de las curvas entre las 8 h y 20 h (puntos XY correspondiente a la fase exponencial) se utilizaron para el análisis de datos. La prueba F de falta de ajuste a una regresión con réplicas (Kutner et al., 2005) fue utilizada para probar si una función de regresión lineal simple resultó un buen ajuste para cada tratamiento y el control positivo.

En todos los casos, se obtuvieron resultados no significativos con la prueba F por lo que para cada réplica de tratamientos y control positivo se realizó una regresión lineal simple. Las pendientes de las regresiones lineales se compararon entre tratamientos y control positivo mediante ANOVA de una vía, evaluando previamente las asunciones de homogeneidad de varianza y normalidad entre tratamientos con las pruebas de Levene y

Shapiro-Wilk, respectivamente. Se utilizó la prueba de diferencias significativas honestas de Tukey para comparar los promedios entre tratamientos y control positivo.

Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular la expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta inmune de *P. vannamei* (Livak & Schmittgen, 2001). Los valores de Ct (genes de la respuesta inmune) de los duplicados fueron promediados. En base a los valores de Ct obtenidos con los genes housekeeping, se utilizó el gen β -actin como control interno por presentar mayor estabilidad que *EF-1a*, promediando los valores de Ct de este control interno (duplicados y réplicas técnicas). Las diferencias (ΔCt) en Ct entre los genes de la respuesta inmune y housekeeping se calcularon para cada muestra como: Ct (gen de la respuesta inmune) - Ct (promedio housekeeping). Cada ΔCt se normalizó contra el ΔCt del control positivo para obtener $\Delta\Delta Ct$, el cual se calculó como: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (tratamiento) - ΔCt (control positivo). La expresión de cada gen de virulencia relativa al control positivo se obtuvo para cada muestra como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias en la expresión (relativa al gen housekeeping β -actin) entre los doce tratamientos (4 extractos crudos x 3 concentraciones: 0.14 ppm, 1.4 ppm y 14 ppm) y el control positivo se evaluaron para cada gen de virulencia mediante ANOVA de una vía (la expresión relativa de los genes *Crustin* y *proPO-II* fueron transformada a log X). Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para probar la normalidad y la prueba de Levene para probar la homogeneidad de la varianza entre tratamientos.

La supervivencia acumulada de las postlarvas de *P. vannamei* a las 36 h posteriores a la infección con la cepa patógena *V. parahaemolyticus* se analizó mediante ANOVA de una vía. Las probabilidades de supervivencia se analizaron mediante el análisis no paramétrico de Kaplan-Meier, y las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank.

Los efectos de los tratamientos se consideraron significativos a $p < 0.05$. Todos los valores se expresaron como media \pm error estándar de la media, excepto la expresión relativa de los genes de virulencia que fueron expresados como promedios \pm desviación estándar. Se utilizó el software R versión 4.3.0 para el análisis de datos (R Core TeamR, 2022).

En esta sección se describe cómo se obtendrá toda la información básica en la que se apoya el trabajo (datos, encuestas, documentos, etc.), las herramientas que se utilizarán y la forma

en que esta información será analizada e interpretada para obtener los resultados intermedios que permitan obtener el logro u objetivo principal del proyecto. También se pueden hacer citas bibliográficas sobre otros autores que hayan aplicado metodologías o estrategias de análisis similares.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE LA VIRULENCIA DE *V. parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA AHPND EN LARVAS *P. vannamei*

3.1.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MACROALGAS

La identificación taxonómica inicial (revisión morfológica, Gráfico 7) fue confirmada con los resultados de la secuenciación Sanger de la región 23S rRNA. Así, según el análisis de Blastn, las dos secuencias consenso (372 y 264 pb) se identificaron como *P. gymnospora* y *S. natans* (98.66% y 100% de similitud), respectivamente.

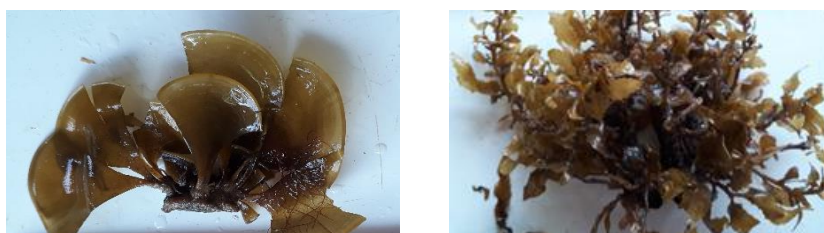


Gráfico 7. Especímenes de *P. gymnospora* y *S. natans* colectados en la zona submareal rocosa de Ballenita (Santa Elena, Ecuador).

3.1.2 CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE IAA EN EXTRACTOS DE AUXINAS DE MACROALGAS

Las concentraciones de IAA en los extractos de *P. gymnospora* y *S. natans* fueron 271.0 ± 4.15 ppm y 140.0 ± 15.3 ppm, evidenciando una mayor concentración en el extracto de *P. gymnospora*. Los tiempos de retención de los picos observados en los cromatogramas del análisis UPLC correspondientes a los extractos de *P. gymnospora* y *S. natans* fueron iguales al

reportado para el IAA sintético (2.76 min), evidenciando la presencia de la molécula de IAA en ambos extractos de macroalgas, y la ausencia de picos que pudieran corresponder a otros compuestos (Gráfico 8).

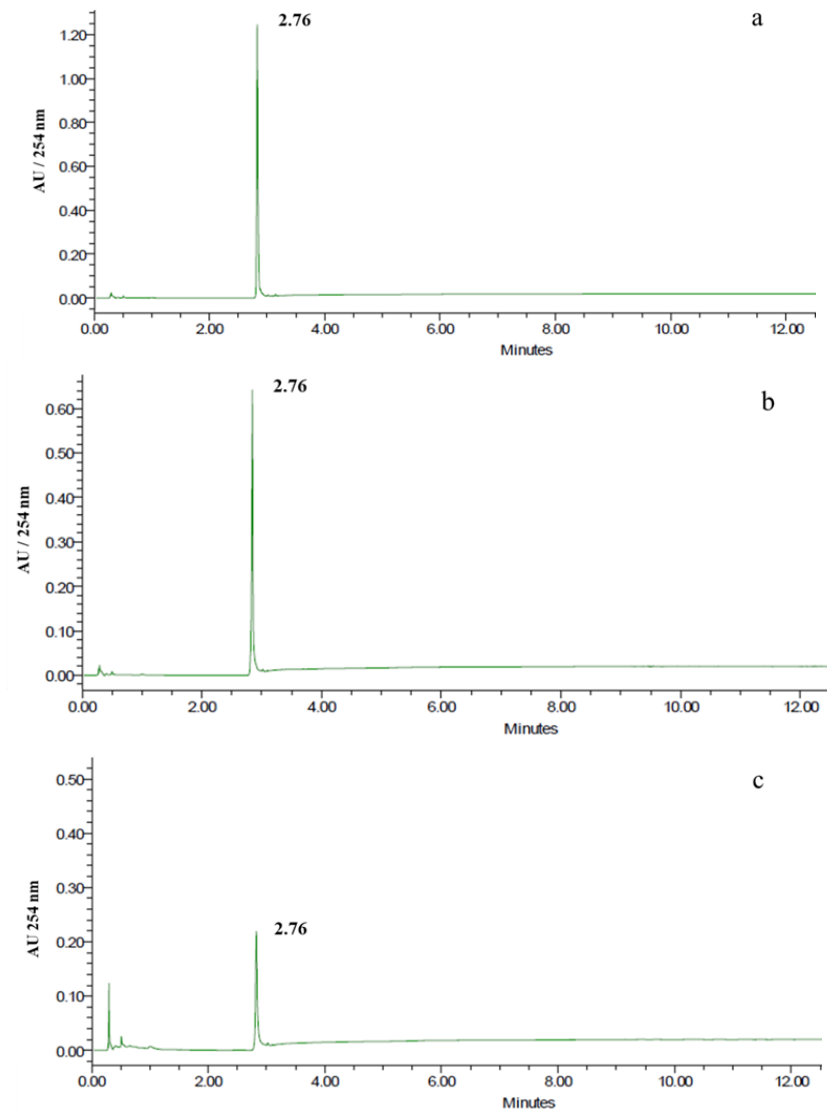


Gráfico 8. Cromatogramas obtenidos para las tres fuentes de IAA con el análisis de UPLC (Water Acquity H UPLC[®] CLASS – PDA e⁺ detector). (a) Ácido indol-3-acético sintético usado como control de referencia, (b) extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y (c) extracto rico en IAA de *S. natans*.

3.1.3 EFECTO DE EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

No se observó inhibición de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en ninguna de las réplicas evaluadas mediante antibiogramas, mostrando que los extractos ricos en IAA no presentaron características antimicrobianas. Por el contrario, todas las réplicas del control positivo (florfenicol 99% a 70 ppm) mostraron halos de 22 mm, confirmando la susceptibilidad de la cepa patógena a este antibiótico. El crecimiento de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* en todos los tratamientos y control positivo mostró una curva logística o sigmoide típica de proliferación celular en cultivos discontinuos (Gráfico 9). Se observó la extensión de la fase exponencial hasta las 10 horas de cultivo. Luego de las 16 horas se observó el límite de la capacidad de carga del medio de cultivo, iniciándose la fase de muerte celular. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la concentración bacteriana entre tratamientos y el control positivo en la fase exponencial del crecimiento bacteriano (0 – 10 horas, Gráfico 9, Tabla III). En general, entre las 12 y 22 horas, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el crecimiento bacteriano en los cuatro tratamientos del extracto de *S. natans*, y a 30 $\mu\text{g/L}$ y 40 $\mu\text{g/L}$ de *P. gymnospora*, comparado con el control positivo (Gráfico 9, Tabla III). En ese periodo de entre las 12 y 22 horas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el crecimiento bacteriano a las dos concentraciones más bajas (10 y 20 $\mu\text{g/L}$) de *P. gymnospora*, ni en los tratamientos de IAA sintético, comparado con el control positivo. Excepto a las 12 horas, cuando la concentración celular de los extractos de *P. gymnospora* fue significativamente superior ($p < 0.05$) que el control positivo (Gráfico 9, Tabla III). Estos resultados confirmaron que ninguna de las tres fuentes de IAA,

a ninguna de las concentraciones estudiadas, inhibió el crecimiento de la bacteria patógena (Gráfico 9, Tabla III).

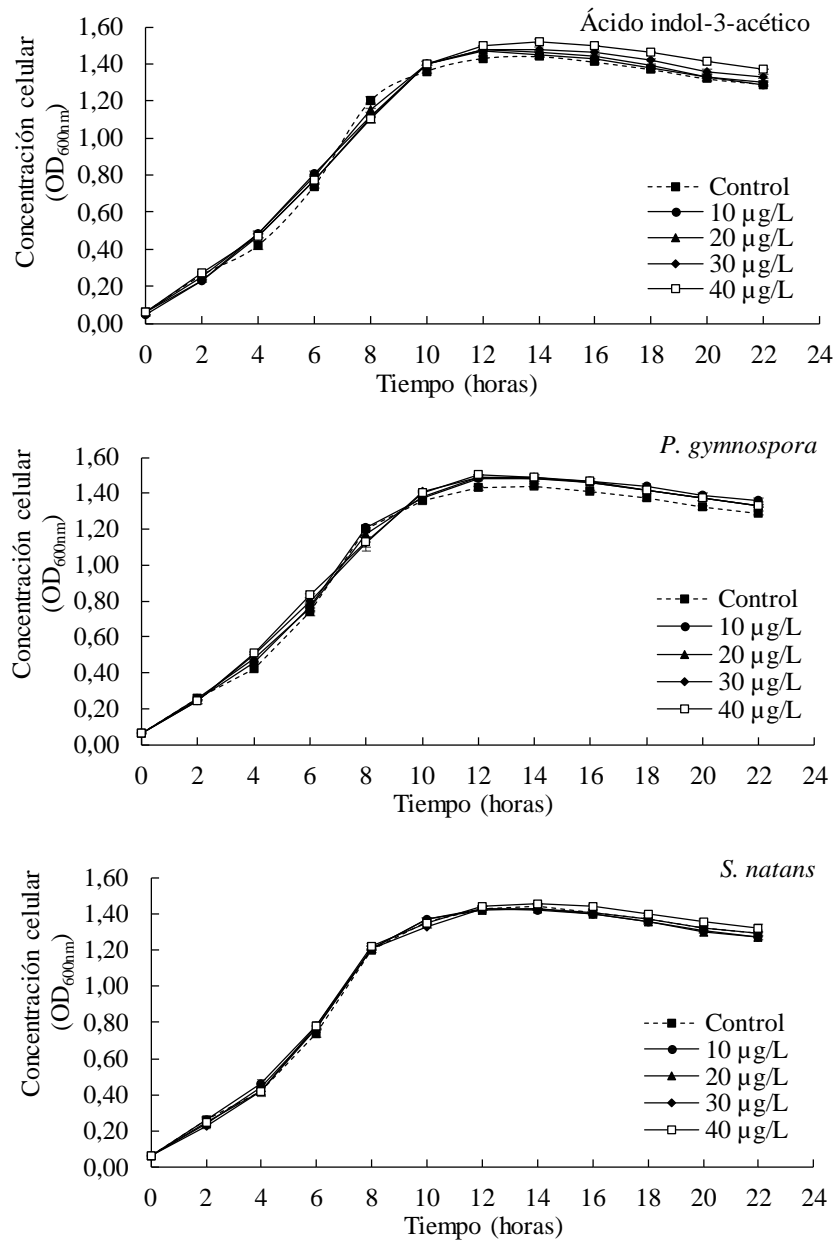


Gráfico 9. Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA: ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y extracto rico en IAA de *S. natans*. Control (control positivo, bacteria no tratada).

Tabla III. Crecimiento bacteriano (OD_{600nm}, promedio ± error estándar) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 expuesta a cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA. Control positivo (bacteria no tratada). Para cada columna letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (0 h, 2 h, 4 h, 8 h y 14 h).

Fuentes de IAA	Concentración (µg/L)	Tiempo (horas)											
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
IAA sintético	10	0.06 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.02 ^{ab}	1.21 ± 0.01 ^a	1.37 ± 0.01 ^{abc}	1.43 ± 0.00 ^a	1.42 ± 0.00 ^a	1.40 ± 0.00 ^a	1.36 ± 0.01 ^a	1.31 ± 0.01 ^{ab}	1.27 ± 0.01 ^a
	20	0.06 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.02 ^a	0.77 ± 0.00 ^{ab}	1.21 ± 0.01 ^a	1.37 ± 0.01 ^{abc}	1.42 ± 0.00 ^a	1.43 ± 0.00 ^a	1.40 ± 0.01 ^a	1.36 ± 0.02 ^a	1.30 ± 0.01 ^a	1.27 ± 0.01 ^a
	30	0.06 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.03 ^a	0.77 ± 0.01 ^{ab}	1.21 ± 0.01 ^a	1.33 ± 0.01 ^a	1.43 ± 0.00 ^a	1.43 ± 0.00 ^a	1.41 ± 0.01 ^{ab}	1.37 ± 0.01 ^{abc}	1.32 ± 0.01 ^{abc}	1.29 ± 0.01 ^{ab}
	40	0.06 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.02 ^{ab}	1.22 ± 0.02 ^a	1.35 ± 0.01 ^{ab}	1.44 ± 0.00 ^{ab}	1.46 ± 0.00 ^{ab}	1.44 ± 0.01 ^{bcd}	1.40 ± 0.01 ^{abcd}	1.36 ± 0.01 ^{bcd}	1.32 ± 0.02 ^{abc}
Extracto rico en IAA <i>P. gymnospora</i>	10	0.05 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.02 ^a	0.81 ± 0.01 ^{ab}	1.12 ± 0.04 ^a	1.40 ± 0.01 ^{bc}	1.47 ± 0.00 ^{bc}	1.45 ± 0.01 ^{ab}	1.43 ± 0.01 ^{abc}	1.38 ± 0.01 ^{abc}	1.33 ± 0.01 ^{abc}	1.29 ± 0.01 ^{ab}
	20	0.06 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.00 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.79 ± 0.01 ^{ab}	1.15 ± 0.02 ^a	1.40 ± 0.01 ^{bc}	1.48 ± 0.00 ^{cd}	1.46 ± 0.01 ^{ab}	1.44 ± 0.01 ^{bcd}	1.39 ± 0.01 ^{abc}	1.33 ± 0.01 ^{abc}	1.30 ± 0.00 ^{ab}
	30	0.06 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.01 ^{ab}	1.11 ± 0.03 ^a	1.40 ± 0.01 ^{bc}	1.48 ± 0.00 ^{cd}	1.48 ± 0.01 ^{bc}	1.46 ± 0.01 ^{cdc}	1.42 ± 0.01 ^{bcde}	1.36 ± 0.01 ^{bcd}	1.33 ± 0.01 ^{bcd}
	40	0.06 ± 0.00 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.02 ^{ab}	1.10 ± 0.02 ^a	1.40 ± 0.01 ^{bc}	1.50 ± 0.00 ^d	1.52 ± 0.01 ^c	1.50 ± 0.00 ^c	1.46 ± 0.00 ^c	1.41 ± 0.00 ^d	1.37 ± 0.00 ^d
Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.06 ± 0.00 ^a	0.25 ± 0.00 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.02 ^{ab}	1.21 ± 0.01 ^a	1.37 ± 0.01 ^{abc}	1.48 ± 0.00 ^{cd}	1.48 ± 0.01 ^{bc}	1.47 ± 0.01 ^{de}	1.44 ± 0.01 ^{de}	1.39 ± 0.01 ^d	1.36 ± 0.01 ^{cd}
	20	0.06 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.76 ± 0.02 ^{ab}	1.17 ± 0.04 ^a	1.38 ± 0.00 ^{abc}	1.49 ± 0.00 ^{cd}	1.48 ± 0.01 ^{bc}	1.46 ± 0.01 ^{cdc}	1.42 ± 0.01 ^{abc}	1.37 ± 0.01 ^{cd}	1.33 ± 0.01 ^{bcd}
	30	0.06 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.50 ± 0.02 ^a	0.80 ± 0.02 ^{ab}	1.12 ± 0.04 ^a	1.41 ± 0.01 ^c	1.49 ± 0.01 ^{cd}	1.49 ± 0.01 ^{bc}	1.46 ± 0.01 ^{cdc}	1.42 ± 0.01 ^{bcde}	1.37 ± 0.01 ^{cd}	1.33 ± 0.01 ^{bcd}
	40	0.06 ± 0.00 ^a	0.24 ± 0.01 ^a	0.51 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.01 ^b	1.13 ± 0.03 ^a	1.40 ± 0.01 ^{bc}	1.50 ± 0.00 ^d	1.49 ± 0.01 ^{bc}	1.47 ± 0.01 ^{de}	1.42 ± 0.01 ^{cdc}	1.37 ± 0.01 ^{cd}	1.33 ± 0.01 ^{bcd}
Control positivo		0.06 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.02 ^a	0.78 ± 0.02 ^a	1.21 ± 0.01 ^{abc}	1.37 ± 0.01 ^a	1.43 ± 0.00 ^a	1.42 ± 0.00 ^{ab}	1.40 ± 0.00 ^{ab}	1.36 ± 0.01 ^{abc}	1.31 ± 0.01 ^{ab}

3.1.4 EFECTO DE LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

3.1.4.1 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

La producción de EPS de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* se redujo significativamente ($p < 0.05$) a todas las concentraciones de *P. gymnospora* y *S. natans*, así como para las concentraciones de 20 y 30 $\mu\text{g/L}$ de IAA sintético, comparado con el control positivo (Gráfico 10).

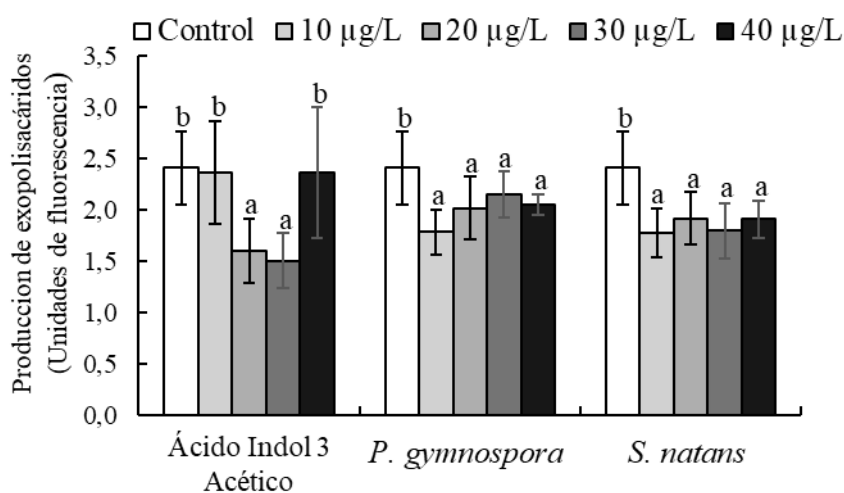


Gráfico 10. Producción de exopolisacáridos (promedio \pm error estándar, $n = 6$, \square_{exc} 405 nm, \square_{em} 500 nm) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y extracto rico en IAA de *S. natans*). Control (control positivo, bacteria no tratada). Para cada fuente de IAA letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

3.1.4.2 NIVELES DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se observó una disminución significativa en los niveles de producción de biopelículas únicamente a 20 $\mu\text{g/L}$ del extracto de *S. natans* (Gráfico 11). Por el contrario, las bacterias expuestas al IAA sintético no mostraron ningún efecto significativo sobre la formación de biopelículas (Gráfico 11). En tanto que, la producción de niveles de biopelículas se incrementó significativamente a 30 $\mu\text{g/L}$ del extracto de *P. gymnospora* y 40 $\mu\text{g/L}$ del extracto de *S. natans* (Gráfico 11).

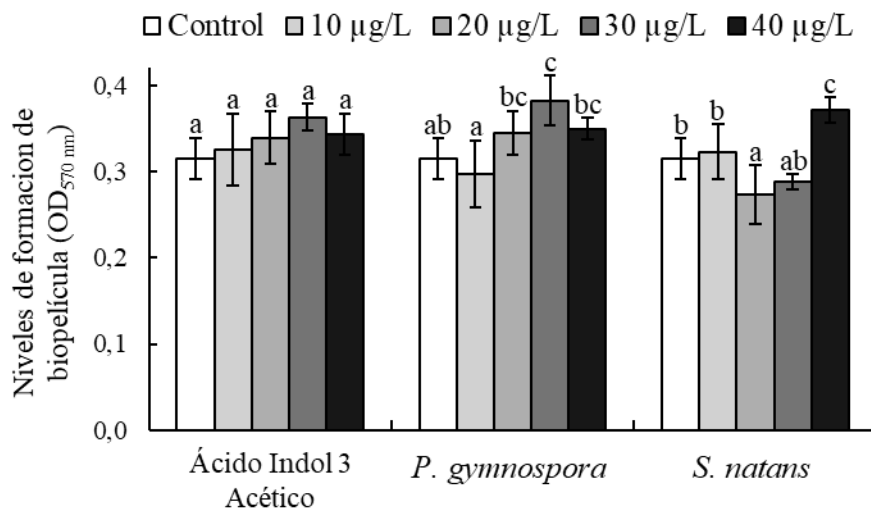


Gráfico 11. Niveles de formación de biopelículas (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con cuatro concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y extracto rico en IAA de *S. natans*). Tinción con cristal violeta (0.4%). Control (control positivo, bacteria no tratada). Para cada fuente de IAA letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

3.1.4.3 MOTILIDAD DE ENJAMBRE

La pendiente de la motilidad de enjambre de la bacteria patógena se redujo significativamente a todas las concentraciones analizadas, con una marcada reducción a las dos concentraciones

más bajas (entre 24 y 39%) de extractos de macroalgas (Gráfico 12, Tabla IV). Por el contrario, altas concentraciones (30 y 40 $\mu\text{g/L}$) del IAA sintético provocaron un aumento (up-regulation) en la motilidad de enjambre a partir de las primeras 4 horas de evaluación; alcanzando halos de motilidad de 85.0 ± 1.1 mm a las 10 horas del periodo de incubación a ambas concentraciones, cuatro horas antes de la máxima motilidad del control positivo (Gráfico 12).

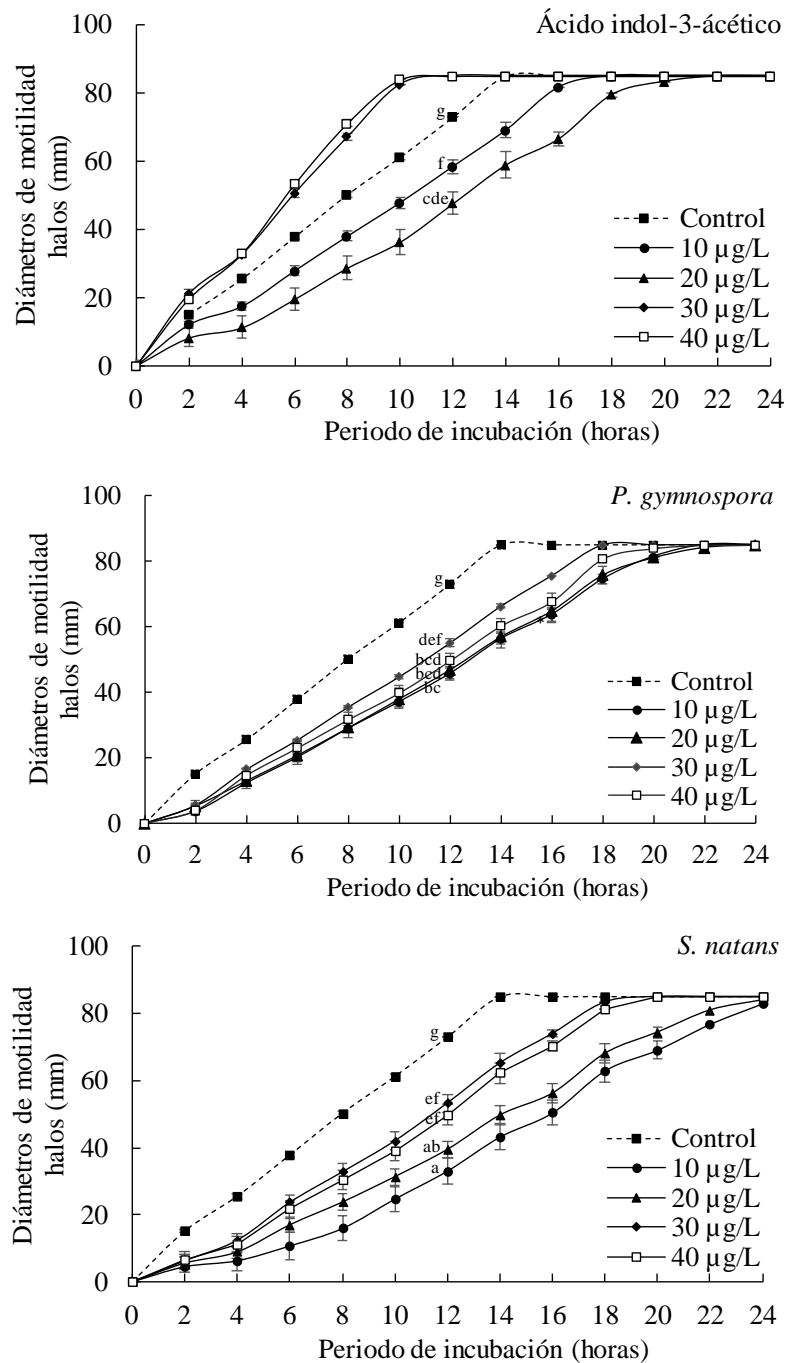


Gráfico 12. Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con diferentes concentraciones de tres fuentes de IAA (ácido indol-3-ácético sintético, extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y extracto rico en IAA de *S. natans*). Control (control positivo, bacteria no tratada). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre pendientes (fase exponencial linealizada de las curvas de motilidad) según ANOVA de una vía.

Tabla IV. Motilidad de enjambre de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres fuentes de IAA y estimada con las pendientes (promedio \pm error estándar, n = 6) de la fase exponencial linealizada de las curvas de motilidad de la bacteria tratada (Gráfico 12). Control (control positivo, bacteria no tratada). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre pendientes según ANOVA de una vía.

Fuentes de IAA	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Pendiente (mm/hora)
IAA sintético	10	5.20 ± 0.10^f
	20	4.76 ± 0.11^{cde}
Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	4.40 ± 0.10^{bc}
	20	4.53 ± 0.05^{bcd}
	30	4.92 ± 0.07^{def}
	40	4.53 ± 0.04^{bcd}
Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	3.60 ± 0.24^a
	20	4.06 ± 0.09^{ab}
	30	5.14 ± 0.06^{ef}
	40	5.02 ± 0.07^{ef}
Control positivo		5.91 ± 0.04^g

3.1.4.4 ACUMULACIÓN RELATIVA DE TRANSCRITOS DE GENES DE VIRULENCIA

Las expresiones de los cuatro genes de virulencia evaluados (*OpaR*, *flaA*, *PirA* y *PirB*) disminuyeron significativamente comparadas con sus respectivos controles positivos (Tabla V). La disminución fue muy variable para los genes de virulencia *OpaR*, *flaA* y *PirA*, en tanto que se observó un patrón en la expresión de *PirB* para las tres fuentes de IAA, consistente en una disminución directamente proporcional a la concentración evaluada (Tabla V).

Tabla V. Expresión diferencial (promedios \pm desviación estándar, n = 3) de genes de virulencia (gen housekeeping *rpoA*) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con IAA sintético y extractos ricos en IAA de las macroalgas *P. gymnospora* y *S. natans* relativa al control positivo (bacteria no tratada). Para cada gen de virulencia, letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Genes de virulencia	Fuentes de IAA	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Expresión relativa (número de veces)
<i>OpaR</i>	IAA sintético	10	0.001 ± 0.000^a
		20	0.001 ± 0.001^a
	Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	0.000 ± 0.000^a
		20	0.001 ± 0.000^a
	Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.000 ± 0.000^a
		20	0.109 ± 0.185^a
	Control positivo		
<i>flaA</i>	IAA sintético	10	0.002 ± 0.000^a
		20	0.002 ± 0.002^a
	Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	0.006 ± 0.001^a
		20	0.011 ± 0.000^a
	Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.000 ± 0.000^a
		20	0.018 ± 0.032^a
	Control positivo		
<i>PirA</i>	IAA sintético	10	0.013 ± 0.000^a
		20	0.000 ± 0.000^a
	Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	0.004 ± 0.001^a
		20	0.005 ± 0.001^a
	Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.006 ± 0.000^a
		20	0.004 ± 0.002^a
	Control positivo		
<i>PirB</i>	IAA sintético	10	0.275 ± 0.281^a
		20	0.023 ± 0.030^a
	Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	0.172 ± 0.001^a
		20	0.086 ± 0.009^a
	Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.284 ± 0.130^a
		20	0.150 ± 0.082^a
	Control positivo		

3.1.5 ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS EN *P. vannamei*

Ninguna de las tres fuentes de IAA fueron tóxicas, ni para hemocitos ($p = 0.201$, Tabla VI), ni para postlarvas ($p = 0.065$, Tabla VII) de camarón *P. vannamei*. La supervivencia de las postlarvas al finalizar la prueba *in vivo* de toxicidad fue en promedio 92.2% (Tabla VII). En tanto que, la supervivencia de las postlarvas del control (no expuestas a ningún extracto) fue $98.3 \pm 1.8 \%$ (Tabla VII).

Tabla VI. Resultados de la prueba *in vitro* de toxicidad de MTT de las tres fuentes de IAA en hemocitos de camarón *P. vannamei*. Valores de unidades de absorbancia medido a OD_{620 nm} están expresados como promedio (\pm error estándar). Control positivo (hemocitos no tratados). Letras iguales indican resultados no significativos ($p > 0.05$) según análisis de ANOVA de una vía.

Fuentes de IAA	Concentración (µg/L)	Unidades de absorbancia
IAA sintético	10	0.220 ± 0.011^a
	20	0.222 ± 0.015^a
	30	0.227 ± 0.016^a
	40	0.221 ± 0.015^a
Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	0.218 ± 0.034^a
	20	0.228 ± 0.011^a
	30	0.216 ± 0.031^a
	40	0.244 ± 0.014^a
Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	0.238 ± 0.044^a
	20	0.250 ± 0.013^a
	30	0.221 ± 0.017^a
	40	0.234 ± 0.017^a
Control positivo		0.238 ± 0.011^a

Tabla VII. Resultados de la prueba *in vivo* de toxicidad de las tres fuentes de IAA en postlarvas de camarón *P. vannamei* (PL9). Valores de supervivencia están expresados como promedio (\pm error estándar). Control (postlarvas de camarón no expuestas a ningún extracto). Letras iguales indican resultados no significativos ($p > 0.05$) según análisis de ANOVA de una vía.

Fuentes de IAA	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Supervivencia (%)
IAA sintético	10	95.6 ± 1.7^a
	20	91.1 ± 6.6^a
Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	93.9 ± 3.9^a
	20	91.7 ± 5.9^a
Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	91.1 ± 5.0^a
	20	90.0 ± 7.0^a
Control		98.3 ± 1.8^a

3.1.6 PRUEBA DE DESAFÍO DE POSTLARVAS *P. vannamei* CON LA BACTERIA PATÓGENA *V. parahaemolyticus* TRATADA CON EXTRACTOS RICOS EN IAA DE MACROALGAS

La supervivencia acumulada de las postlarvas al finalizar el desafío experimental fue significativamente superior en el tratamiento a la concentración más alta (20 $\mu\text{g/L}$) de *P. gymnospora* ($75.6 \pm 3.5\%$) comparado con el control positivo ($50.0 \pm 3.4\%$) (Gráfico 13, Tabla VIII). Aunque no significativa, la supervivencia de las postlarvas infectadas con la bacteria tratada con *S. natans* a la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$ produjo una supervivencia de $78.9 \pm 3.4\%$ (Gráfico 13, Tabla VIII). En forma consistente, los tiempos promedios de supervivencia de las postlarvas que recibieron estos dos tratamientos (*P. gymnospora*: 49.9 ± 0.6 h, *S. natans*: 43.5 ± 0.7 h) fueron significativamente superiores al control positivo (34.4 ± 0.1 h), logrando las postlarvas sobrevivir 15.5 y 9.1 horas más que el control positivo (Tabla VIII). Al finalizar el desafío experimental la supervivencia de las postlarvas del control negativo fue del 100 % en todas las réplicas.

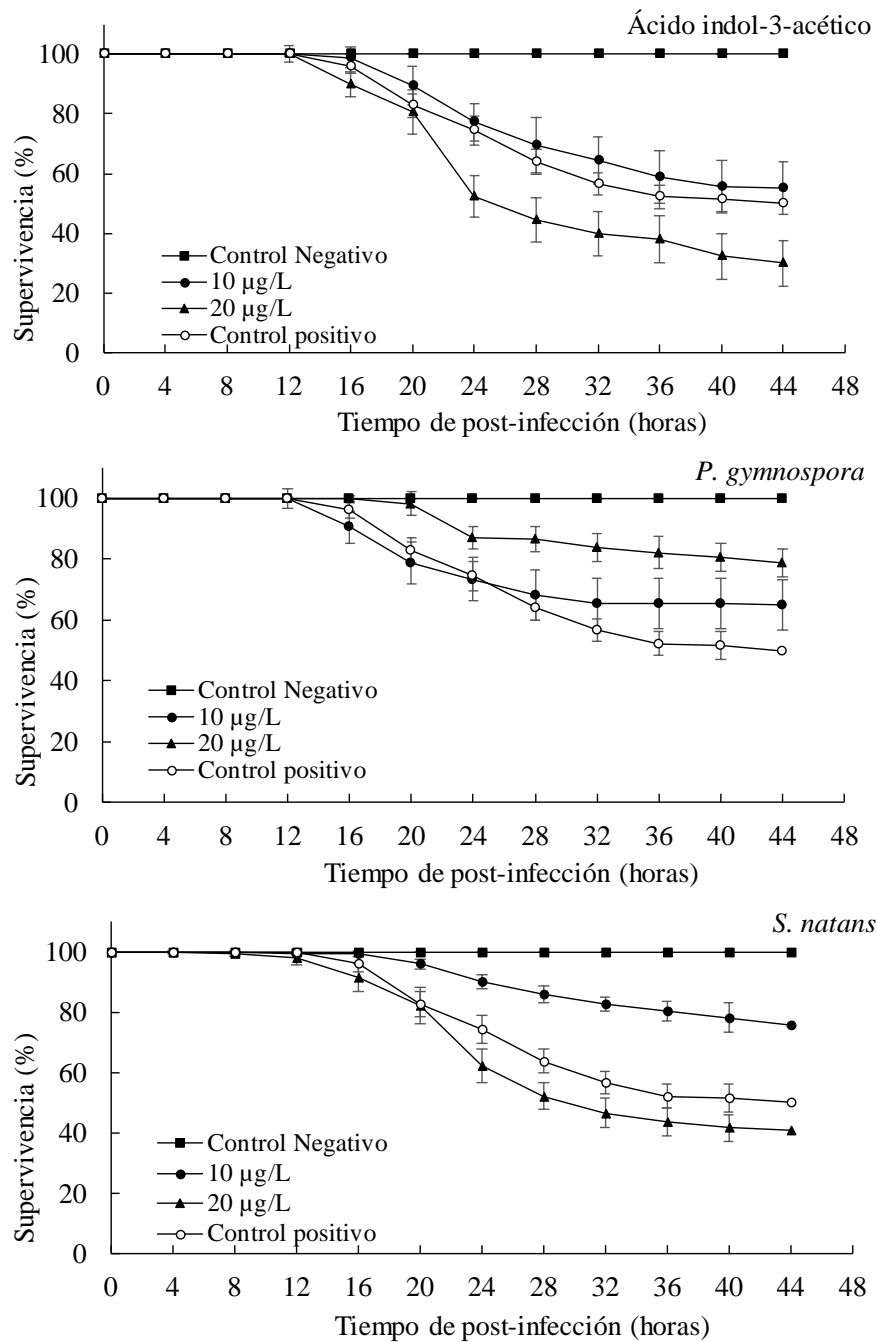


Gráfico 13. Supervivencia acumulada (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de postlarvas *P. vannamei* post-infección (PL9) con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* tratada con tres fuentes de IAA (ácido indol-3-acético sintético, extracto rico en IAA de *P. gymnospora* y extracto rico en IAA de *S. natans*). Control positivo (postlarvas infectadas con bacteria no tratada). Control negativo (postlarvas no infectadas) Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ANOVA de una vía.

Tabla VIII. Tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada (PL 11, promedio \pm error estándar, n = 6) a 44 horas post infección de postlarvas *P. vannamei* infectadas en PL9 con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 previamente tratada con dos concentraciones de tres fuentes de IAA. Control positivo (postlarvas infectadas con bacteria no tratada). Letras distintas en el tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y ANOVA de una vía, respectivamente.

Fuente de IAA	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Tiempo promedio de supervivencia (horas)	Supervivencia acumulada a las 44 horas post infección (%)
IAA sintético	10	38.4 ± 0.8^b	$55.0 \pm 4.7\%^{abcd}$
	20	32.4 ± 0.9^a	$30.0 \pm 4.4\%^a$
Extracto rico en IAA de <i>P. gymnospora</i>	10	37.0 ± 1.0^b	$65.0 \pm 4.5\%^{bcd}$
	20	49.9 ± 0.6^d	$75.6 \pm 3.5\%^d$
Extracto rico en IAA de <i>S. natans</i>	10	43.5 ± 0.7^c	$78.9 \pm 3.4\%^{cd}$
	20	37.4 ± 0.9^a	$41.1 \pm 3.3\%^{ab}$
Control positivo		34.4 ± 0.1^b	$50.0 \pm 3.4\%^{abc}$

Los resultados del análisis de PCR mostraron que las postlarvas del lote inicial fueron negativas para la presencia de los genes PirAB causantes de AHPND. Todas las muestras de postlarvas de los tratamientos y control infectados fueron positivas por PCR, mostrando la infección por *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. Mientras que, el control negativo fue negativo para la infección. En el anexo 1 se muestran los resultados del análisis histopatológico. Las postlarvas del lote inicial no presentaron lesiones histopatológicas compatibles con AHPND, ni con ninguna otra enfermedad emergente de camarón (Anexo 1). Las postlarvas sobrevivientes al desafío con la bacteria patógena tratada con las tres fuentes de IAA, así como el control positivo (postlarvas infectadas con *V. parahaemolyticus* no tratadas con IAA), mostraron lesiones típicas de AHPND en fase terminal, caracterizadas principalmente por la pérdida de la estructura de los túbulos del hepatopáncreas (Gráfico

14). Solo una de las postlarvas infectadas con la bacteria patógena tratada con el extracto rico en IAA de *P. gymnospora* a 20 µg/L mostró ausencia de lesiones compatibles con AHPND, presentando más bien túbulos del hepatopáncreas hipertrofiados (flecha azul, Gráficos 14c y 14d), infiltraciones hemocíticas (flecha amarillo, Gráficos 14c y 14d) y algunos túbulos del hepatopáncreas en condiciones normales (flecha verde, Gráficos 14c y 14 d). Dos de las diez postlarvas analizadas, sobrevivientes a la infección experimental con la bacteria tratada con el extracto rico en IAA de *S. natans* a 10 µg/L, presentaron lesiones producidas por AHPND con grado de severidad medio (fase de transición de la enfermedad, Gráficos 14e y 14f).

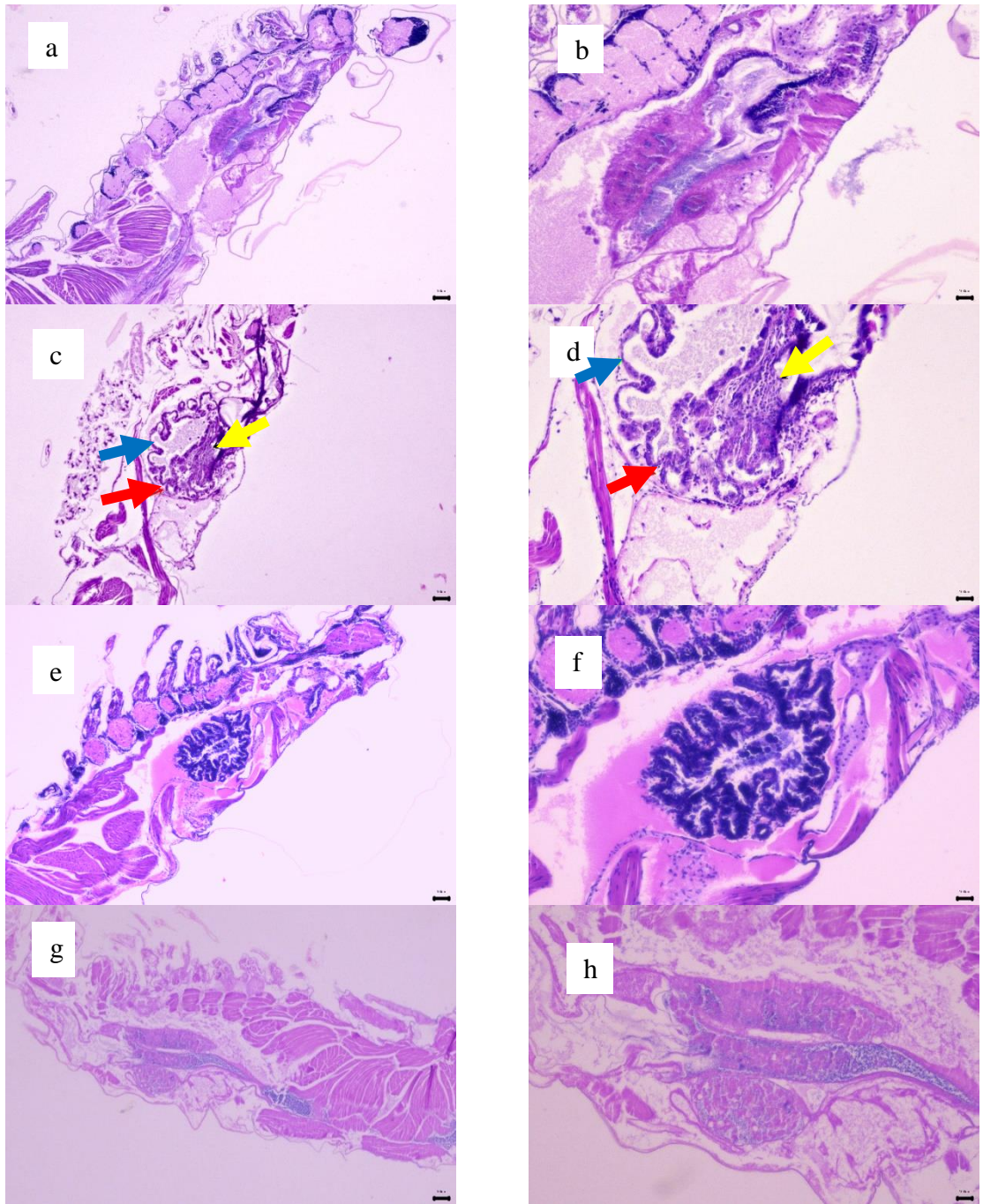


Gráfico 14. Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas *P. vannamei* sobrevivientes al desafío tratadas con IAA sintético (a) 4X, (b) 10X; extracto rico en IAA de *P. gymnospora* (c) 4X, (d) 10X; extracto rico en IAA de *S. natans* (e) 4X, (f) 10X; control positivo de postlarvas no tratadas (g) 4X, (h) 10X.

3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E INMUNOLÓGICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS EN LARVAS INFECTADAS CON *Vibrio parahaemolyticus* CAUSANTE DE LA AHPND

3.2.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

No se observaron halos de inhibición de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* en ninguna de las réplicas de los tratamientos evaluados mediante antibiogramas, mostrando que los extractos crudos no presentaron características antimicrobianas. Por el contrario, todas las réplicas del control positivo (florfenicol 99% a 70 ppm) presentaron halos de inhibición de 22 mm, confirmando la susceptibilidad de la cepa patógena a este antibiótico. En el mismo sentido, el crecimiento de la cepa patógena tratada con los extractos crudos de *P. gymnospora* y *S. natans* no fue significativamente inferior al control positivo durante la fase exponencial (0 – 12 h), excepto a las cuatro horas de incubación, cuando los crecimientos bacterianos en los tratamientos a 0.14 ppm y 1.4 ppm del extracto crudo de *P. gymnospora*, y a 0.14 ppm del extracto crudo de *S. natans*, fueron significativamente inferiores con respecto al control positivo (Gráfico 15, Tabla IX). En general, en la fase estacionaria, el crecimiento bacteriano de los tratamientos de *P. gymnospora* y *S. natans* fue significativamente inferior al control positivo (Gráfico 15, Tabla IX). En tanto que, el crecimiento bacteriano de los tratamientos con extractos crudos de *I. galbana* y *T. weissflogii* no fue significativamente inferior al control positivo a ninguna de las concentraciones y tiempo evaluados, excepto a las 16 y 22 horas de incubación en los tratamientos de los extractos crudos de *I. galbana* (Gráfico 16, Tabla IX).

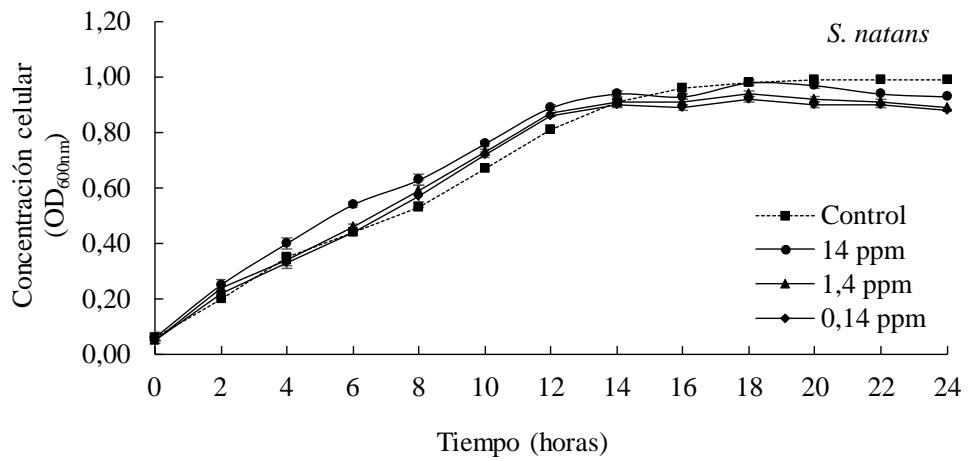
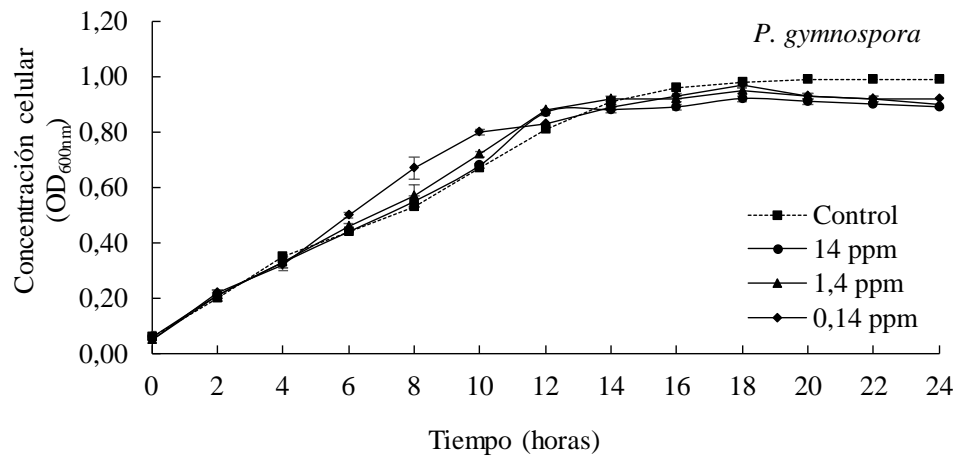


Gráfico 15. Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas *P. gymnospora* y *S. natans*.

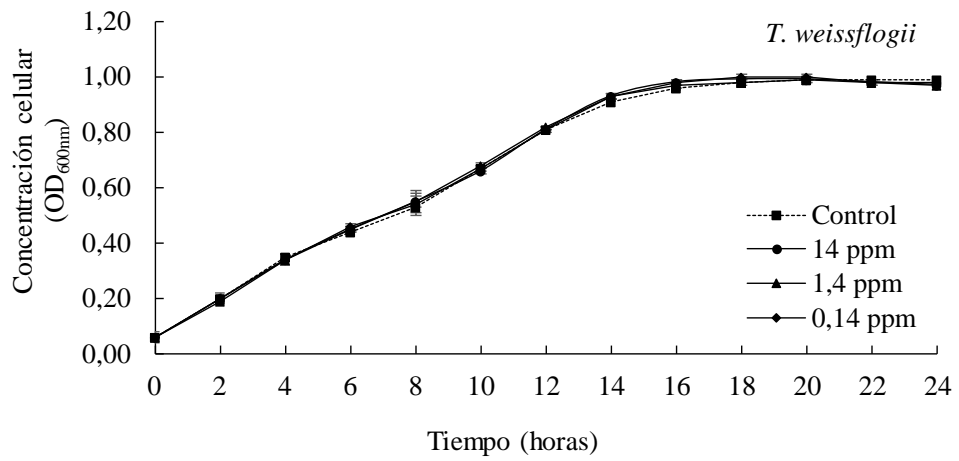
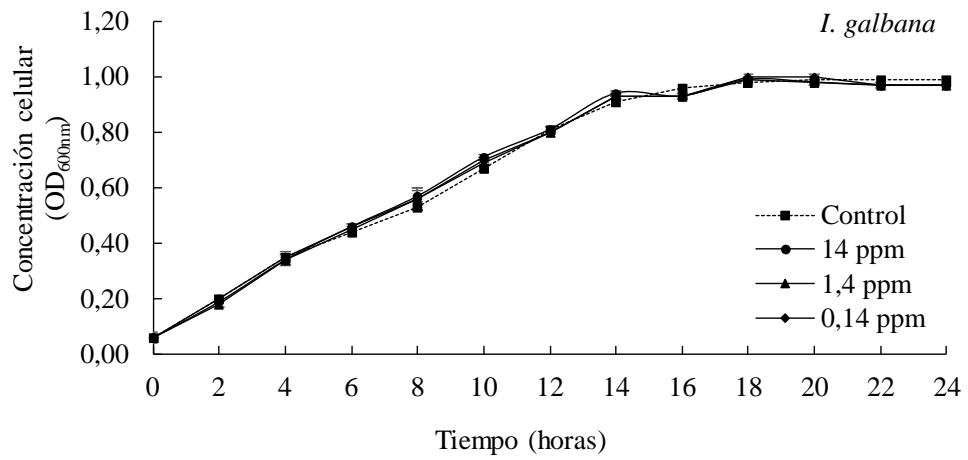


Gráfico 16. Curvas de crecimiento (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas *I. galbana* y *T. weissflogii*.

Tabla IX. Crecimiento bacteriano ($OD_{600\text{ nm}}$, promedio \pm error estándar) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 expuesta a tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Control positivo (bacteria no tratada). Para cada columna letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (10 h y 12 h).

Tipo de extracto crudo	Concentración (ppm)	Tiempo (horas)					
		2	4	6	8	10	12
<i>P. gymnospora</i>	0.14	0.215 \pm 0.011 abc	0.318 \pm 0.004 a	0.495 \pm 0.008 b	0.674 \pm 0.017 c	0.799 \pm 0.008 b	0.827 \pm 0.009 a
	1.4	0.206 \pm 0.017 ab	0.325 \pm 0.004 ab	0.464 \pm 0.007 a	0.573 \pm 0.012 bc	0.720 \pm 0.022 ab	0.884 \pm 0.015 a
	14	0.214 \pm 0.014 abc	0.330 \pm 0.009 abc	0.445 \pm 0.012 a	0.548 \pm 0.017 ab	0.677 \pm 0.018 ab	0.865 \pm 0.017 a
<i>S. natans</i>	0.14	0.219 \pm 0.014 bc	0.325 \pm 0.014 ab	0.445 \pm 0.013 a	0.573 \pm 0.022 bc	0.720 \pm 0.016 ab	0.860 \pm 0.010 a
	1.4	0.240 \pm 0.012 cd	0.337 \pm 0.015 abcd	0.457 \pm 0.016 a	0.591 \pm 0.026 c	0.727 \pm 0.029 ab	0.869 \pm 0.018 a
	14	0.253 \pm 0.033 d	0.398 \pm 0.014 e	0.537 \pm 0.018 c	0.633 \pm 0.032 d	0.759 \pm 0.039 ab	0.892 \pm 0.011 a
<i>I. galbana</i>	0.14	0.199 \pm 0.009 ab	0.354 \pm 0.012 d	0.461 \pm 0.005 a	0.561 \pm 0.014 abc	0.697 \pm 0.015 ab	0.797 \pm 0.018 a
	1.4	0.185 \pm 0.012 a	0.343 \pm 0.005 bcd	0.454 \pm 0.007 a	0.556 \pm 0.017 abc	0.691 \pm 0.018 ab	0.803 \pm 0.038 a
	14	0.190 \pm 0.007 ab	0.342 \pm 0.008 bcd	0.462 \pm 0.006 a	0.567 \pm 0.013 abc	0.712 \pm 0.017 ab	0.813 \pm 0.009 a
<i>T. weissflogii</i>	0.14	0.196 \pm 0.014 ab	0.339 \pm 0.009 bcd	0.461 \pm 0.018 a	0.538 \pm 0.014 ab	0.672 \pm 0.010 ab	0.815 \pm 0.011 a
	1.4	0.190 \pm 0.015 ab	0.336 \pm 0.007 abcd	0.452 \pm 0.011 a	0.546 \pm 0.020 ab	0.675 \pm 0.018 ab	0.817 \pm 0.016 a
	14	0.197 \pm 0.012 ab	0.336 \pm 0.009 abcd	0.452 \pm 0.015 a	0.553 \pm 0.011 ab	0.661 \pm 0.009 a	0.815 \pm 0.016 a
Control positivo		0.195 \pm 0.013 ab	0.346 \pm 0.012 cd	0.442 \pm 0.018 a	0.529 \pm 0.020 a	0.674 \pm 0.050 ab	0.806 \pm 0.039 a

Tipo de extracto crudo	Concentración (ppm)	Tiempo (horas)					
		14	16	18	20	22	24
<i>P. gymnospora</i>	0.14	0.885 ± 0.009 a	0.934 ± 0.017 c	0.973 ± 0.012 d	0.925 ± 0.008 b	0.915 ± 0.011 ab	0.916 ± 0.007 cd
	1.4	0.915 ± 0.003 bcd	0.921 ± 0.005 bc	0.947 ± 0.006 c	0.927 ± 0.005 b	0.917 ± 0.017 b	0.904 ± 0.012 bc
	14	0.885 ± 0.010 a	0.892 ± 0.006 a	0.920 ± 0.006 a	0.910 ± 0.007 ab	0.904 ± 0.014 ab	0.893 ± 0.005 ab
<i>S. natans</i>	0.14	0.895 ± 0.009 ab	0.894 ± 0.008 a	0.924 ± 0.015 ab	0.903 ± 0.011 a	0.897 ± 0.014 a	0.877 ± 0.004 a
	1.4	0.910 ± 0.007 bc	0.909 ± 0.007 ab	0.943 ± 0.014 bc	0.917 ± 0.014 ab	0.911 ± 0.012 ab	0.888 ± 0.010 ab
	14	0.937 ± 0.016 e	0.933 ± 0.019 c	0.985 ± 0.010 def	0.966 ± 0.014 c	0.941 ± 0.033 c	0.926 ± 0.015 d
<i>I. galbana</i>	0.14	0.933 ± 0.018 de	0.932 ± 0.007 c	1.001 ± 0.002 f	0.998 ± 0.005 d	0.972 ± 0.009 d	0.971 ± 0.009 ef
	1.4	0.929 ± 0.015 cde	0.927 ± 0.007 bc	0.988 ± 0.006 def	0.984 ± 0.006 cd	0.968 ± 0.012 d	0.973 ± 0.007 ef
	14	0.939 ± 0.005 e	0.932 ± 0.009 c	0.988 ± 0.009 def	0.984 ± 0.009 cd	0.967 ± 0.007 d	0.970 ± 0.008 ef
<i>T. weissflogii</i>	0.14	0.929 ± 0.008 cde	0.975 ± 0.007 d	0.996 ± 0.007 ef	0.997 ± 0.008 d	0.981 ± 0.014 de	0.975 ± 0.005 ef
	1.4	0.926 ± 0.009 cde	0.971 ± 0.013 d	0.984 ± 0.015 def	0.986 ± 0.016 d	0.980 ± 0.015 de	0.967 ± 0.010 ef
	14	0.931 ± 0.011 cde	0.976 ± 0.005 d	0.986 ± 0.006 def	0.987 ± 0.009 d	0.977 ± 0.012 de	0.966 ± 0.012 e
Control positivo		0.914 ± 0.014 bcd	0.964 ± 0.009 d	0.978 ± 0.012 de	0.990 ± 0.010 d	0.991 ± 0.013 e	0.985 ± 0.009 f

3.2.2 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE FACTORES DE VIRULENCIA DE LA CEPA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

3.2.2.1 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

La formación de EPS no disminuyó con respecto al control en ninguno de los extractos crudos, observándose en forma predominante incrementos significativos a algunas concentraciones comparados con el control positivo (Gráfico 17).

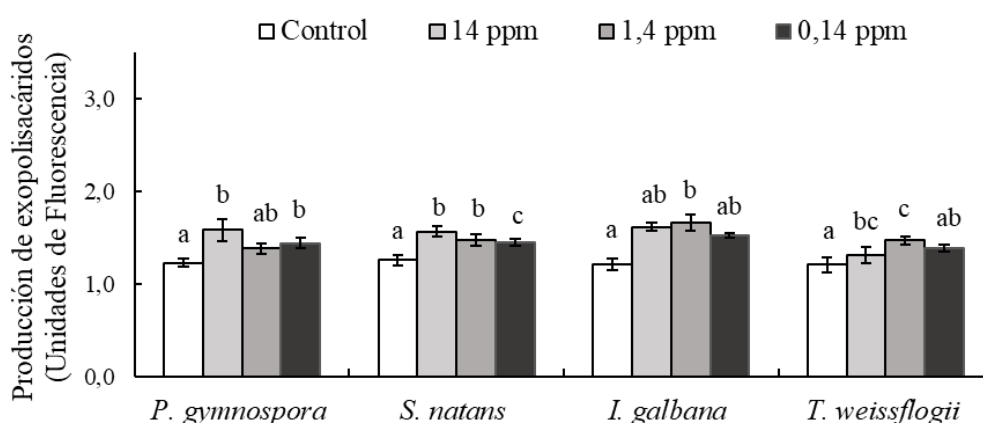


Gráfico 17. Producción de exopolisacáridos (promedio \pm error estándar, $n = 6$, \square_{exc} 405 nm, \square_{em} 500 nm) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Control (control positivo, bacteria no tratada). Para cada tipo de extracto letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía (*P. gymnospora* e *I. galbana*) y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (*S. natans* y *T. weissflogii*).

3.2.2.2 NIVELES DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Se observó una reducción significativa en los niveles de formación de biopelículas de la cepa patógena cuando fue expuesta a la mayor concentración evaluada (14 ppm) de los

extractos *S. natans*, *I. galbana* y *T. weissflogii* (Gráfico 18). En tanto que, la producción de biopelículas de la cepa patógena no disminuyó significativamente a ninguna de las concentraciones evaluadas de *P. gymnospora* (Gráfico 18). En particular, ciertos tratamientos de los extractos de macroalgas (*P. gymnospora*: 14 ppm y 0.14 ppm, y *S. natans*: 0.14 ppm) y de la microalga *I. galbana* a 0.14 ppm mostraron una capacidad superior para producir biopelículas en comparación con el control positivo (Gráfico 18).

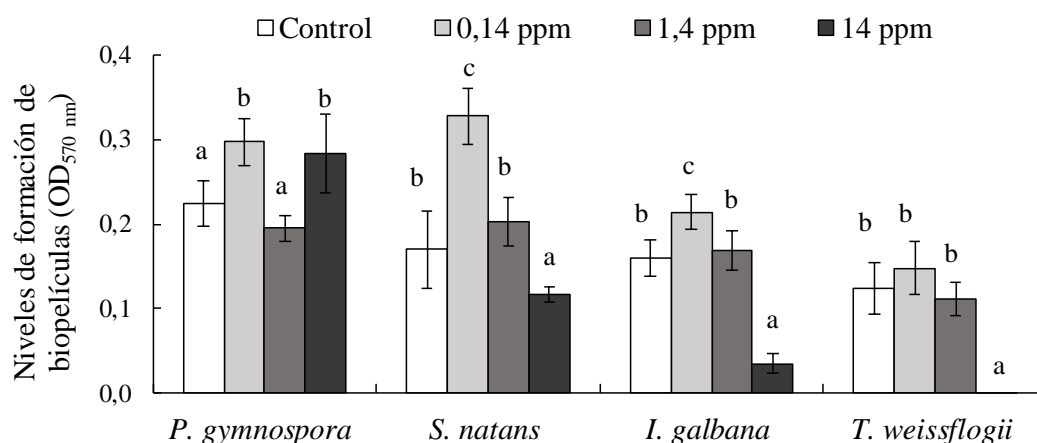


Gráfico 18. Niveles de formación de biopelículas (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Tinción con cristal violeta (0.4%). Control (control positivo, bacteria no tratada). Para cada tipo de extracto letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

3.2.2.3 MOTILIDAD DE ENJAMBRE

Las pendientes de las curvas de motilidad de enjambre fueron significativamente inferiores comparadas con el control positivo en los tratamientos de la bacteria patógena tratada con los extractos crudos de *P. gymnospora* (0.14 ppm y 14.0 ppm) (Gráfico 19, Tabla I0). Particularmente, la mayor concentración de *P. gymnospora* (14 ppm) indujo la mínima

motilidad (91% de reducción de la pendiente comparado con la del control positivo), siendo inclusive significativamente menor comparada con el resto de los tratamientos (Gráfico 19, Tabla I0). Las pendientes de la motilidad de enjambre de la bacteria patógena tratada con los extractos crudos de *S. natans* no mostraron diferencias significativas comparadas con el control positivo, a ninguna de las concentraciones evaluadas (Gráfico 19, Tabla I0). Sin embargo, la motilidad de la bacteria patógena tratada con los extractos crudos de *I. galbana* se redujo significativamente con relación al control, a todas las concentraciones evaluadas, con una reducción de la pendiente de motilidad de entre 18 y 26% (Gráfico 20, Tabla X). Por otro lado, solamente la concentración más alta de *T. weisflogii* (14 ppm) redujo significativamente la motilidad (28% de reducción comparado con el control positivo) de la bacteria patógena (Gráfico 20, Tabla I0).

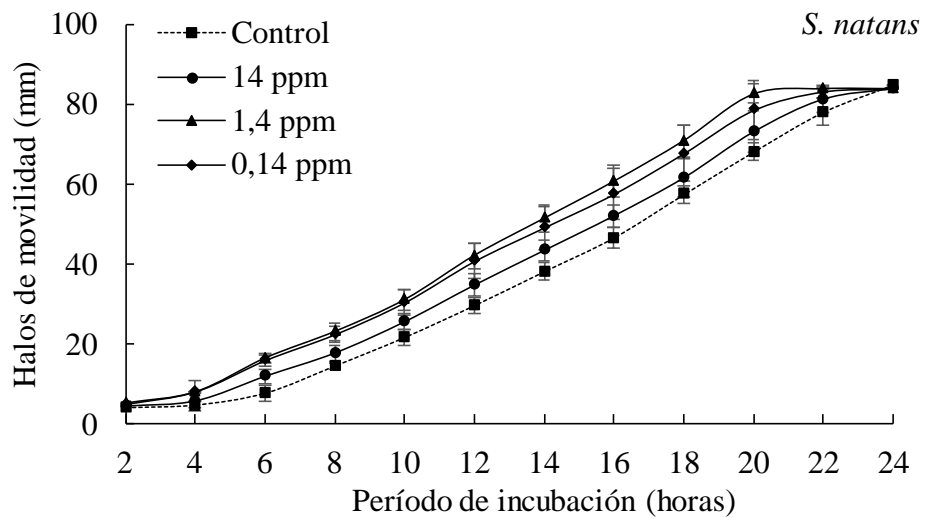
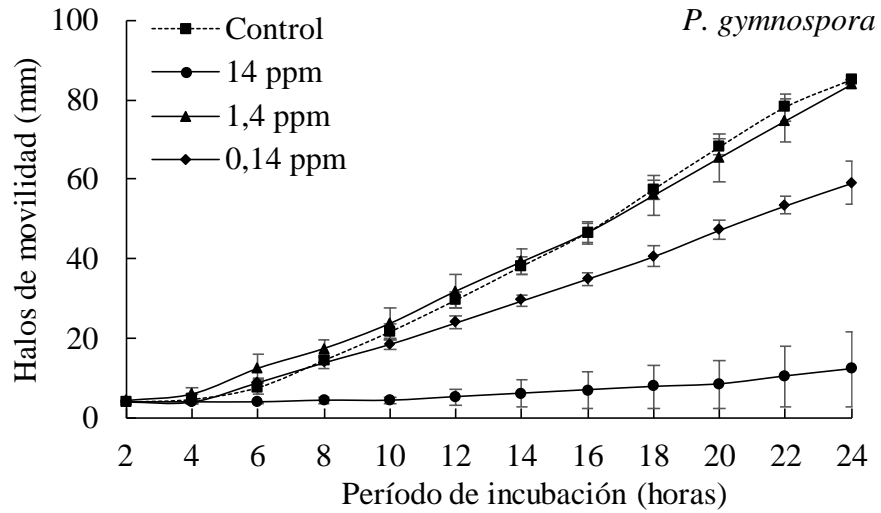


Gráfico 19. Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas. Control (control positivo, bacteria no tratada).

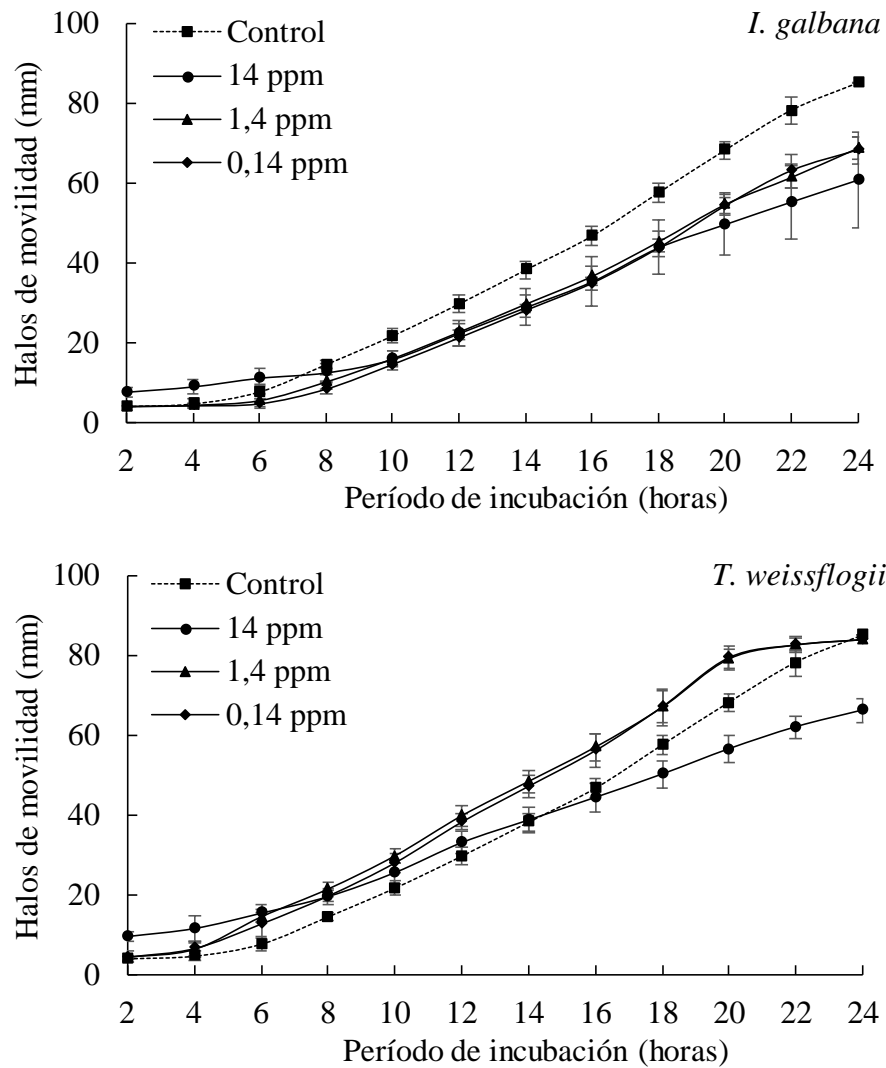


Gráfico 20. Diámetros de los halos de motilidad de enjambre (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas. Control (control positivo, bacteria no tratada).

Tabla X. Motilidad de enjambre de la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 tratada con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas, y estimada con las pendientes (promedio \pm error estándar, $n = 6$) de la fase exponencial linealizada de las curvas de motilidad (Gráficos 19 y 20). Control (control positivo, bacteria no tratada). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre pendientes según ANOVA de una vía.

Tipos de extracto crudo	Concentración (ppm)	Pendiente (mm/hora)
<i>P. gymnospora</i>	0.14	2.70 ± 0.06^b
	1.4	3.85 ± 0.10^{de}
	14	0.38 ± 0.22^a
<i>S. natans</i>	0.14	4.52 ± 0.22^{ef}
	1.4	4.82 ± 0.10^f
	14	4.39 ± 0.19^{ef}
<i>I. galbana</i>	0.14	3.50 ± 0.05^{cd}
	1.4	3.50 ± 0.06^{cd}
	14	3.17 ± 0.28^{bcd}
<i>T. weissflogii</i>	0.14	4.73 ± 0.14^f
	1.4	4.56 ± 0.14^{ef}
	14	3.08 ± 0.11^{bc}
Control positivo		4.27 ± 0.06^{ef}

3.2.4 ANÁLISIS DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS EN *P. vannamei*

Ninguno de los extractos crudos de microalgas y de macroalgas mostraron efectos tóxicos, ni para hemocitos (prueba *in vitro* de MTT, Tabla XI), ni para postlarvas de camarón (prueba *in vivo* de desafío, Tabla I2), a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Tabla XI. Resultados de la prueba *in vitro* de toxicidad de MTT en hemocitos de camarón *P. vannamei* tratados con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas y microalgas. Valores de unidades de absorbancia medido a OD_{620 nm} están expresados como promedio (\pm error estándar, n = 6). Control positivo (hemocitos no tratados). Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0.05$) según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Tipo de extracto crudo	Concentración (ppm)	Unidades de absorbancia
<i>P. gymnospora</i>	0.14	0.074 \pm 0.011 ^a
	1.4	0.096 \pm 0.018 ^a
	14	0.074 \pm 0.009 ^a
<i>S. natans</i>	0.14	0.598 \pm 0.164 ^a
	1.4	0.317 \pm 0.157 ^a
	14	0.214 \pm 0.042 ^a
<i>I. galbana</i>	0.14	0.439 \pm 0.077 ^a
	1.4	0.541 \pm 0.142 ^a
	14	0.254 \pm 0.060 ^a
<i>T. weissflogii</i>	0.14	0.108 \pm 0.029 ^a
	1.4	0.101 \pm 0.020 ^a
	14	0.079 \pm 0.003 ^a
Control positivo		0.084 \pm 0.030 ^a

Tabla XII. Resultados de la prueba *in vivo* de toxicidad de extractos crudos de macroalgas y microalgas en postlarvas de camarón *P. vannamei* (PL9). Valores de supervivencia están expresados como promedio (\pm error estándar). Control (postlarvas de camarón sin exposición a ningún extracto). Letras iguales indican diferencias no significativas ($p > 0.05$) según análisis de ANOVA de una vía.

Tipo de extracto crudo	Concentración (ppm)	Supervivencia (%)
<i>P. gymnospora</i>	1.4	87.3 \pm 5.0 ^a
	14	90.0 \pm 2.6 ^a
<i>S. natans</i>	1.4	92.0 \pm 1.9 ^a
	14	96.0 \pm 1.9 ^a
<i>I. galbana</i>	1.4	87.3 \pm 3.8 ^a
	14	92.7 \pm 2.2 ^a
<i>T. weissflogii</i>	1.4	92.7 \pm 2.7 ^a
	14	84.7 \pm 2.3 ^a
Control		90.0 \pm 4.2 ^a

3.2.5 PRUEBA DE DESAFÍO DE POSTLARVAS DE CAMARÓN *P. vannamei* TRATADAS CON EXTRACTOS CRUDOS E INFECTADAS CON LA BACTERIA PATÓGENA *V. parahaemolyticus*

Las postlarvas de camarón tratadas con las concentraciones más bajas (0.14 ppm) de las microalgas *T. weissflogii* e *I. galbana* mostraron las más altas supervivencias acumuladas al finalizar el desafío experimental ($90.6 \pm 4.2\%$ y $88.3 \pm 3.1\%$, respectivamente), siendo significativamente superiores al control positivo ($66.0 \pm 2.5\%$, postlarvas infectadas y no tratadas con ningún tipo de extracto (Gráficos 21 y 22, Tabla I3). Así, las supervivencias acumuladas de las postlarvas de camarón de estos dos tratamientos fueron 24.6% y 22.3% superiores al control positivo (Gráfico 22, Tabla I3). En forma consistente, las postlarvas de estos dos tratamientos, así como las postlarvas que recibieron administración de *P. gymnospora* a 14 ppm, presentaron los tiempos promedios de supervivencias más altos, siendo también significativamente superiores al control positivo (Gráficos 21 y 22, Tabla I3). Los tiempos promedios de supervivencia de las postlarvas de camarón tratadas con la siguiente concentración más baja (1.4 ppm) de los extractos crudos de las dos microalgas también fueron significativamente superiores comparadas con el control positivo (Gráfico 22, Tabla I3). En el mismo sentido, los tiempos promedios de supervivencia de las postlarvas que recibieron administración a 1.4 ppm de *P. gymnospora*, así como las postlarvas de camarón tratadas con las dos concentraciones más altas de *S. natans* también tuvieron tiempos promedios de supervivencia significativamente superiores a control positivo (Gráficos 21, Tabla XII). Al finalizar el desafío experimental la supervivencia de las postlarvas del control negativo fue $94.4 \pm 1.1 \%$

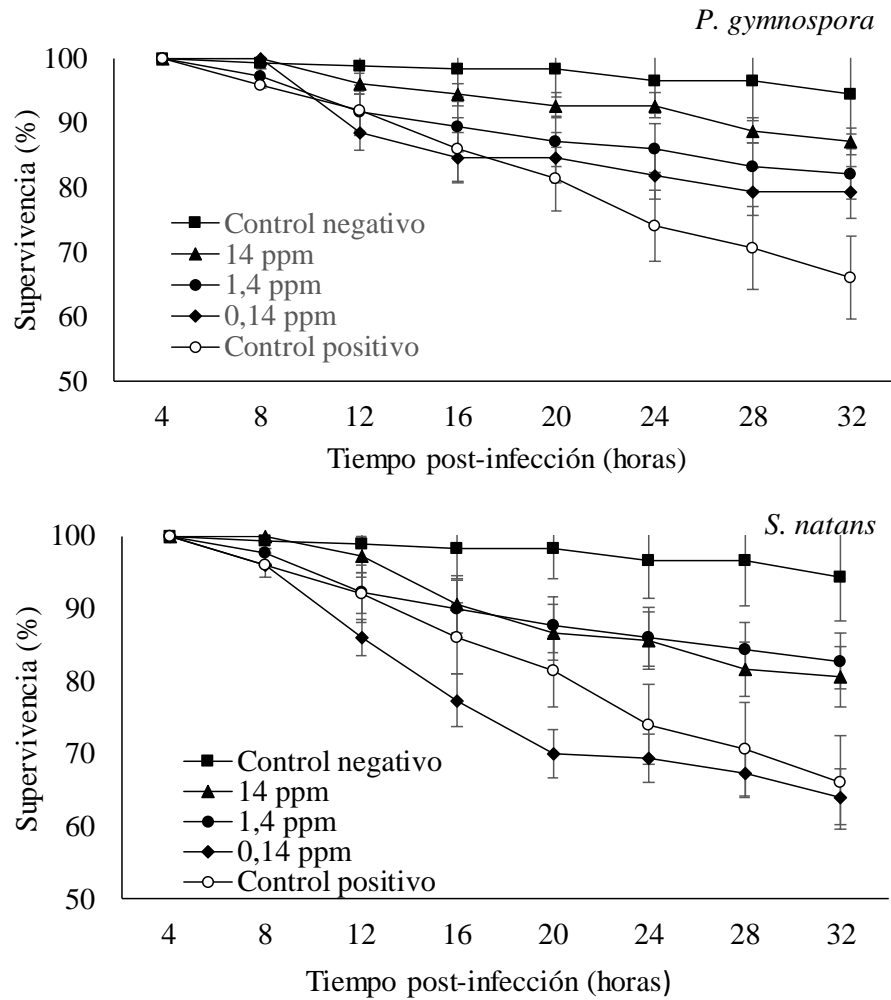


Gráfico 21. Supervivencia acumulada de postlarvas *P. vannamei* tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de macroalgas (PL 11 - PL12) e infectadas (PL 13) con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2. Control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas). Control negativo (postlarvas no tratadas ni infectadas).

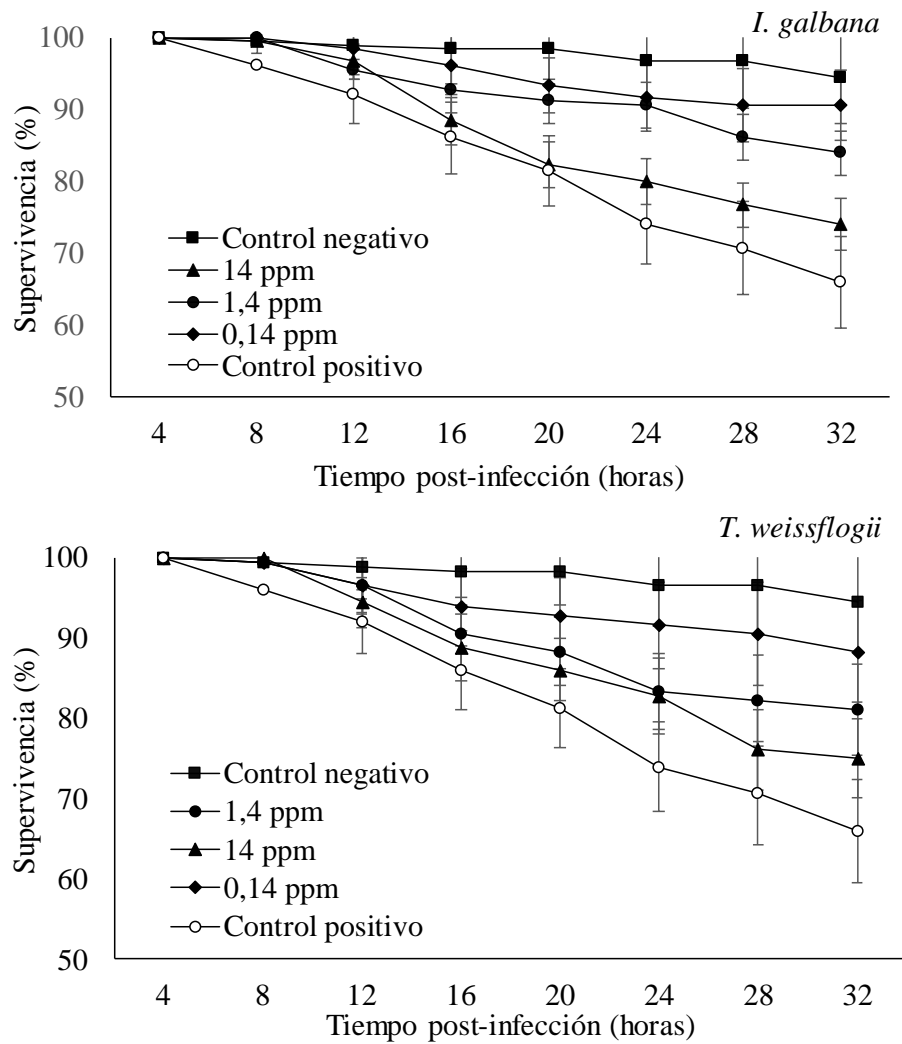


Gráfico 22. Supervivencia acumulada de postlarvas *P. vannamei* tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas (PL 11 - PL12) e infectadas (PL 13) con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2. Control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas). Control negativo (postlarvas no tratadas ni infectadas).

Tabla XIII. Tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada a 32 horas post infección de postlarvas *P. vannamei* (PL 14) tratadas con tres concentraciones de extractos crudos de microalgas y macroalgas (PL11 – PL12) e infectadas con la bacteria patógena *V. parahaemolyticus* cepa Ba94C2 (PL13). Control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas). Letras distintas en el tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según análisis de supervivencia de Kaplan-Meier y ANOVA de una vía, respectivamente.

Tipo de extracto crudo	Concentración (ppm)	Tiempo promedio de supervivencia (horas)	Supervivencia acumulada (%)
<i>P. gymnospora</i>	0.14	31.6 ± 0.7 abc	79.3 ± 7.8 ab
	1.4	32.7 ± 0.6 cd	82.2 ± 2.0 ab
	14	34.1 ± 0.4 d	82.2 ± 3.7 ab
<i>S. natans</i>	0.14	30.6 ± 0.8 ab	64.0 ± 7.1 ab
	1.4	32.8 ± 0.6 cd	82.8 ± 3.6 ab
	14	32.9 ± 0.5 bcd	80.3 ± 5.6 ab
<i>I. galbana</i>	0.14	34.1 ± 0.4 d	88.3 ± 3.1 b
	1.4	32.9 ± 0.5 bcd	81.1 ± 5.3 ab
	14	31.4 ± 0.6 ab	82.0 ± 4.6 ab
<i>T. weissflogii</i>	0.14	34.4 ± 0.4 d	90.6 ± 4.2 b
	1.4	33.6 ± 0.5 cd	83.9 ± 3.8 ab
	14	31.9 ± 0.6 abc	73.9 ± 3.7 ab
Control positivo		30.6 ± 0.7 a	66.0 ± 2.5 a

Los resultados del análisis de PCR mostraron que las postlarvas del lote inicial fueron negativas para la presencia de los genes PirAB causantes de AHPND. En tanto que todas las muestras de los tratamientos y control infectados fueron positivas, mostrando la infección por *V. parahaemolyticus* causante de AHPND; mientras que el control negativo mostró ausencia de infección. El anexo 2 muestra los resultados del análisis histopatológico. Las postlarvas del lote inicial no presentaron lesiones histopatológicas compatibles con AHPND, ni con ninguna otra enfermedad emergente de camarón (Anexo 2). La mayoría de las postlarvas que recibieron tratamiento con *P. gymnospora*, especialmente a 14 ppm mostraron, tanto túbulos del hepatopáncreas en condiciones normales (flecha verde, Gráfico

23a y 23b), como túbulos hipertrofiados en grados leve y medio (flecha azul, Gráficos 23a y 23b). La mayoría de las postlarvas tratadas con *S. natans* presentaron una severa necrosis de los túbulos del hepatopáncreas, característicos de la fase de transición (fase intermedia) de AHPND (flecha negra, Gráficos 23 c y 23d). Mientras que las postlarvas tratadas con *I. galbana*, aunque mostraron lesiones típicas de AHPND en grado leve, también presentaron túbulos hepatopancreáticos hipertrofiados (flecha azul Gráfico 23e y 23f) y necrosis en el epitelio del intestino (flecha roja, Gráficos 23e y 23f).

Las postlarvas tratadas con *T. weissflogii*, a concentraciones de 14 ppm, y 1.4 ppm mostraron lesiones típicas de AHPND. En tanto que, la mayoría de las postlarvas tratadas con 0.14 ppm de *T. weissflogii* no mostraron lesiones de la enfermedad, exhibiendo más bien una predominancia de hipertrofia en los túbulos del hepatopáncreas con diferentes grados de afectación (flechas azul, Gráficos 24g y 24h). El análisis histopatológico también confirmó la afectación por AHPND en las postlarvas del control positivo, con severas necrosis en los túbulos del hepatopáncreas, provocando la pérdida completa de la estructura de los túbulos, principal característica de la fase terminal de la enfermedad (Gráficos 24i y 24j). Además, la mayoría de las postlarvas del control positivo también presentaron otras lesiones típicas de la fase terminal de la enfermedad: infiltraciones hemocíticas, melanización y nódulos hemocíticos, causadas por infecciones bacterianas (Gráficos 24i y 24j).

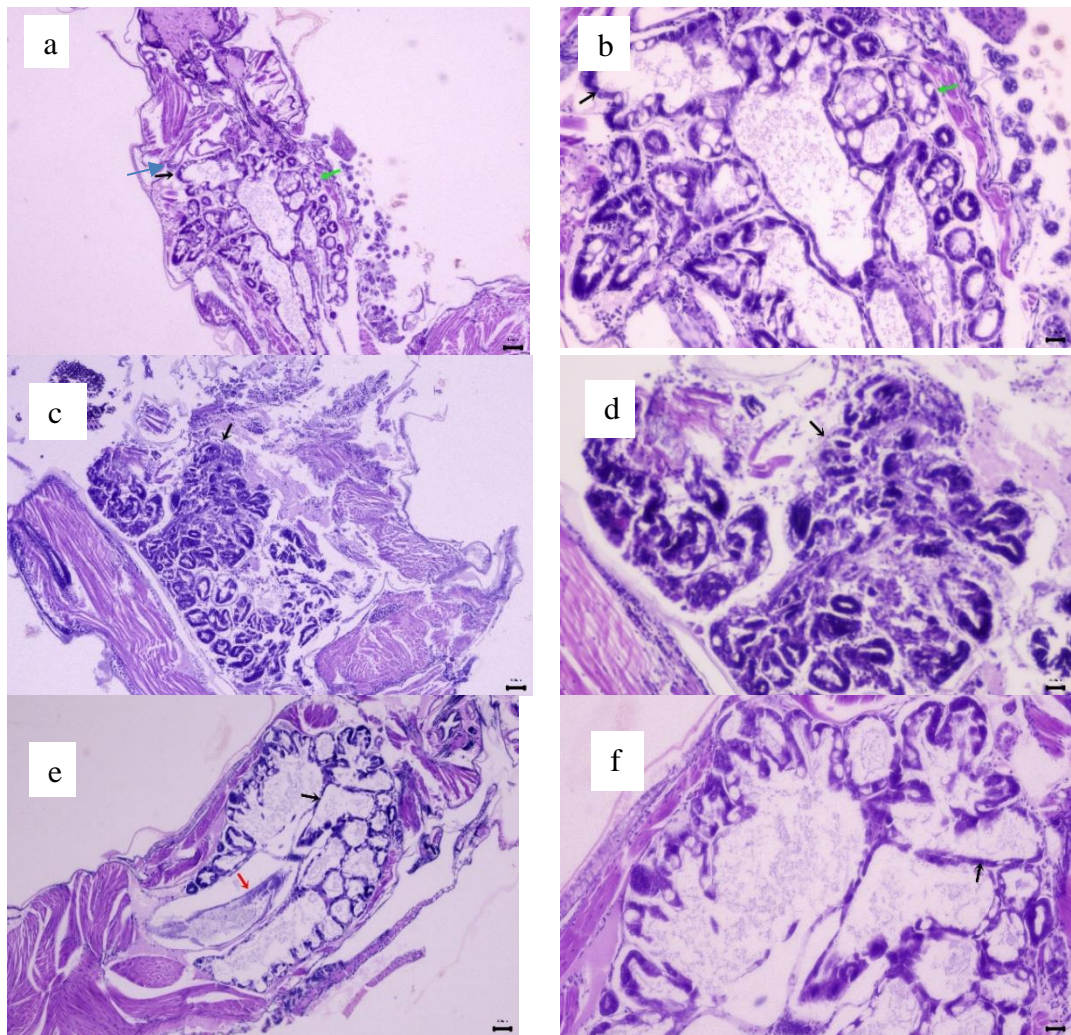


Gráfico 23. Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas *P. vannamei* sobrevivientes al desafío. Postlarvas tratadas con: extracto crudo de *P. gymnospora* (a) 4X, (b)10X; extracto crudo de *S. natans* (c) 4X, (d)10X; extracto crudo de *I. galbana* (e) 4X, (f)10X.

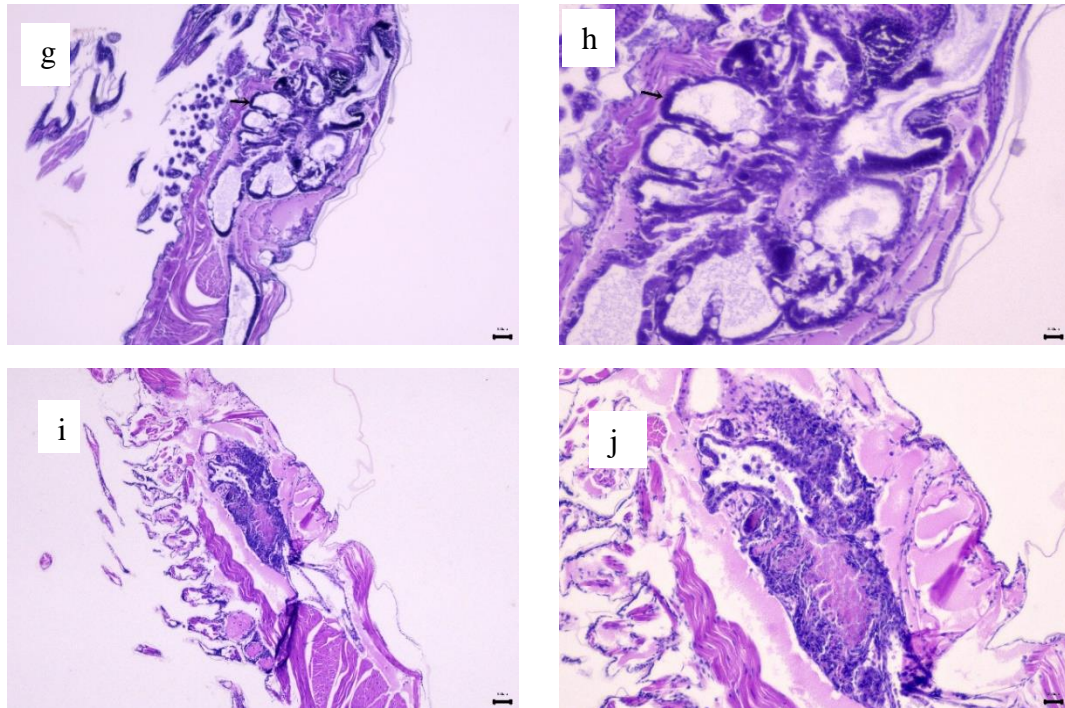


Gráfico 24. Secciones histológicas teñidas con soluciones de hematoxilina y eosina de postlarvas *P. vannamei* sobrevivientes al desafío. Postlarvas tratadas con: extracto crudo de *T. weissflogii* (g) 4X, (h)10X, y control positivo (i) 4X, (j)10X.

3.2.6 EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE MACROALGAS Y MICROALGAS SOBRE LA ACUMULACIÓN RELATIVA DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE EN POST LARVAS *P. vannamei*

Se observó un efecto significativo de la administración de los extractos crudos al cultivo de las postlarvas de camarón sobre la expresión de los genes de la respuesta inmune (Tabla XIV). Así, la expresión del péptido antimicrobiano peneidina (Pen-4) fue significativamente superior en el tratamiento de *I. galbana* a la concentración más baja (0.14 ppm), mientras que en el resto de los tratamientos se observó una reducción significativa comparado con el control positivo (Tabla XIV). No se observaron diferencias significativas en la expresión del péptido antimicrobiano crustina en los tratamientos de extractos crudos en comparación con el control positivo, excepto en los tratamientos de administración de extractos crudos de *I. galbana* a 0.14 ppm y 1.4 ppm, donde se evidenciaron reducciones significativas comparadas con el control positivo (Tabla XIV).

Por otro lado, las expresiones relativas de los genes proPO-I y proPO-II, en las postlarvas que recibieron administración con *T. weissflogii* a la concentración más baja (0.14 ppm) fueron notablemente superiores comparadas con el control positivo, estando entre 19.20 y 305.76 veces más expresados en comparación con el control positivo (Tabla XIV). Mientras que no se evidenciaron diferencias significativas en las expresiones de proPO-I en el resto de los tratamientos comparado con el control positivo (Tabla XIV). Además, la administración de *P. gymnospora* (tres concentraciones evaluadas), *S. natans* (0.14 ppm y 1.4 ppm), *I. galbana* (0.14 ppm) y *T. weissflogii* (14 ppm) produjeron incrementos significativo en la expresión de proPO-II comparado con el control positivo (Tabla XIV).

Tabla XIV. Expresión diferencial de genes de la respuesta inmune (promedios \pm desviación estándar, n = 3) de postlarvas *P. vannamei* (relativa al gen housekeeping β -actin) que recibieron administración de extractos crudos relativa al control positivo (postlarvas no tratadas pero infectadas). Para cada gen, letras distintas indican diferencias significativas a $p < 0.05$ según ANOVA de una vía.

Tipos de extracto crudo	Concentración (ppm)	<i>Pen4</i>	<i>Crustin</i>	<i>ProPO-I</i>	<i>ProPO-II</i>
<i>P. gymnospora</i>	0.14	0.00 \pm 0.00 ^a	0.94 \pm 0.29 ^b	2.75 \pm 0.43 ^a	5.51 \pm 1.01 ^{fg}
	1.4	0.00 \pm 0.00 ^a	1.43 \pm 0.17 ^{bc}	3.13 \pm 0.05 ^a	7.49 \pm 0.13 ^{gh}
	14	0.00 \pm 0.00 ^a	1.19 \pm 0.10 ^{bc}	2.55 \pm 0.2 ^a	2.7 \pm 1.06 ^{def}
<i>S. natans</i>	0.14	0.00 \pm 0.00 ^a	0.29 \pm 0.01 ^b	1.45 \pm 0.15 ^a	3.09 \pm 0.98 ^{ef}
	1.4	0.00 \pm 0.00 ^a	0.90 \pm 0.96 ^b	2.55 \pm 0.63 ^a	15.23 \pm 1.31 ^h
	14	0.00 \pm 0.00 ^a	0.48 \pm 0.03 ^b	1.46 \pm 0.18 ^a	2.27 \pm 1.53 ^{cde}
<i>I. galbana</i>	0.14	2.61 \pm 0.26 ^d	0.00 \pm 0.00 ^a	1.47 \pm 0.09 ^a	2.56 \pm 0.32 ^{def}
	1.4	0.69 \pm 0.14 ^b	0.00 \pm 0.00 ^a	0.67 \pm 0.14 ^a	1.18 \pm 0.05 ^{cd}
	14	0.00 \pm 0.00 ^a	0.40 \pm 0.05 ^b	0.53 \pm 0.07 ^a	0.43 \pm 0.05 ^b
<i>T. weissflogii</i>	0.14	0.07 \pm 0.02 ^a	10.31 \pm 9.56 ^c	19.2 \pm 12.42 ^b	305.76 \pm 24.77 ⁱ
	1.4	0.00 \pm 0.00 ^a	0.88 \pm 0.51 ^b	3.01 \pm 0.39 ^a	0.08 \pm 0.04 ^a
	14	0.00 \pm 0.00 ^a	0.34 \pm 0.24 ^b	0.71 \pm 0.56 ^a	4.66 \pm 0.44 ^{fg}
Control positivo		1.01 \pm 0.19 ^c	1.00 \pm 0.07 ^{bc}	1.01 \pm 0.17 ^a	1.00 \pm 0.06 ^c

3.2.7 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE EXTRACTOS CRUDOS DE MICROALGAS Y MACROALGAS POR ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La caracterización de los componentes de los extractos crudos de macro y microalgas marinas realizado mediante CG-EM mostró una gran variedad de compuestos presentes en los extractos de macro y microalgas, como se detalla en las Tablas XV y XVI. En *T. weissflogii*, se observó una variedad de compuestos, incluidos hidrocarburos alifáticos (terpenoides), ácidos orgánicos, aminoácidos y alcoholes. En particular, hubo una presencia predominante (en términos de porcentaje de área) de compuestos como el éster etílico del éster etílico del ácido 9-hexadecanoico ($1.28 \pm 0.23\%$), éster etílico del ácido

hexadecanoico ($1.35 \pm 0.16\%$), ácido cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoico ($1.76 \pm 0.57\%$), ácido tetradecanoico ($2.02 \pm 0.12\%$) y ácido cis-9-hexadecenoico ($5.05 \pm 0.94\%$). Además, los componentes menores (cobertura $\leq 1\%$) incluyeron ácido 2-amino-3-metilbutanoico ($0.35 \pm 0.01\%$), ácido (2S)-pirrolidina-2-carboxílico ($0.26 \pm 0.02\%$), entre otros.

En cambio, *I. galbana* exhibió la mayor diversidad de compuestos químicos entre los extractos. Se observaron hidrocarburos alifáticos (terpenoides), compuestos halogenados, aminoácidos, ésteres, ácidos grasos, azúcares (carbohidratos) y compuestos aromáticos. El compuesto con mayor área de cobertura fue ácido tetradecanoico ($3.24 \pm 0.16\%$), seguido de ácido 2-(palmitoiloxi) propanoico ($2.39 \pm 0.07\%$), ácido trans-13-octadecenoico ($2.14 \pm 0.08\%$), ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoico ($1.93 \pm 0.05\%$). Además, se evidenció la presencia de heneicosano ($1.18 \pm 0.05\%$) y ácido 1H-indol-1-acético ($1.01 \pm 0.04\%$).

Dentro de las macroalgas, el extracto crudo de *S. natans* presentó hidrocarburos alifáticos, ácidos grasos, compuestos aromáticos y ácidos grasos, con compuestos notables que incluyen, octadecanoico ($4.17 \pm 0.12\%$), ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotriéster de ácido octadecanoico ($2.99 \pm 0.32\%$), 10-etil-1,8-difenilantraceno ($2.95 \pm 0.04\%$), y ácido 2-(2-hidroxipropil), junto con otros componentes con una cobertura inferior al 1.0%.

En tanto, *P. gymnospora* exhibió grupos identificados como ácidos grasos, hidrocarburos alifáticos (terpenoides), compuestos aromáticos y esteroides, siendo los compuestos destacados: 6,10-metanonorandrost-4-eno-3,17-diona-6-metoxi ($7.67 \pm 0.27\%$), éster 1-metiletilico del ácido dodecanoico ($2.71 \pm 0.07\%$), 2,6-di-terc-butil-4-metilfenoximetanoquinona ($1.69 \pm 0.06\%$), junto con otros constituyentes con una

cobertura inferior al 1.0%. Estos resultados análisis mostraron la diversa gama de compuestos presentes en los extractos de algas marinas.

Tabla XV. Identificación de compuestos de macroalgas. El porcentaje de área (\pm DE) indica la abundancia relativa del compuesto. La asignación de las estructuras químicas se efectuó por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas Wiley. 9na edición y NIST 2011 escogiendo aquellos compuestos que presentaron más del 90% de confiabilidad.

Extracto de macroalgas	Grupo Químico	Molécula (IUPAC)	Tiempo de retención (minutos)	Porcentaje de Área \pm DE	Formula Empírica	Masa Molecular
<i>S. natans</i>	Hidrocarburos Alifáticos	2,6-dimetilundecano	10.86	0.33 \pm 0.02	C ₁₃ H ₃₀	184
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4-metildodecano	11.08	0.29 \pm 0.01	C ₁₃ H ₂₇	184
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4,6-dimetildodecano	11.88	0.38 \pm 0.03	C ₁₄ H ₂₈	198
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Tetradecano	15.66	0.22 \pm 0.01	C ₁₄ H ₂₈	198
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	2,6,10,14-tetrametilheptadecano	17.16	0.43 \pm 0.02	C ₂₁ H ₄₆	296
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	11-(1-etilpropil) heneicosano	23.67	0.40 \pm 0.01	C ₂₆ H ₅₆	366
	Ácido Graso	Ácido tetradecanoico	25.88	0.31 \pm 0.01	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
	Compuestos aromáticos	10-etil-1,8-difenilantraceno	37.09 /	2.95 \pm 0.04	C ₂₈ H ₂₅	330
	Compuestos grasos	Ácido 2-(2-hidroxi-propil) octadecanoico	38.87	4.17 \pm 0.12	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330
	Ácido Graso	Ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotriéster de ácido octadecanoico	41.69	2.99 \pm 0.32	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	358
<i>P. gymnospora</i>	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4,6-dimetildodecano	11.34	0.32 \pm 0.01	C ₁₄ H ₃₀	198
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Hexadecano	12.67	0.13 \pm 0.00	C ₁₆ H ₃₄	226
	Compuestos aromáticos	2,6-di-terc-butil-4-metilfenoximetanoquinona	17.36	1.69 \pm 0.06	C ₁₅ H ₂₂ O	218
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4-metiltetradecano	17.48	0.67 \pm 0.02	C ₁₅ H ₃₂	212
	Compuestos aromáticos	Ácido 1,3,5-triazín-2,4,6-triol	20.63	0.45 \pm 0.04	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃	129
	Ácido graso	Ácido dodecanoico, 1-metiletil éster	21.06	2.71 \pm 0.07	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	242
	Ácido graso	Ácido dodecanoico	21.66	0.06 \pm 0.01	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200
	Ácido graso	Ácido tetradecanoico	25.87	0.90 \pm 0.02	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228

Extracto de macroalgas	Grupo Químico	Molécula (IUPAC)	Tiempo de retención (minutos)	Porcentaje de Área ± DE	Formula Empírica	Masa Molecular
	Esteroides	6-metoxiesteroide 6,10-metano-norandrost-4-eno-3,17-diona	29.75	7.67 ± 0.27	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	298
	Ácido graso	Ácido heptadecanoico	31.54	0.47 ± 0.02	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Heptadecano	34.75	0.20 ± 0.02	C ₁₇ H ₃₆	240
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Octadecano	41.78	0.14 ± 0.01	C ₁₈ H ₃₆	254
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Eicosano	44.62	0.12 ± 0.01	C ₂₀ H ₄₂	282

Tabla XVI. Identificación de compuestos de microalgas. El porcentaje de área (\pm DE) indica la abundancia relativa del compuesto. La asignación de las estructuras químicas se efectuó por comparación de los espectros de masas con las bibliotecas Wiley. 9na edición y NIST 2011 escogiendo aquellos compuestos que presentaron más del 90% de confiabilidad.

Extracto de microalga	Grupo Químico	Molécula (IUPAC)	Tiempo de retención (minutos)	% Área \pm DE	Formula Empírica	Masa Molecular
<i>T. weissflogii</i>	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Tridecano	10.56	0.26 \pm 0.02	C ₁₃ H ₂₈	184
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4-metildodecano	11.09	0.17 \pm 0.02	C ₁₃ H ₂₈	184
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	1-Iodo-2-metilundecano	11.72	0.13 \pm 0.02	C ₁₂ H ₂₇ I	296
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4,6-Dimetildodecano	11.89	0.25 \pm 0.05	C ₁₄ H ₃₀	198
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	2,4-Dimetilundecano	12.12	0.60 \pm 0.10	C ₁₃ H ₂₈	184
	Aminoácido	Ácido 2-amino-3-metilbutanoico	12.84	0.35 \pm 0.01	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Hexadecano	13.01	0.10 \pm 0.01	C ₁₆ H ₃₄	226
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	1-Iodo-2-metilnonano	13.28	0.17 \pm 0.01	C ₁₀ H ₂₁ I	268
	Acido orgánico	Ácido 1-hidrox ciclohexano-1-carboxílico	13.87	0.25 \pm 0.04	C ₇ H ₁₂ O ₃	144
	Hidrocarburos Alifáticos	Tetradecano	15.66	0.15 \pm 0.03	C ₁₄ H ₃₀	198
	Aminoácido	Ácido (2S)-pirrolidina-2-carboxílico	18.48	0.26 \pm 0.02	C ₅ H ₉ NO ₂	115
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	1-yodo-2-metilundecano	20.68	0.22 \pm 0.08	C ₁₂ H ₂₅ I	296
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	2,6,10,14-tetrametilpentano	21.57	0.26 \pm 0.03	C ₂₀ H ₄₂	282
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Éster etílico del ácido tetradecanoico	24.73	0.24 \pm 0.00	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Ácido tetradecanoico	25.88	2.02 \pm 0.12	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
	Hidrocarburos Alifáticos	Ácido pentadecanoico	27.85	0.37 \pm 0.13	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Ácido etílico del ácido 9-hexadecanoico	28.31	1.28 \pm 0.23	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Ácido etílico del ácido hexadecanoico	28.75	1.35 \pm 0.16	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284

Extracto de microalga	Grupo Químico	Molécula (IUPAC)	Tiempo de retención (minutos)	% Área ± DE	Formula Empírica	Masa Molecular
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Ácido cis-9-hexadecenoico	29.33	5.05 ± 0.94	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254
	Alcohol (Terpenoids)	3,7,11,15-tetrametilhexadecan-1-ol	32.07	0.35 ± 0.09	C ₂₀ H ₄₀ O	296
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	34.62	0.43 ± 0.13	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	330
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	35.39	1.76 ± 0.57	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302
<i>I. galbana</i>	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4-metil-dodecano	11.09	0.21 ± 0.02	C ₁₃ H ₂₈	184
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	4,6-dimetil-dodecano	11.89	0.31 ± 0.00	C ₁₄ H ₃₀	198
	Aminoácido	Ácido 2-amino-3-metilbutanoico	12.85	0.28 ± 0.00	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	2-metil-tridecano	14.74	0.15 ± 0.01	C ₁₄ H ₂₀	198
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Tetradecano	15.66	0.22 ± 0.01	C ₁₄ H ₃₀	198
	Esteres	Ácido etanoico (2-phenyl-1-propenyl) éster	16.78	0.53 ± 0.07	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	176
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Pentadecano	17.38	0.21 ± 0.01	C ₁₅ H ₃₂	212
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Hexatriacontano	17.72	0.49 ± 0.03	C ₃₆ H ₇₄	507
	Aminoácido	(2S)- pirrolidina -2-carboxílico	18.48	0.30 ± 0.01	C ₅ H ₉ NO ₂	115
	Hidrocarburos Alifáticos	2-metil-pentadecano	19.64	0.15 ± 0.04	C ₁₆ H ₃₄	226
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Hexadecano	20.50	0.15 ± 0.01	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₃ .	226
	Azucares (Carbohydrates)	D-α-D-ribofuranosa	21.61	0.82 ± 0.02	C ₅ H ₁₀ O ₅	150
	Hidrocarburos Alifáticos	Octadecano	24.89	0.17 ± 0.04	C ₁₈ H ₃₈	254
	Compuesto halogenado	2-bromododecano	25.63	0.21 ± 0.06	C ₁₂ H ₂₅ Br	249
	Ácidos Grasos	Ácido tetradecanoico	25.88	3.24 ± 0.16	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228
	Compuestos aromáticos	Ácido 1H-indol-1-acético	29.31	1.01 ± 0.04	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	175
Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Heneicosano	31.12	1.18 ± 0.05	C ₂₁ H ₄₄	296	

Extracto de microalga	Grupo Químico	Molécula (IUPAC)	Tiempo de retención (minutos)	% Área ± DE	Formula Empírica	Masa Molecular
	Ácidos Grasos	Ácido 9,12-octadecadienoico	32.68	0.59 ± 0.03	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
	Ácidos Grasos	Ácido trans-13-octadecenoico	32.79	2.14 ± 0.08	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
	Compuestos fitoquímicos	2,6,10,14-tetramethylpentadecane	34.76	0.52 ± 0.01	C ₂₀ H ₄₂ O	282
	Hidrocarburos Alifáticos (Terpenoids)	Eicosano	38.12	0.71 ± 0.02	C ₂₀ H ₄₂	282
	Compuestos fitoquímicos	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	38.25	1.93 ± 0.05	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328
	Compuestos fitoquímicos	Ácido 2-(palmitoiloxi)propanoico	38.87	2.39 ± 0.07	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330

En este estudio se investigó el potencial terapéutico de dos especies de macroalgas (*P. gymnospora* y *S. natans*) y dos especies de microalgas (*I. galbana* y *T. weissflogii*) sobre postlarvas de camarón *P. vannamei* infectadas con una cepa patógena de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND. La investigación se realizó a través de dos estudios, empleando dos tipos de extractos distintos e independientes entre sí. En el primer estudio se prepararon extractos de auxinas, ricos en IAA, de las dos especies de macroalgas, y se evaluaron sus efectos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en postlarvas *P. vannamei*. Los extractos ricos en IAA de *P. gymnospora* y *S. natans* disminuyeron los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* (producción de exopolisacáridos, motilidad y expresión relativa de genes de virulencia). En particular, el extracto rico en IAA de *P. gymnospora* (20 µg/L) destacó en la prueba de desafío con la bacteria patógena tratada, mostrando una supervivencia acumulada y un tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas significativamente superiores al control positivo. En el segundo estudio se prepararon extractos totales (crudos) de las cuatro especies de algas y se evaluaron sus efectos sobre la virulencia de *V. parahaemolyticus* y la expresión de los genes de la respuesta inmune de las postlarvas infectadas con la bacteria patógena tratada. Los extractos crudos de *I. galbana* redujeron la virulencia de *V. parahaemolyticus*, disminuyendo los niveles de formación de biopelículas a la concentración más alta evaluada (14 ppm), y la motilidad de enjambre a todas las concentraciones evaluadas. En la prueba de desafío, la supervivencia acumulada y el tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas fueron significativamente superiores al control positivo cuando recibieron el tratamiento del extracto crudo de *I. galbana* a la concentración más baja (0.14 ppm). El extracto crudo de *T. weissflogii* disminuyó la producción de biopelículas y la motilidad de enjambre de *V. parahaemolyticus* a la concentración más alta (14 ppm). En la prueba de desafío, las postlarvas tratadas con el extracto crudo de *T. weissflogii* presentaron una supervivencia acumulada y un tiempo promedio de supervivencia significativamente superiores al control positivo a la menor concentración (0.14 ppm). Todos los cuatro extractos crudos incrementaron la expresión de los genes de la respuesta inmune de las postlarvas supervivientes a la infección.

Identificamos que dos especies de algas pardas (*P. gymnospora* y *S. natans*) representan una fuente importante de IAA, exhibiendo una capacidad antivirulenta efectiva contra *V.*

parahaemolyticus causante de AHPND en postlarvas *P. vannamei*. Las auxinas son un grupo de fitohormonas conformadas en un 90% de IAA que cumplen la función de regulación del crecimiento de tejidos vegetales y señalización en células procariotas, esta molécula ha sido reportado en varios reinos (vegetal, monera, protista y fungi) (Lee et al., 2007; Lee et al., 2015a; Lee et al., 2015b; Zhang et al., 2019). En algas marinas se ha reportado la presencia de auxinas y análogos de indol en otros géneros de macroalgas pardas (*Macrocystis* y *Laminaria*), así como en algas rojas (*Botryocladia*), verdes (*Enteromorpha*, *Chlorella* y *Cladophora*), y también en cianobacterias (*Oscillatoria*) (Shoubaky & Salem, 2016).

El IAA en procariotas es producido por la vía del triptófano, mediado por la expresión del gen *tnaA*, para la producción de triptofanasa que actúa sobre L-triptófano (Li et al., 2014). El IAA posee funciones de señalización extracelular de detención de QS ligados a la fisiología y virulencia bacteriana (Zhang et al., 2017). El IAA interfiere con el autoinductor acilo homoserina lactona (AHL) en las bacterias gram-negativas *Acinetobacter oleivorans*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas chlororaphis* y *S. marcescens* (Kim & Park., 2013; Hidalgo-Romano et al., 2014). Particularmente, el IAA reduce la actividad de los factores de virulencia en *V. campbellii*, un patógeno de organismos acuícolas (Yang et al., 2017 b; Zhang et al., 2017).

La síntesis de EPS es un proceso fundamental para la virulencia bacteriana, requerido para la adhesión y estabilidad de las células microbianas, y con ello crear un microambiente propicio para el desarrollo celular, formando una barrera protectora contra condiciones adversas. La secreción de diversos azúcares necesarios para la virulencia bacteriana comprenden polisacáridos multifuncionales como polisacáridos intracelulares estructurales y extracelulares (EPS). El EPS comprende polímeros de alto peso molecular, generalmente formados por monosacáridos y otros sustituyentes no glucídicos (acetato, piruvato, succinato y fosfato). La sobreproducción de EPS confiere a la bacteria resistencia al estrés osmótico y oxidativo, agentes bactericidas o evasión de la fagocitosis mediante la elaboración de capsulas polisacáridas. otorgando un estado de supervivencia importante en momentos críticos del ciclo de vida en ambientes adversos (Yildiz, 2007).

En este estudio, la producción EPS, la motilidad de enjambre y la expresión de genes relacionada con la virulencia de *V. parahaemolyticus* disminuyeron significativamente

cuando recibieron los tratamientos de las tres fuentes de IAA comparados con el control positivo (bacteria no tratada con extractos de IAA). Se observó una disminución de la producción de EPS utilizando el IAA sintético y los extractos de macro y microalgas. Aunque la producción de EPS disminuyó en mayor proporción con el IAA sintético (en promedio 36 %), no lo hizo consistente a las cuatro concentraciones. Por el contrario, la producción de EPS de la bacteria *V. parahaemolyticus* tratada con los extractos de IAA de *P. gymnospora* disminuyó a las cuatro concentraciones (en promedio 17%); en tanto que para *S. natans* disminuyó 24% (promedio de las cuatro concentraciones). Resultados similares han sido observados para *V. campbellii* sometido a 200 μ M de IAA, llegando a obtener la reducción de EPS de hasta 7 veces respecto al tratamiento control (bacteria sin tratamiento de IAA) (Yang et al., 2017). Adicionalmente, el tratamiento de IAA sintético disminuyó entre 1.5 y 2 veces la expresión de los genes *vpsT* y *vpsR* relacionados a la producción de EPS (*Vibrio polysaccharide* - VPS) durante la fase estacionaria de *V. campbellii* (cepa ATCC BAA-1116) con respecto al control (bacteria no tratada con IAA) Yang et al. (2017).

Los EPS están fuertemente relacionados con la etapa inicial de la formación de la biopelícula debido a que ayudan a la agregación de células en la fase de maduración de la biopelícula provocando el abandono de la etapa planctónica. En el modelo de *V. cholerae*, el indol podría estar irrumpiendo alguna parte del proceso de transcripción de *ScrA* que traduce a pequeñas cantidades de proteínas que se unen al *ScrB*, complejo que activa al gen *ScrC* para sintetizar di-GMP cíclico (c-di-GMP) (Ayala & Silva-Benitez, 2016), el cual funciona activando reguladores relacionados a EPS o al polisacárido de la cápsula (CPS) (Liu et al., 2022). Si bien los EPS son fundamentales en la formación de las biopelículas, no son las únicas moléculas en participar en el proceso de virulencia, ya que otras moléculas, como celulosa, alginato, adhesinas y ácido colánico participan en la formación tridimensional y arquitectura de las biopelículas (Burtseva et al., 2021) durante la unión inicial a la superficie del tejido del huésped (superficie semisólida). Indol sintético y medio de cultivo rico en indol reducen significativamente (hasta 70%) la formación de biopelículas en cepas clínicas y ambientales de *Listeria monocytogenes* en comparación con los controles (Rattanaphan. et al., 2020a). Del mismo modo, co-cultivos mediante

inoculación simultánea de *Escherichia coli* con *Burkholderia unamae* expuestos a concentraciones menores a 0.5 mM de indol reprimen la formación de biopelículas de *E. coli* (Hashidoko & Kim., 2021). Hallazgos similares han sido reportados para otras bacterias como *Klebsiella pneumoniae* expuesta a indol y derivados (255 μ M) (Yaikhan et al., 2019), *Proteus mirabilis* y *Enterobacter cloacae* (1 mM) (Rattanaphan et al., 2020b). Resultados similares se observan en varias cepas bacterianas del clado *Harveyi* luego de exposición con IAA (200 μ M) (S. Zhang et al., 2021). Así, la formación de biopelículas de *V. harveyi* es reducida entre 25.8 y 60.1%, usando entre 10 a 30 μ g/mL de ácido undecanoico (10 μ g/mL) junto con auxinas IAA y ácido indol-3-butírico (IBA), siendo la concentración más elevada la que induce mejores resultados en la inhibición de las biopelículas (Salini et al., 2019). Estas observaciones contrastan con lo reportado en el presente estudio donde no se encontró disminución significativa de la formación de biopelículas para ninguna de las tres fuentes de IAA evaluadas. Los altos niveles de biopelículas observados en este estudio podrían explicarse por la biogénesis de otros tipos de azúcares como los lipopolisacáridos (LPS) de la superficie bacteriana (Tan et al., 2021) y las adhesinas de superficie (Karan et al., 2021), lo que a su vez podría inducir a una menor producción de EPS. No obstante, todos estos compuestos desempeñan roles cruciales en varias etapas de la formación de biopelículas, lo que podría mantener iguales los niveles de biopelículas en las bacterias tratadas y no tratadas con IAA.

Cuando existe una total vida bentónica de la célula microbiana se inicia la motilidad flagelar, con varios procesos como la colonización, la adhesión y la formación de biopelículas (Khan et al., 2020), que a la población microbiana le permite la expansión sobre la superficie del tejido del huésped mediante la motilidad de enjambre. Nuestros resultados respecto a la hipótesis planteada en base al control de la motilidad mediada por IAA en *V. parahaemolyticus* fue confirmada. El IAA sintético provocó la disminución del 16% de la motilidad de enjambre de *V. parahaemolyticus*, mientras que los extractos de IAA de *P. gymnospora* y *S. natans* disminuyeron 23% y 24%, respetivamente, confirmando la eficacia de los extractos de IAA de origen natural. Resultados similares han sido reportados por Yang. et al. (2017 b), logrando una reducción de motilidad de 2.7 veces a 200 μ M de indol en *V. campbellii*. En tanto que, en *L. monocytogenes* se redujo la migración del

movimiento de enjambre de 53.9 mm a 51.8 mm (Rattanaphan. et al., 2020a). En general, resultados similares de reducción de la motilidad se observaron en *Vibrios* del clado *Harveyi*: *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbellii* (S. Zhang et al., 2021).

El control genético de varios factores de virulencia está regulado por mecanismos de QS dependientes de la densidad celular controlada por moléculas AHL (Bassler et al., 1997; Swift et al., 2001). El sistema de QS para *V. parahaemolyticus* es análogo al de *V. harveyi* (Zhang et al., 2011). Este mecanismo modula los factores de virulencia como bioluminiscencia, formación de cápsulas, biopelícula, motilidad de enjambre, entre otros (Miller et al., 2002; Enos-Berlage et al., 2005). LuxR, máster regulador de QS en *V. harveyi*, inicia la transcripción de los reguladores de ARN pequeños (Qrr) que se dirigen al ARNm a la región no transcrita del ADN (UTR) 5' para estabilizar o desestabilizar la traducción de genes que controlan *aphA* a baja densidad celular (LCD) u *opaR* a alta densidad celular (HCD) (Zhang et al., 2011). El gen *opaR* se ha relacionado directamente a la producción de polisacáridos de la cápsula (CPS), formación de biopelículas, sistema de secreción tipo VI (T6SS-1) (Tu et al., 2010). *OpaR* es un regulador negativo de biopelícula a través de la modulación de c-di-GMP (Tu et al., 2010) y de la motilidad de natación y enjambre (Kalburge et al., 2017; Gregory et al., 2019). Además, la motilidad flagelar en *V. parahaemolyticus* es dual y está mediada por los flagelos polares para el movimiento de swimming en medio líquido y por los flagelos laterales para la motilidad en enjambre en medio semisólidos (swarming).

En el presente estudio se observó la reducción de la expresión de los genes *opaR* y *flaA*, así como la de los genes *PirA* y *PirB* de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND en todos los tratamientos de IAA, con un patrón en la expresión de *PirB* para las tres fuentes de IAA, consistente en una disminución directamente proporcional a la concentración evaluada. Así, en el tratamiento de IAA sintético se observó un decrecimiento en 44 veces de la expresión de *PirB*, mientras que los decrecimientos para los tratamientos de IAA de origen natural *P. gymnospora* y *S. natans* fueron de entre 6-12 y 4-7 veces, respectivamente. Aunque en general los factores de virulencia disminuyeron en mayor proporción en el IAA sintético, no lo hicieron en forma consistente a las cuatro concentraciones evaluadas. Por el contrario, los extractos de IAA de origen natural mostraron resultados consistentes. La

disminución de los factores de virulencia EPS y motilidad fueron semejantes en los extractos de IAA de origen natural. Sin embargo, es destacable la mayor disminución de la expresión de PirB en el extracto de IAA de *P. gymnospora* (12 veces) en comparación la reportada para *S. natans* (7 veces) a 20 µg/L. En forma consistente, el tratamiento de *V. parahaemolyticus* tratada con el extracto de IAA de *P. gymnospora* mostró un mejor desempeño que *S. natans* a 20 ug/L, siendo inclusive el de mejor desempeño en la prueba de desafío, con la supervivencia acumulada y el tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas *P. vannamei* significativamente superiores al control positivo.

En el presente estudio se cuantificó y detectó la presencia de IAA en muestras de macroalgas (Phaeophytas), encontrando una mayor concentración de IAA en el extracto de *P. gymnospora* (271 ± 4.15 ppm) comparado con el de *S. natans* (140 ± 15.3 ppm). Este resultado es consistente con la variabilidad en la concentración de auxinas en función de la especie, fase de crecimiento y factores ambientales del hábitat de las algas marinas (Yalçın et al., 2019). A nivel genético, si bien algunos tipos de algas no poseen el sistema de señalización de auxina nuclear (siglas en inglés AFB), y en algunos casos ausencia de la vía del indol pirúvico IPyA (*Ulva mutabilis*) (Morffy & Strader, 2018), estas macroalgas solo codifican procesos enzimáticos en las vías indol-3-acetaldoxima IAOx e indole-3-acetaldehído IAAld, lo que sugiere que algunas especies de algas dependen de vías biosintéticas alternativas de producción de auxinas, como la presencia de genes relacionados a la producción de indol (genes YUCCA) y genes de triptófano aminotransferasa (siglas en inglés TAA) (Morffy & Strader, 2018).

En este estudio se amplió el conocimiento sobre la versatilidad del IAA, permitiendo hipotetizar que los extractos de origen natural ricos en IAA ejercieron un efecto sobre la reducción de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*, incluyendo los factores de virulencia PirA y PirB asociados a AHPND mediante la interferencia en el proceso de QS descrito en *V. parahaemolyticus*, mejorando la supervivencia de postlarvas de camarón *P. vannamei* expuestas a la infección.

La necesidad de nuevas estrategias frente a enfermedades bacterianas emergentes de camarones exige la búsqueda de alternativa naturales a los antibióticos. Los compuestos activos de extractos de algas marinas (extractos crudos) son ideales por poseer propiedades

multifacéticas, que incluyen actividad antivirulencia contra patógenos microbianos (Tang et al., 2020), además de efectos inmunomoduladores en organismos en condición de infección (AftabUddin et al., 2021^a). En este estudio se encontró que todos los extractos crudos estudiados produjeron la disminución de al menos un factor de virulencia, lo cual los convierte en potenciales productos para la disrupción de la virulencia de *V. parahaemolyticus* y para el control de AHPND.

Los EPS son componentes fundamentales de las biopelículas, desempeñando un doble papel en la virulencia bacteriana (Zhang et al., 2023a; Zhang et al., 2023b) al facilitar la adhesión (Guo et al., 2020; Li et al., 2022) y proporcionar una matriz protectora (Pinto et al., 2020). Contrario a lo esperado, la aplicación de los extractos crudos de algas provocó un aumento significativo de la producción de EPS. Los extractos crudos algales podrían estar actuando en la formación de la matriz protectora contra los efectos adversos del ambiente (Hsieh & Allen, 2020; Singh et al., 2021). Esta observación podría indicar que ciertos compuestos pueden estimular inadvertidamente la síntesis de EPS, lo cual parece depender de la composición química del extracto (Sengupta et al., 2018). Además, la especificidad de la cepa bacteriana para la producción de EPS podría también estar influyendo. Serán necesarios realizar otros estudios para aclarar cuales son los mecanismos moleculares que estarían explicando la sobreproducción de EPS de *V. parahaemolyticus* de los extractos crudos de las algas evaluadas.

En contraste, la formación de biopelículas de *V. parahaemolyticus* decreció significativamente con los tratamientos de extractos crudos de *S. natans* e *I. galbana*, con 29% y 75%, respectivamente de reducción. En forma notable, el extracto crudo de *T. weissflogii* impidió la producción de biopelículas (reducción del 100%) de la bacteria patógena. Varios autores indican que extractos acuosos y etanólicos de algas de los géneros *Sargassum* (Peng et al., 2013; Stiger-Pouvreau et al., 2014; Ouattara et al., 2021) y *Padina* (Rahman et al., 2021) poseen moléculas interesantes como polisacáridos, polifenoles, taninos, catequinas, politerpenos, esteroides y compuestos fenólicos, como es el caso de *P. gymnospora* colectada en el Golfo de Mannar (India), donde la presencia de sesquiterpenoides como α -Bisabolol redujo la formación de biopelículas, controlando la

virulencia mediada por el sistema de QS en *S. marcescens* (Sethupathy et al., 2016; Rushdi et al., 2021).

En contraste, nuestros resultados no mostraron eficacia de los extractos crudos de *P. gymnospora* para impedir la formación de biopelículas en *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, cabe destacar la eficacia de ese extracto a la más alta concentración (14 ppm) para disminuir significativamente (91% comparado con el control positivo) la motilidad de enjambre de la bacteria patógena. Por su lado, los extractos crudos de las microalgas *I. galbana* y *T. weissflogii* produjeron en promedio reducciones de la motilidad de enjambre del 21% y 28%, respectivamente. Aunque se conoce que las especies de microalgas marinas *C. saccharophila*, *N. oculata*, *N. atomus* y *T. suecica* usadas en acuicultura son capaces de interferir en la comunicación de *V. harveyi* o *V. parahaemolyticus*, (Natrah et al., 2011) existe escasa información relacionada a la capacidad de antivirulencia de las microalgas, especialmente en el contexto de aplicación para la salud acuícola (Pozo et al., 2024). Ninguno de los extractos crudos fueron tóxicos para *P. vannamei* y no presentaron características antimicrobianas por lo que su uso no implicaría impacto ni presión de selección sobre la microbiota del sistema de producción.

La estimulación del sistema inmune innato se logra a partir de un amplio y variado tipo de compuestos que en algunos casos están presentes en la membrana celular bacteriana como carbohidratos, lipopolisacáridos (LPS), β -glucanos, peptidoglicanos y compuestos fenólicos (Noble et al., 2023). Este proceso ocurre mediante la identificación específica por proteínas de reconocimiento de patrones (PRRs) que activa la cascada de serina proteínasa, que consecuentemente produce la escisión del proPO inactivo en PO activo como respuesta inmune (Amparyup et al., 2013). Así autores demuestran en ensayos con lipopolisacáridos el incremento de la respuesta inmune celular mediante la activación del sistema profenol oxidasa (Yan et al., 2022; Arayamethakorn et al., 2023; Noble et al., 2023). El extracto crudo de *T. weissflogii* a la menor concentración (0.14 ppm) mostró una significativa estimulación en la expresión de trascriptos de profenoloxidasa (proPO-I, proPO-II) en las postlarvas sobrevivientes comparado con el control positivo (postlarvas no expuestas), lo que indicó una respuesta inmune aumentada, facilitando la defensa contra patógenos bacterianos (Lee et al., 2020; Roy et al., 2020). Además, se encontró que la

expresión de proPO-II fue significativamente alta en varios tratamientos de los cuatro extractos crudos evaluados. En el caso de Peneidina, con excepción del extracto crudo de *I. galbana* a 0.14 ppm, la expresión no fue representativa y en todos los otros tratamientos se encontró notablemente suprimida. Probablemente este resultado se debe a que este péptido antimicrobiano se expresa según el mecanismo de defensa del organismo; fase de destrucción de la bacteria o cicatrización del tejido (Deris et al., 2020). Al estar altamente activo el sistema profenoloxidasa facilita la neutralización y limita la acción del patógeno, esta acción podría evitar que el dominio C-terminal rico en cisteína (C-terminal CRD) de Peneidina no entre en contacto con los receptores de dominio en la bacteria, así no sea reconocido por el sistema inmune del organismo, generando una retroalimentación negativa de transcrito de este péptido antimicrobiano (peneidina). Cabe destacar que, la mayoría de las postlarvas que recibieron 0.14 ppm de *T. weissflogii* no mostraron lesiones de AHPND, exhibiendo más bien una predominancia de hipertrofia en los túbulos del hepatopáncreas. El camarón *P. vannamei* depende principalmente de su sistema inmune innato para combatir los patógenos y generar una respuesta efectiva, siendo claves los PRRs que reconocen sitios moleculares conservados presentes en la superficie de los patógenos (PAMPs) (Anderson & Seijio, 2010; Kulkarni et al., 2020; Tran et al., 2022), y que desempeñan un papel crucial en el inicio de las respuestas inmunitarias al desencadenar cascadas de señalización posteriores para la regulación del sistema de respuesta inmune en *P. vannamei*.

Los resultados de una mayor expresión de los de transcritos de profenoloxidasa en las postlarvas que recibieron administración con 0.14 ppm de extracto crudo de *T. weissflogii* podría estar relacionados con la activación favorable de la respuesta humoral del sistema inmune. En forma consistente, este tratamiento de extracto crudo fue uno de los dos con mejor desempeño en la prueba de desafío, lo cual fue evidente tanto para la supervivencia acumulada como en el tiempo promedio de supervivencia. Además, el incremento significativo de la expresión de crustin en las postlarvas que recibieron este tratamiento marca el potencial de este extracto crudo para reforzar las defensas antimicrobianas, impidiendo potencialmente la proliferación de *V. parahaemolyticus*.

La presencia de moléculas como ácido tetradecanoico (ácido mirístico) y el ácido hexadecanoico (ácido palmítico), al igual que sus derivados reducen la virulencia bacteriana (Ibrahim et al., 2020; Kachhadia et al., 2022) disminuyendo la gravedad de las infecciones. Estos ácidos grasos pueden mejorar la función de las células inmunitarias logrando modular las vías de señalización y promover la producción de efectores inmunitarios en organismos acuáticos (He et al., 2020; Ren et al., 2020; Martins et al., 2023) generando una respuesta inmune más sólida. Los ácidos grasos pueden ser metabolizados para producir gran cantidad de energía (Li et al., 2024) y cumplir diversas funciones celulares. Más aun ciertos ácidos grasos poseen actividad antioxidante mediante interacción con especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lu et al., 2024; Wu et al., 2024), evitando el estrés oxidativo y daño celular, así como la regulación de la expresión génica antioxidante mediante el ácido linoleico conjugado - CLA (Rakariyatham et al., 2024), la captación de radicales libres mediante el ácido 1-hidroxíciclohexano-1-carboxílico, ácido cis-9-hexadecenoico (Liang et al., 2023) y el butilhidroxitolueno BTH que inhibe la oxidación de los lípidos (Ungureanu et al., 2023). En el caso de la presencia de aminoácidos como L-isoleucina (Zan et al., 2023) y L-prolina (Lee et al., 2023) nos permite sugerir la existencia de vías adicionales en la modulación de la virulencia. Además, compuestos como el ácido indol-1-acético podrían actuar como inhibidores del sistema de detección de QS para la formación de EPS, formación de biopelículas, motilidad y otros factores importantes para la colonización y virulencia bacteriana (Defoirdt et al., 2017). En este estudio, se observó la presencia del ácido tetradecanoico en los cuatro extractos crudos, mientras que ácido hexadecanoico, ácido 1-hidroxíciclohexano-1-carboxílico y ácido cis-9-hexadecenoico estuvieron presentes solamente en *T. weissflogii*. Así mismo, los aminoácidos como Ácido 2-amino-3-metilbutanoico y Ácido (2S)-pirrolidina-2-carboxílico (L-isoleucina y L-prolina) estuvieron presentes en los extractos crudos de las dos microalgas evaluadas. Además, el ácido indol-3-acético estuvo presente en el extracto de *I. galbana*. Por su lado, el compuesto 2,6-di-terc-butil-4-metilfenoximetanoquinona estuvo presente en el extracto crudo de *P. gymnospora*. Posiblemente estos compuestos podrían estar relacionados con buenos desempeños de los extractos crudos de las cuatro algas evaluadas. Especialmente estos resultados son consistentes con los tiempos promedios de supervivencia de las postlarvas que recibieron

estos tres extractos significativamente superiores al control positivo (postlarvas que no recibieron administración de extractos crudos) durante la infección con *V. parahaemolyticus*. De estos tres tratamientos son destacables los extractos crudos de las dos microalgas, eficientes a las más bajas concentraciones. Es destacable el buen desempeño del extracto crudo de *I. galbana*, también a la más baja concentración (0.14 ppm) en la prueba de desafío con la bacteria patógena (tiempo promedio de supervivencia y supervivencia acumulada), Además de que presentó una disminución en la motilidad de enjambre. Coincidentemente, en este tratamiento dos de los genes de la respuesta inmune de *P. vannamei* (*Pen4* y *ProPO-II*) mostraron una mayor expresión comparada con el control positivo. Los resultados sugieren que las concentraciones más bajas de los extractos crudos estimulan el sistema inmune de las postlarvas *P. vannamei*, lo que podría estar explicando las supervivencias más altas en estos dos tratamientos comparado con el control positivo. En consecuencia, estos dos productos son potenciales candidatos para el desarrollo de terapias antivirulentas alternativas para el control de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND a través de la interferencia de la comunicación bacteriana y modulación del sistema inmune.

CONCLUSIONES

(1) Evaluar el efecto de extractos de macroalgas, ricos en indol, sobre la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus* causantes de AHPND en larvas *Penaeus vannamei*.

Se logró determinar el potencial terapéutico de cuatro micro y macroalgas en larvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* para el control de la enfermedad emergente AHPND. Específicamente, los resultados encontrados en las pruebas *in vitro* estuvieron a favor de la hipótesis planteada de que los extractos ricos en IAA disminuyen los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, especialmente la expresión de EPS y la motilidad, además de que disminuyen en forma importante la expresión relativa de genes de virulencia de la bacteria patógena. Estos resultados de disminución de la virulencia de *V. parahaemolyticus* fueron confirmados mediante la prueba *in vivo* de desafío de postlarvas *P. vannamei* infectadas con la cepa patógena tratada con estos extractos, destacando los extractos ricos en IAA de origen natural, especialmente el de *P. gymnospora*.

(2) Evaluar la actividad antimicrobiana e inmunológica de extractos de micro y macroalgas en larvas infectadas con *Vibrio parahaemolyticus* causantes de AHPND.

Los extractos etanólicos (extractos crudos) de macroalgas y microalgas redujeron de forma importante la virulencia microbiana (producción de biopelículas y motilidad), especialmente a las concentraciones más altas de *T. weissflogii*, *I. galbana* y *P. gymnospora*, lo cual no fue consistente con los resultados de la prueba de desafío de las postlarvas *P. vannamei* tratadas con estos tres extractos y posteriormente infectadas con *V. parahaemolyticus*. En la prueba de desafío, la supervivencia acumulada y el tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas fueron significativamente superiores al control positivo

cuando recibieron el tratamiento del extracto crudo de *I. galbana* y *T. weissflogii*, a la concentración más baja (0.14 ppm). Todos los cuatro extractos crudos mejoraron la respuesta inmune de las postlarvas contra la infección por *V. parahaemolyticus*.

La siguiente tabla muestra un análisis comparativo entre los mejores tratamientos para los dos tipos de extractos: extractos ricos en IAA de macroalgas (*P. gymnospora* a 20 µg/L y *S. natans* a 10 µg/L) y extractos crudos (*I. galbana* y *T. weissflogii*, ambos a 0.14 ppm). Con respecto a los extractos crudos, los mejores tratamientos fueron los de las dos microalgas, y a las más baja concentración (0.14 ppm). La producción de EPS solo disminuyó significativamente (comparado con el control positivo) cuando la bacteria patógena fue tratada con los extractos ricos en IAA de las macroalgas, y no con los extractos crudos. La mayor proporción de disminución de la motilidad de enjambre se evidenció cuando la bacteria patógena fue tratada con los extractos ricos en IAA. Esto sugiere que los extractos ricos en IAA de macroalgas son mejores para reducir el QS de *V. parahaemolyticus*. Los extractos ricos en IAA prolongaron más el tiempo promedio de supervivencia de las postlarvas *P. vannamei* infectadas con *V. parahaemolyticus* (26%-45%) que los extractos crudos (11%-12%). Esta misma tendencia se observó en la supervivencia acumulada de las postlarvas al finalizar los desafíos, con una relativa mayor supervivencia acumulada en los tratamientos de extractos ricos en IAA (25.6%-28.9%) que en los extractos crudos (22.3%-24.6%). Los extractos crudos podrían estar estimulando a una mejor respuesta inmune en las postlarvas *P. vannamei* desafiadas con la bacteria patógena, a través de diferentes mecanismos, a pesar de que las expresiones del gen proPO-II en las postlarvas supervivientes de ambos tratamientos fueron significativamente superiores que el control positivo. El extracto crudo de *T. weissflogii* parece activar el sistema de la profenol oxidasa, en tanto que el extracto crudo de *I. galbana* parece

estar relacionado también con la activación del péptido antimicrobiano peneidina. Aunque los cuatro extractos son potencialmente productos terapéuticos contra *V. parahaemolyticus* causante de AHPND, la producción a escala piloto, o a una mayor escala, de los extractos crudos de microalgas parece ser más viable, controlable y sostenible utilizando el equipamiento adecuado.

Tabla con el análisis comparativo entre los mejores tratamientos para los dos tipos de extractos: extractos ricos en IAA de macroalgas (*P. gymnospora* a 20 µg/L y *S. natans* a 10 µg/L) y extractos crudos (*I. galbana* y *T. weissflogii*, ambos a 0.14 ppm). NS= No Significativo.

Extracto	Especies de alga	Concentración evaluada	Porcentaje de disminución/incremento con respecto al respectivo control positivo				Acumulación relativa de transcritos de genes de virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> /respuesta inmune de <i>P. vannamei</i> significativamente superior al control positivo
			Disminución en la producción de EPS	Disminución de motilidad de enjambre	Incremento en el tiempo promedio de supervivencia durante el desafío	Incremento en la supervivencia acumulada al finalizar el desafío	
Extractos ricos en IAA	<i>P. gymnospora</i>	20 µg/L	16%	23%	45%	25.6% Tratamiento = 75.6 ± 3.5% Control positivo = 50.0 ± 3.4%	Todos los genes de virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> evaluados disminuyeron
	<i>S. natans</i>	10 µg/L	26%	39%	26%	28.9% Tratamiento = 78.9 ± 3.4% * Control positivo = 50.0 ± 3.4%	Todos los genes de virulencia de <i>V. parahaemolyticus</i> evaluados disminuyeron
Extractos crudos	<i>I. galbana</i>	0.14 ppm	NS	18%	11%	22.3% Tratamiento = 88.3 ± 3.1% Control positivo = 66.0 ± 2.5%	La expresión de ProPO-II y Pen4 de <i>P. vannamei</i> incrementó
	<i>T. weissflogii</i>	0.14 ppm	NS	10% ¥*	12%	24.6% Tratamiento = 90.6 ± 4.2% Control positivo = 66.0 ± 2.5%	ProPOI, ProPO-II de <i>P. vannamei</i> incrementó

¥ Incremento con respecto al control positivo

*Valores no significativos comparados con control.

RECOMENDACIONES

Los extractos estudiados (IAA y crudos) no mostraron actividad antibacteriana, bactericida o bacteriostática, ni fueron tóxicos para *P. vananmei*. Por lo tanto, es crucial evaluar los derivados del indol para ampliar el espectro de actividad y mejorar la eficacia de las moléculas derivadas de algas y microalgas. Particularmente, los extractos crudos fueron más efectivos a la más baja concentración evaluada lo que los hace potenciales para su consideración para posteriores terapias antivirulentas para camarones afectados con AHPND,

Todos los extractos crudos evaluados, especialmente aquellos de las microalgas mostraron un vasto potencial de moléculas que podrían explicar la efectividad observada en este estudio. Serán necesarios estudios adicionales para dilucidar el rol de la diversidad química de los extractos crudos sobre su bioactividad y eficacia en enfermedades bacterianas emergente en el cultivo de camarón.

Financiamiento

El presente proyecto estuvo enmarcado en el proyecto de Investigación Inédita “Biotecnología Azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos código PIC-21-INE-ESPOL-004” en el marco del programa INEDITA financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT).

Se presentan las conclusiones del trabajo según los resultados obtenidos y se hacen recomendaciones sobre los pasos a seguir para mejorar los vacíos de información y conocimiento existente sobre el tema.

BIBLIOGRAFÍA

- Ababouch, L., Nguyen, K. A. T., Castro de Souza, M., & Fernandez-Polanco, J. (2023). Value chains and market access for aquaculture products. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(2), 527-553. <https://doi.org/10.1111/jwas.12964>
- Abbas, E. M., Al-Souti, A. S., Sharawy, Z. Z., El-Haroun, E., & Ashour, M. (2023). Impact of dietary administration of seaweed polysaccharide on growth. Microbial Abundance and growth and immune-related genes expression of the pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Life*. 13(2). <https://doi.org/10.3390/life13020344>
- AftabUddin, S., Hussain, M. G., Abdullah Al, M., Failler, P., & Drakeford, B. M. (2021) a. On the potential and constraints of mariculture development in Bangladesh. *Aquaculture International*. 29(2). 575–593. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00643-9>
- AftabUddin, S., Siddique, M. A. M., Habib, A., Akter, S., Hossen, S., Tanchangya, P., & Abdullah Al. M. (2021) b. Effects of seaweeds extract on growth. survival. antibacterial activities. and immune responses of *Penaeus monodon* against *Vibrio parahaemolyticus*. *Italian Journal of Animal Science*. 20(1). 243–255. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1878943>
- Ahmad, A., W. Hassan, S., & Banat, F. (2022). An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered*. 13(4). 9521–9547. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148>
- Ahmed, H., Heneidak, S., Abdel-Hamied, M., & Shoubaky, G. A. (2023). Fatty acids composition and profiling of nine abundant marine Macroalgae. Egypt. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 24(2). 099–109. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2023.24.2.0311>
- Ahmed, J., Khan, M. H., Unnikrishnan, S., & Ramalingam, K. (2021). Acute hepatopancreases necrosis diseases (AHPND) as challenging threat in shrimp. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12(1). 978–991. <https://doi.org/10.33263/briac121.978991>
- Ahn, Y., Piamsomboon, P., Tang, d. K., & Han, J. E. (2017). Complete genome sequence of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio campbellii* L_{A16-V1}. *Isolated from Penaeus vannamei Cultured in a Latin American Country*. 5(37). 4–5.
- Akbar, S. A., & Fazli, R. R. (2023, August). Meta-Analysis: The effectiveness of artificial diets to increase on survival rate of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1221, No. 1, p. 012066). IOP

Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1221/1/012066>

- Akbary, P., Ajdari, A., & Dutta, S. (2024). Dietary effect of *Artemia urmiana* enriched with a brown dietary effect of *Artemia urmiana* enriched with a brown macroalgae premix (*Padina australis*, *Sargassum ilicifolium*, and *Stoechospermum marginatum*) on the growth performance. nutritional value. phytoc. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 23(1). 109–132. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2024.130832>
- Akbary, P., Ajdari, A., & Ajang, B. (2023). Growth. survival. nutritional value and phytochemical. and antioxidant state of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed with premix extract of brown *Sargassum ilicifolium*, *Nizimuddinia zanardini*, *Cystoseira indica*, and *Padina australis* macroalgae. *Aquaculture International*. 31(2). 681–701. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00994-5>
- Akbary, P., Gholamhosseini, A., Ali, M., Aminikhoei, Z., Tavabe, K. R., & Kuchaksaraei, B. S. (2021). Growth yield. fatty acid profile and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* fed *Iyengaria stellata* supplemented diet. *Iranian Journal of Science and Technology. Transaction A: Science*. 45(1). 111–119. <https://doi.org/10.1007/s40995-020-01004-0>
- Al-hashdy, D., Raweh, S., El-shaibany, A., Humaid, A., & El-aasser, M. (2022). A Review of Biological Activities of Genus *Sargassum*. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences*. February. <https://doi.org/10.4172/2278-0238.1000130>
- Alinejad, T., Bhasu, S., Mustafa, F. B., & Othman, R. Y. (2020). Innate immune system response against environmental temperature changes as a dangerous abiotic factor. *Global Nest Journal*. 22(4). 522–534. <https://doi.org/10.30955/gnj.003394>
- Alvarez-Lee, A., Martínez-Díaz, S. F., Gutiérrez-Rivera, J. N., & Lanz-Mendoza, H. (2020). Induction of innate immune response in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) embryos. *Developmental and Comparative Immunology*. 105. 103577. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103577>
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., & Tassanakajon, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(4). 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>
- Anderson, L., & Seijio, J.-C. (2010). *Bioeconomics of Fisheries Management*.
- Androutopoulou, C., & Makridis, P. (2023). Antibacterial Activity against Four Fish Pathogenic Bacteria of Twelve Microalgae Species Isolated from Lagoons in Western Greece. *Microorganisms*, 11(6), 1396.
- Angthong, P., Uengwetwanit, T., Arayamethakorn, S., & Rungrassamee, W. (2021). Transcriptomic analysis of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) reveals insights into immune development in their early life stages. *Scientific Reports*. 11(1). 1–14.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93364-9>

- Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2021). Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 43234–43257.
- Arayamethakorn, S., Uengwetwanit, T., Karoonuthaisiri, N., Methacanon, P., & Rungrassamee, W. (2023). Comparative effects of different bacterial lipopolysaccharides on modulation of immune levels to improve survival of the black tiger shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 197(December 2022). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107872>
- Arsad, S., Siallagan, R. M., Lusiana, E. D., Musa, M., Mahmudi, M., Sari, L. A., Prasetya, F. S., & Musa, N. (2023). The application of microalgae feeding regime on whiteleg shrimp culture in each stage: A mini review. *Sains Malaysiana*, 52(1), 1–16. <https://doi.org/10.17576/jsm-2023-5201-01>
- Ashrafudoulla, M., Na, K. W., Hossain, M. I., Mizan, M. F. R., Nahar, S., Toushik, S. H., Roy, P. K., Park, S. H., & Ha, S. Do. (2021). Molecular and pathogenic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood. *Marine Pollution Bulletin*, 172(September), 112927. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112927>
- Aweya, J. J., Zheng, Z., Zheng, X., Yao, D., & Zhang, Y. (2021). The expanding repertoire of immune-related molecules with antimicrobial activity in penaeid shrimps: a review. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 1907–1937. <https://doi.org/10.1111/raq.12551>
- Ayala, J. C., & Silva-Benitez, A. J. (2016). H-NS: an overarching regulator of the *Vibrio cholerae* life cycle. *Res Microbiol*, 168(August), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.007>
- Barreto, A., Peixoto, D., Fajardo, C., Pinto, W., Rocha, R. J. M., Conceição, L. E. C., & Costas, B. (2023). Health-promoting additives supplemented in inert microdiets for Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*) post-larvae: Effects on growth, survival, and health status. *Animals*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/ani13040726>
- Bashir, K. M. I., Lee, J. H., Petermann, M. J., Shah, A. A., Jeong, S. J., Kim, M. S., ., & Cho, M. G. (2018). Estimation of antibacterial properties of chlorophyta, rhodophyta and haptophyta microalgae species. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(3), 225–233.
- Bassler, B. L., Greenberg, E. P., & Stevens, A. N. N. M. (1997). Cross-Species Induction of Luminescence in the *Quorum-Sensing* Bacterium *Vibrio harveyi*. 179(12), 4043–4045.
- Basuki, B. R., Alimuddin, A., Soelistyowati, D. T., & Nuryati, S. (2023). Identification of a potential SNP related to the expression of immune genes and its possible application to selection of WSSV-resistant pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Ilmiah*

Perikanan Dan Kelautan. 15(2). 236–247. <https://doi.org/10.20473/jipk.v15i2.39110>

- Bagwell, C. E., Piskorska, M., Soule, T., Petelos, A., & Yeager, C. M. (2014). A diverse assemblage of indole-3-acetic acid producing bacteria associate with unicellular green algae. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, 1977–1984., <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0980-5>
- Begum, R., Howlader, S., Mamun-Or-Rashid, A. N. M., Rafiquzzaman, S. M., Ashraf, G. M., Albadrani, G. M., Sayed, A. A., Peluso, I., Abdel-Daim, M. M., & Uddin, M. S. (2021). Antioxidant and signal-modulating effects of brown seaweed-derived compounds against oxidative stress-associated pathology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2021/9974890>
- Beltrán, M., Quimi Mujica, J., Diringler, B., & Barahona, S. P. (2024). Alterations in the gut microbiome of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae following exposure to an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 52(1). 76–89. <https://doi.org/10.3856/vol52-issue1-fulltext-3119>
- Billaud, M., Seneca, F., Tambutté, E., & Czerucka, D. (2022). An increase of seawater temperature upregulates the expression of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors implicated in adhesion and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. 13(March). 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840628>
- Boonsri, N., Rudtanatip, T., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2017). Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *Journal of Applied Phycology*. 29(3). 1597–1608. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0969-2>
- Boyer, M., & Wisniewski-Dyé, F. (2009). Cell–cell signalling in bacteria: Not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x>
- Braga, Í. F. M., Chagas, A. C., Monserrat, J. M., Tesser, M. B., Wasielesky, W., Fóes, G. K., & Rosas, V. T. (2023). Different lipid levels in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nursery in systems grown in super-intensive biofloc systems. *Aquaculture Reports*. 33(July). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101823>
- Burtseva, O., Baulina, O., Zaytseva, A., Fedorenko, T., Chekanov, K., & Lobakova, E. (2021). In vitro biofilm formation by bioluminescent bacteria isolated from the marine fish gut. *Microbial Ecology*. 81(4). 932–940. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01652-0>
- Butt, U. D., Lin, N., Akhter, N., Siddiqui, T., Li, S., & Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 114, 263–

281.<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.003>

- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8(7). 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Callac, N., Giraud, C., Pham, D., Ansquer, D., Wabete, N., & Boulo, V. (2024). Active microbiota of *Penaeus stylirostris* larvae: Partially shaped via vertical and horizontal transmissions and larval ontogeny. *Microorganisms*. 12(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030608>
- Casas, C., Anderson, E. C., Ojo, K. K., Keith, I., Whelan, D., Rainnie, D., & Roberts, M. C. (2005). Characterization of pRAS1-like plasmids from atypical North American psychrophilic *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*. 242(1). 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.039>
- Casella, P., Iovine, A., Mehariya, S., Marino, T., Musmarra, D., & Molino, A. (2020). Smart method for carotenoids characterization in *Haematococcus pluvialis* red phase and evaluation of astaxanthin thermal stability. *Antioxidants*. 9(5). 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9050422>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2021). Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Developmental and Comparative Immunology*. 122(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>
- Chalhoub, H., Pletzer, D., Weingart, H., Braun, Y., Tunney, M. M., Elborn, J. S., Rodriguez-Villalobos, H., Plésiat, P., Kahl, B. C., Denis, O., Winterhalter, M., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2017). Mechanisms of intrinsic resistance and acquired susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients to temocillin. a revived antibiotic. *Scientific Reports*. 7(January). 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep40208>
- Chandrakala, N., & Priya, S. (2017). Vibriosis in shrimp aquaculture a review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 3(2), 27-33.
- Chang, Y.-T., Ko, H.-T., Wu, P.-L., Kumar, R., Wang, H.-C., & Lu, H.-P. (2023). Gut microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exhibits distinct responses to pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology Spectrum*. 11(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01180-23>
- Chen, Y., Miao, Y., Huang, L., Li, J., Sun, H., Zhao, Y., ., & Zhou, W. (2014). Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis: an *in vivo* and *in vitro* evaluation. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 1-8., <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-86>
- Chrastil, J. (1976). Calorimetric Estimation of Indole-3-Acetic Acid. *Analytical Biochemistry*.

138. 134–138. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90514-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90514-5)

- Chumpol, S., Kantachote, D., Nitoda, T., & Kanzaki, H. (2017). The functions of purple non-sulfur probiotic bacteria in controlling water quality and preventing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) to improve growth with increased survival in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during culture. *Aquaculture*. 473. 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.033>
- Cindana Mo'o, F., Wilar, G., Devkota, H. P., & Wathoni, N. (2020). Ulvan, a polysaccharide from Macroalga *Ulva sp.*: A review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applicatio
- Coplin, D., & Cook, D. (1990). Molecular Genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 3(5). 271–279.
- Dawes, C. J. (1971). Indole-3-acetic acid in the green algal coenocyte *Caulerpa prolifera* (Chlorophyceae. Siphonales). *Phycologia*. 10(4). 375-379. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-10-4-375.1>
- Defoirdt, T. (2017). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. xx. 1–16.
- Defoirdt, T., Miyamoto, C., Wood, T., Meighen, E., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(Bromomethylene)-3-butyl-2 (5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the ADN-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. *Environmental Microbiology*. 9(10). 2486–2495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01367.x>
- Deng, R., & Chow, T.-J. (2010). Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*. 28(4). e33-e45. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x>
- Deris, Z. M., Iehata, S., Ikhwanuddin, M., Sahimi, M. B. M. K., Dinh Do, T., Sorgeloos, P., Sung, Y. Y., & Wong, L. L. (2020). Immune and bacterial toxin genes expression in different giant tiger prawn, *Penaeus monodon* post-larvae stages following AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Aquaculture Reports*. 16(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100248>
- Diaz, C. J., Douglas, K. J., Kang, K., Kolarik, A. L., Malinovski, R., Torres-Tiji, Y., Molino, J. V., Badary, A., & Mayfield, S. P. (2023). Developing algae as a sustainable food source. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1029841>

- Domínguez-Borbor, C., Ardiles, V., Bermeo, M., Bolívar-Alvarado, C., Tomalá, C., Sonnenholzner, S., & Rodríguez, J. A. (2019). The marine symbiont *Pseudovibrio denitrificans* is effective to control pathogenic *Vibrio spp.* In shrimp aquaculture. *Aquaculture*, 508, 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.077>
- [Domínguez-Borbor, C., Chalén-Alvarado, B., & Rodríguez, J. A. \(2018\). A simple in vitro method to evaluate the toxicity of functional additives used in shrimp aquaculture. *MethodsX*, 5, 90-95. https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010](https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.01.010)
- Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., .., & Huang, J. (2017). pirAB vp-bearing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio campbellii* pathogens isolated from the same AHPND-affected pond possess highly similar pathogenic plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01859>
- Eissa, E.-S. H., Aljarari, R. M., Elfeky, A., Abd El-Aziz, Y. M., Munir, M. B., Jastaniah, S. D., Alaidaroos, B. A., Shafi, M. E., Abd El-Hamed, N. N. B., AL-Farga, A., Dighiesh, H. S., Okon, E. M., Abd El-Hack, M. E., Ezzo, O. H., Eissa, M. E. H., & ElBanna, N. I. (2024). Protective effects of *Chlorella vulgaris* as a feed additive on growth performance, immunity, histopathology, and disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific white shrimp. *Aquaculture International*, 32(3), 2821-2840. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01298-y>
- Emerenciano, M. G., Rombenso, A. N., Vieira, F. D. N., Martins, M. A., Coman, G. J., Truong, H. H., .., & Simon, C. J. (2022). Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. *Animals*, 12(3), 236. <https://doi.org/10.3390/ani12030236>
- Enos-Berlage, J. L., Guvener, Z. T., Keenan, C. E., & Mccarter, L. L. (2005). Genetic determinants of biopelícula development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 55, 1160–1182. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04453.x>
- Ersoy Kormaz, N. (2023). Unlocking the fatty acid profile of macroalgae species in sea of Marmara. Türkiye: A Comprehensive analysis of extraction methods. *International Journal of Environment and Geoinformatics*, 10(4), 34–38. <https://doi.org/10.30897/ijegeo.1379534>
- Evans, L. V., & Trewavas, A. J. (1991). Is algal development controlled by plant growth substances?. *Journal of phycology*, 27(3), 322-326.
- Faleye, O. S., Lee, J. H., & Lee, J. (2023). Selected flavonoids exhibit antibiopelícula and antibacterial effects against *Vibrio* by disrupting membrane integrity, virulence and metabolic activities. *Biopelícula*, 6(November), 100165. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100165>

- Farhadi, A., Tang, S., Huang, M., Yu1, Q., Xu, C., & Li, E. (2023). Identification of key immune and stress related genes and pathways by comparative analysis of the gene expression profile under multiple environmental stressors in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish & Shellfish Immunology*. 135.
- Frías-Gómez, S. A., Hernández Hernández, L. H., Powell, M. S., Álvarez-González, C. A., Cortés-Jacinto, E., Cigarroa-Ruiz, L., & Arellano-Carrasco, G. (2023). Effect of dietary protein lipid and carbohydrate ratio on growth digestive and antioxidant enzyme activity of prawn *Macrobrachium acanthurus* postlarvae. *Aquaculture Reports*. 30(April). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101578>
- Garibay-Valdez, E., Cicala, F., Martínez-Porchas, M., Gómez-Reyes, R., Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L. R., & Calderón, K. (2021). Longitudinal variations in the gastrointestinal microbiome of the white shrimp. *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*. 9. 1–26. <https://doi.org/10.7717/peerj.11827>
- Garibay-Valdez, E., Martínez-Porchas, M., Calderón, K., Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., & Martínez-Córdova, L. (2020). Taxonomic and functional changes in the microbiota of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) associated with postlarval ontogenetic development. *Aquaculture*. 518. 734842. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734842>
- Ghaffarizadeh, A., Sotoudeh, E., Mozanzadeh, M. T., Sanati, A. M., & Ghasemi, A. (2022). Supplementing dietary selenium nano-particles increased growth, antioxidant capacity and immune-related genes transcription in Pacific whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) juveniles. *Aquaculture Reports*. 25(May). 101215. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101215>
- Girija, V., Malaikozhundan, B., Vasecharan, B., Vijayakumar, S., Gobi, N., Del Valle Herrera, M., Chen, J.-C., & Santhanam, P. (2018). *In vitro* antagonistic activity and the protective effect of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 in zebrafish challenged with GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2. *Microbial pathogenesis*, 114. 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.058>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria . These include: A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopatho. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(2). 793–796.
- González-Gómez, J. P., Soto-Rodríguez, S., López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., Chaidez, C., & Gomez-Gil, B. (2020). Phylogenomic analysis supports two possible origins for Latin american strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Current Microbiology*. 77(12). 3851–3860. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02214-w>

- Goytortúa-Bore, E., Andrade Vizcaíno, K., Cadena Roa, M. A., & Civera Cerecedo, R. (2023). Manual para la identificación de estadios larvales del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus Vannamei*.
- Gregory, G. J., Morreale, D. P., Carpenter, M. R., Kalburge, S. S., & Fidelma, E. (2019). Crossm *quorum sensing* regulators *apha* and *opar* control expression of the operon responsible for biosynthesis of the compatible solute ectoine. *85* (22). 1–17.
- Grujić, V., Todorović, B., Ambrožič-Dolinšek, J., Kranvogel, R., & Ciringer, T. (2022). Diversity and content of carotenoids and other pigments in the transition from the green to the red stage of *Haematococcus pluvialis* microalgae identified by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS. *Plants*. *11*(8). <https://doi.org/10.3390/plants11081026>
- Guo, L., Wang, J., Gou, Y., Tan, L., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2020). Comparative proteomics reveals stress responses of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on different surfaces: Internal adaptation and external adjustment. *Science of the Total Environment*. *731*. 138386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138386>
- Guryanova, S. V., Balandin, S. V., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., & Ovchinnikova, T. V. (2023). Marine invertebrate antimicrobial peptides and their potential as novel peptide antibiotics. *Marine Drugs*. *21*(10). 1–37. <https://doi.org/10.3390/md21100503>
- Haifa-Haryani, W. O., Azzam-Sayuti, M., Amatul-Samahah, M. A., Chin, Y. K., Zamri-Saad, M., Annas, S., Natrah, I., Amal, M. N. A., & Ina-Salwany, M. Y. (2023). Characterization of the virulence of vibrio spp. In giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) from Peninsular Malaysia. *Aquaculture Research*. *2023*. <https://doi.org/10.1155/2023/7259748>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*. the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of shrimp. *113*. 33–40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>
- Han, X., Chen, Q., Zhang, X., Chen, X., Luo, D., & Zhong, Q. (2022). Antibiofilm and quorum sensing potential of *Lactiplantibacillus plantarum* Z057 against *Vibrio parahaemolyticus*. *Foods*. *11*(15). <https://doi.org/10.3390/foods11152230>
- Hashidoko, Y., & Kim, D. (2021). Bidirectional Cell-Cell communication via indole and cyclo(pro-tyr) modulates interspecies biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. *87*(22). <https://doi.org/10.1128/AEM.01277-21>
- He, C., Hao, R., Deng, Y., Yang, C., & Du, X. (2020). Response of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* to allograft-induced stress from lipid metabolism. *Fish and Shellfish Immunology*. *98*(November 2019). 1001–1007. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.028>

- Henry-Silva, G. G., Alves, J., Flickinger, D., Gomes-Rebouças, R., & Bessa-Junior, A. (2023). Polyculture of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and Red Seaweed *Gracilaria birdiae* (Greville) under Different Densities. *Fishes*. 8(1). <https://doi.org/10.3390/fishes8010054>
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri, I., Abdelkafi, S., & Michaud, P. (2020). Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*. 25(14). 1–29. <https://doi.org/10.3390/molecules25143152>
- Hernández-Cabanyer, C., Carrascosa, E., Jiménez, S., & Fouz, B. (2023). Exploring the effect of functional diets containing phytobiotic compounds in whiteleg shrimp health: resistance to acute hepatopancreatic necrotic disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Animals*. 13(8). 1–17. <https://doi.org/10.3390/ani13081354>
- Hidalgo-Romano, B., Gollihar, J., Brown, S. A., Whiteley, M., Valenzuela, E., Kaplan, H. B., Wood, T. K., & McLean, R. J. C. (2014). Indole inhibition of N-acylated homoserine lactone-mediated quorum signalling is widespread in Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 160(11), 2464-2473. <https://doi.org/10.1099/mic.0.081729-0>
- Hossain, M. M. M., Farjana, N., Afroz, R., Hasan-Uj-Jaman, Saha. P. K., Roy, H. S., Rahman, M. A., & Farid, M. A. (2023). Genes expression in *Penaeus monodon* of Bangladesh; challenged with AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology Reports*. 4(February). 100092. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100092>
- Hsieh, P.-C., Mau, J.-L., & Huang, S.-H. (2001). Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, 18(1), 35–43. doi:10.1006/fmic.2000.0376
- Hsieh, S. A., & Allen, P. M. (2020). Immunomodulatory roles of polysaccharide capsules in the intestine. *Frontiers in Immunology*. 11(April). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00690>
- Hu, S. H., Wang, J. C., Kung, H. F., Wang, J. T., Lee, W. L., & Yang, Y. H. (2004). Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 20(12), 591-599
- Huang, C., Luo, Y., Zeng, G., Zhang, P., Peng, R., Jiang, X., & Jiang, M. (2022). Effect of adding microalgae to whiteleg shrimp culture on water quality . shrimp development and yield. *Aquaculture Reports*. 22. 100916. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100916>
- Huang, Z., Zeng, S., Xiong, J., Hou, D., Zhou, R., Xing, C., Wei, D., Deng, X., Yu, L., Wang, H., Deng, Z., Weng, S., Kriengkrai, S., Ning, D., Zhou, J., & He, J. (2020). Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. *Microbiome*. 8(1). 1–13.

<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00802-3>

- Iber, B. T., & Kasan, N. A. (2021). Recent advances in Shrimp aquaculture wastewater management. *Heliyon*, 7(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08283>
- Ibrahim, H., Shaaban, M., Hanafi, A., & Abdelsalam, K. (2020). Inhibition of bacteria isolated from human specimens by selected marine-origin extracts. *The Egyptian Society of Experimental Biology*. 16(1). 91. <https://doi.org/10.5455/egyjebb.20200509032540>
- Jaski, G., Rohani-Ghadikolaei, Yahyavei, & Salarzadeh. (2021). Efficiency of *Spirulina platensis* cultured with different nitrogen regimes on larval development . growth and survival rate of white shrimp. *Litopenaeus vannamei* n . R . 1. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 20(2). 358–369. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2021.123786>
- Ji, Y., Yin, W., Liang, Y., Sun, L., Yin, Y., & Zhang, W. (2020). Anti-inflammatory and anti-oxidative activity of indole-3-acetic acid involves induction of HO-1 and neutralization of free radicals in RAW264.7 cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(5). 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21051579>
- Jiang, F., Lei, T., Wang, Z., He, M., Zhang, J., Wang, J., Zeng, H., Chen, M., Xue, L., Ye, Q., Pang, R., Wu, S., Gu, Q., Ding, Y., & Wu, Q. (2021). A novel gene vp0610 negatively regulates biopellicula formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 12(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656380>
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I-T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo. C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., & Thitamadee, S. (2014). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm that experienced an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*. 428-429. 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>
- Jun, J. W., Giri, S. S., Kim, H. J., Yun, S. K., Chi, C., Chai, J. Y., Lee, B. C., & Park, S. C. (2016). Bacteriophage application to control the contaminated water with Shigella. *Scientific Reports*. 6(1). Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep22636>
- Kachhadia, R., Kapadia, C., Singh, S., Gandhi, K., Jajda, H., Alfarraj, S., Ansari, M. J., Danish, S., & Datta, R. (2022). *Quorum sensing* inhibitory and quenching activity of bacillus cereus rc1 extracts on soft rot-causing bacteria *Lelliottia amnigena*. *ACS Omega*. 7(29). 25291–25308. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02202>
- Kadharsha Kudus, IG., Madasamy, S., & John, A. (2017). Efecto inmunomodulador del ácido algínico del alga parda *Sargassum wightii* sobre la resistencia a enfermedades en *Penaeus monodon*.
- Kalburge, S. S., Carpenter, M. R., Rozovsky, S., & Boyd, F. (2017). *Quorum sensing* regulators are required for metabolic fitness in *Vibrio parahaemolyticus*. *January*.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00930-16>

- Kanjana, K., Wongprasert, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., & Withyachumnarnkul, B. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.016>
- Karan, S., Garg, L. C., Choudhury, D., & Dixit, A. (2021). Recombinant FimH, a fimbrial tip adhesin of *Vibrio parahaemolyticus*, elicits mixed T helper cell response and confers protection against *Vibrio parahaemolyticus* challenge in murine model. *Molecular Immunology*, 135(April), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.005>
- Kellam, SJ, y Walker, JM (1989). Actividad antibacteriana de microalgas marinas en cultivo de laboratorio. *British Phycological Journal*, 24 (2), 191-194
- Kersanté, P., Le Reste, G., Diringer, B., Quimi, J., Sergheraert, R., & Duperray, J. (2021). Free amino acids mix made of poultry keratin improves survival of whiteleg shrimp post larvae (*Litopenaeus vannamei*) challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease and white spot syndrome virus. *Aquaculture International*, 29(2), 879–890. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00665-x>
- Khan, F., Tabassum, N., Anand, R., & Kim, Y. M. (2020). Motility of *Vibrio spp.*: regulation and controlling strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(19), 8187–8208. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10794-7>
- Kim, J., & Park, W. (2013). Indole inhibits bacterial quorum sensing signal transmission by interfering with quorum sensing regulator folding. *Microbiology*, 159(Pt_12), 2616–2625. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070615-0>
- Klongklaew, N., Praiboon, J., Tamtin, M., & Srisapoome, P. (2021). Chemical composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 112(February), 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.02.004>
- Kondo, H., Tinwongger, S., Proespraiwong, P., Mavichak, R., Unajak, S., Nozaki, R., & Hirono, I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from shrimp with early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in Thailand. *Genome Announcements*, 2(2), 10-1128.
- Kongrueng, J., Mitraparp-arhorn, P., Bangpanwimon, K., Robins, W., Vuddhakul, V., & Mekalanos, J. (2017). Isolation of *Bdellovibrio* and like organisms and potential to reduce acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124(3), 223-232. <https://doi.org/10.3354/dao03120>

- Krell, T., Gavira, J. A., Roca, A., & Matilla, M. A. (2023). The emerging role of auxins as bacterial signal molecules: Potential biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, *16*(8), 1611–1615. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14235>
- Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., & Uthaman, S. K. (2020). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 1–29. <https://doi.org/10.1111/raq.12482>
- Kumar, P., Verma, A., Sundharam, S. S., Ojha, A. K., & Krishnamurthi, S. (2022). Exploring diversity and polymer degrading potential of epiphytic bacteria isolated from marine macroalgae. *Microorganisms*, *10*(12), 2513. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122513>
- Kumar, R., Tung, T. C., Ng, T. H., Chang, C. C., Chen, Y. L., Chen, Y. M., Lin, S. S., & Wang, H. C. (2021). Metabolic alterations in shrimp stomach during acute hepatopancreatic necrosis disease and effects of taurocholate on *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, *12*(April), 631468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631468>
- Kumar, S., Verma, A. K., Singh, S. P., & Awasthi, A. (2023). Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. *Environmental Science and Pollution Research*, *30*(10), 25325–25343. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18433-y>
- Kumar, V., Baruah, K., Nguyen, D. V., Smaghe, G., Vossen, E., & Bossier, P. (2018). Phloroglucinol-mediated Hsp70 production in crustaceans: protection against *Vibrio parahaemolyticus* in *Artemia franciscana* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1091. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01091>
- Kumar, V., Roy, S., Behera, B. K., Bossier, P., & Das, B. K. (2021). Acute hepatopancreatic necrosis disease (Ahpnd): Virulence pathogenesis and mitigation strategies in Shrimp aquaculture. *Toxins*, *13*(8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>
- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., & Li, W. (2005). Applied linear statistical models. McGraw-Hill. <https://thuvienso.hoasen.edu.vn/handle/123456789/9564>
- Lage, L. P. A., Plagnes-Juan, E., Putrino, S. M., Baron, F., Weissman, D., Guyonvarch, A., .. & Panserat, S. (2017). Ontogenesis of metabolic gene expression in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): New molecular tools for programming in the future. *Aquaculture*, *479*, 142–149 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.030>
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Baek, K. H., Cho, M. H., & Lee, J. (2015) a. The multifaceted roles of the interspecies signalling molecule indole in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Microbiology*, *17*(4), 1234–1244. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12560>
- Lee, J. H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015) b. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in Microbiology*, *23*(11), 707–718.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.08.001>

- Lee, J., Cho, M., & Lee, J. (2011). 3-Indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 Biopelícula formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Environmental Microbiology*. *13*(1). 62–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02308.x>
- Lee, J., Jayaraman, A., & Wood, T. K. (2007). Indole is an inter-species biopelícula signal mediated by SdiA. *15*. 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-42>
- Lee, K. W., Kim, S., Lee, S., Kim, M., Song, S., & Kim, K. S. (2023). Iron-Fur complex suppresses the expression of components of the cyclo-(Phe-Pro)-signaling regulatory pathway in *Vibrio vulnificus*. *Frontiers in Microbiology*. *14*(October). 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1273095>
- Lee, P. T., Quan Tran, H. T., Huang, H. T., Nan, F. H., & Lee, M. C. (2020). *Sargassum borneri* extracts stimulate innate immunity enhance growth performance. and upregulate immune genes in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. *102*(February). 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.049>
- Leighton, R. E., Xiong, L., Anderson, G. K., Astarita, G. M., Cai, G., Norman, R. S., & Decho, A. W. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in vitro biopelícula dispersal from microplastics influenced by simulated human environment. *Frontiers in Microbiology*. *14*(October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236471>
- Li, M., Meng, H., Li, Y., & Gu, D. (2022). A novel transcription factor vpa0041 was identified to regulate the swarming motility in *Vibrio parahaemolyticus*. *Pathogens* *2022*. *11*. 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040453>
- Li, W., Wang, J. J., Qian, H., Tan, L., Zhang, Z., Liu, H., Pan, Y., & Zhao, Y. (2020). Insights into the role of extracellular ADN and extracellular proteins in biopelícula formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. *11*(May). 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00813>
- Li, X. Yang, Q., Dierckens, K., Milton, D. L., & Defoirdt, T. (2014). RpoS and indole signaling control the virulence of *Vibrio anguillarum* towards gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *PLoS ONE*. *9*(10). 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111801>
- Li, X Zhang, X., Zhang, M., Luo, X., Zhang, T., Liu, X., Lu, R., & Zhang, Y. (2024). Environmental magnesium ion affects global gene expression. motility biopelícula formation and virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biopelícula*. *7*(February). 100194. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100194>
- Li, Y. Zhou, C., Yan, X., Zhang, J., & Xu, J. (2016). Simultaneous analysis of ten phytohormones in *Sargassum borneri* by high-performance liquid chromatography with

- electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 39(10). 11. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501239>
- Li, Y. Ye, Y., Rihan, N., Zhu, B., Jiang, Q., Liu, X., Zhao, Y., & Che, X. (2024). Polystyrene nanoplastics induce lipid metabolism disorder and alter fatty acid composition in the hepatopancreas of Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Science of the Total Environment*. 906(September 2023). 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167616>
- Li, Y. Sun, S., Pu, X., Yang, Y., Zhu, F., Zhang, S., & Xu, N. (2018). Evaluation of antimicrobial activities of seaweed resources from zhejiang coast. *China*. <https://doi.org/10.3390/su10072158>
- Li, Y., Dong, R., Ma, L., Qian, Y., & Liu, Z. (2022). Combined anti-biopellicula enzymes strengthen the eradicate effect of *Vibrio parahaemolyticus* biopellicula: mechanism on cpsA-j expression and application on different carriers. *Foods*. 11(9). <https://doi.org/10.3390/foods11091305>
- Li, Y. Cai, X., Gu, W., & Wang, G. (2020). Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* under red and blue light. *Journal of Oceanology and Limnology*. 38(1). 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9064-2>
- Liang, J., Liu, J., Wang, X., Sun, H., Zhang, Y., Ju, F., .. & Zhang, X. H. (2022). Genomic analysis reveals adaptation of *Vibrio campbellii* to the hadal ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(16), e00575-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00575-22>
- Liang, Z., Zhang, P., Xiong, Y., Johnson, S. K., & Fang, Z. (2023). Phenolic and carotenoid characterization of the ethanol extract of an Australian native plant *Haemodorum spicatum*. *Food Chemistry*. 399(April 2022). 133969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133969>
- Little, S. M., Senhorinho, G. N. A., Saleh, M., Basiliko, N., & Scott, J. A. (2021). Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments: A review. *ALGAE*, 36(1), 61-72. <https://doi.org/10.4490/algae.2021.36.3.6>
- Liu, M., Nie, H., Luo, X., Yang, S., Chen, H., & Cai, P. (2022). A polysaccharide biosynthesis locus in *Vibrio parahaemolyticus* important for biopellicula formation has homologs widely distributed in aquatic bacteria mainly from gammaproteobacteria. *MSystems*. 7(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.01226-21>
- Liu, P. X., Zhang, X. Y., Wang, Q., Li, Y. Y., Sun, W. D., Qi, Y., Zhou, K., Han, X. G., Chen, Z. G., Fang, W. H., & Jiang, W. (2022). Biological and transcriptional studies reveal VmeL is involved in motility biopellicula formation and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 13(August). 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976334>

- Liu, S., Wang, W., Jia, T., Xin, L., Xu, T., Wang, C., Xie, G., Luo, K., Li, J., Kong, J., Zhang, Q., Liu, S., Wang, W., Jia, T., Xin, L., Xu, T., Wang, C., Xie, G., Luo, K., Li, J., Kong, J., & Zhang, Q. (2023). Via Acquiring Novel Virulence Factors. *Microbiology Spectrum* 10.1128. 11(6). 19.
- Livak, K. J & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. vol. 25. pp. 402-408. 2001. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. M. (2023). Marine macroalgae polyphenols as potential neuroprotective antioxidants in neurodegenerative diseases. *Marine Drugs*. 21(5). 1–18. <https://doi.org/10.3390/md21050261>
- Lu, M., Jing, F., Liu, R., Chen, Z., Tong, R., Li, Y., & Pan, L. (2024). The effects and mechanisms of dietary ferulic acid (FA) and dihydromyricetin (DMY) on growth and physiological responses of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 589(March). 740967. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740967>
- Lu, Y., & Xu, J. (2015). Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology?. *Trends in plant science*, 20(5), 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Luangtrakul, W., Boonchuen, P., Jaree, P., Kumar, R., Wang, H. C., & Somboonwiwat, K. (2021). Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes. a newly identified target tissue. involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. *PLoS Pathogens*. 17(3). 1–21. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009463>
- Luo, M., Xu, X., Liu, X., Shen, W., Yang, L., Zhu, Z., Weng, S., He, J., & Zuo, H. (2022). The non-receptor protein tyrosine phosphatase ptpn6 mediates a positive regulatory approach from the interferon regulatory factor to the jak/stat pathway in *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Immunology*. 13(June). 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.913955>
- Lv, Y., Liang, Q., Li, Y., Li, X., Liu, X., Zhang, D., & Li, J. (2021). Effects of metal ions on activity and structure of phenoloxidase in *Penaeus vannamei*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 174. 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.112>
- Ma, M., & Hu, Q. (2023). Microalgae as feed sources and feed additives for sustainable aquaculture: Prospects and challenges. *Reviews in Aquaculture*. October 2023. 818–835. <https://doi.org/10.1111/raq.12869>
- Mai, T. D., Lee-Chang, K. J., Jameson, I. D., Hoang, T., Cai, N. B. A., & Pham, H. Q. (2021). Fatty acid profiles of selected microalgae used as live feeds for shrimp postlarvae in Vietnam. *Aquaculture Journal*. 1(1). 26–38. <https://doi.org/10.3390/aquacj1010004>

- Maliwat, G. C., Velasquez, S., Robil, J. L., Chan, M., Traifalgar, R. F., Tayamen, M., & Ragaza, J. A. (2017). Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). *Aquaculture Research*, 48(4), 1666-1676. <https://doi.org/10.1111/are.13004>
- Manam, V. K., & Sumathi, G. (2024). Recent trends in algae and seaweeds. SCIENG PUBLICATIONS.
- Martins, N., Magalhães, R., Viera, L., Couto, A., Serra, C. R., Maia, M. R. G., Fonseca, A. J. M., Cabrita, A. R. J., Pousão-Ferreira, P., Castro, C., Peres, H., & Oliva-Teles, A. (2023). Dietary oleic acid supplementation improves feed efficiency and modulates fatty acid profile and cell signaling pathway in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed high-lipid diets. *Aquaculture*, 576(July). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739870>
- Meidiana, D., Masithah, E. D., & Isoni, W. (2023). The effect of temperature differences on oxygen consumption level (OCL) and stress level in the process of spawning vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1273(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1273/1/012069>
- Mercy, A. A., Hemamalini, N., Aruljothi, K., Chrisolite, B., & Karalmarx, K. (2020). In silico characterisation and homology modelling of toll/toll like receptors (TLRs) from penaeid shrimps. *Indian Journal of Fisheries*, 67(1), 98–104. <https://doi.org/10.21077/ijf.2019.67.1.90557-13>
- Miao, M., Li, S., Liu, Y., Yu, Y., & Li, F. (2023). Transcriptome analysis on hepatopancreas reveals the metabolic dysregulation caused by *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*. *Biology*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/biology12030417>
- Miller, M. B., Skorupski, K., Lenz, D. H., Taylor, R. K., & Bassler, B. L. (2002). Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110, 303–314.
- Ming, J., Guo, J., Xia, C., Wang, W., & Alshareef, H. N. (2019). Zinc-ion batteries: Materials, mechanisms, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 135, 58-84. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2018.10.002>
- Mizan, Md. F. R., Jahid, I. K., Kim, M., Lee, K.-H., Kim, T. J., & Ha, S.-D. (2016). Variability in biofilm formation correlates with hydrophobicity and quorum sensing among *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food contact surfaces and the distribution of the genes involved in biofilm formation. *Biofouling*, 32(4), 497-509. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1149571>

- Molina-Cárdenas, C. A., Sánchez-Saavedra, M. del P., & Lizárraga-Partida, M. L., (2014). Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*. 26(6). 2347-2355. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0270-1>
- Moussavou, G., Kwak, D. H., Obiang-Obonou, B. W., Maranguy, C. A. O., Dinzouna-Boutamba, S.-D., Lee, D. H., Pissibanganga, O. G. M., Ko, K., Seo, J. I., & Choo, Y. K. (2014). Anticancer effects of different seaweeds on human colon and breast cancers. *Marine Drugs*. 12(9). Article 9. <https://doi.org/10.3390/md12094898>
- Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed potential in the animal feed: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*. 8(8). 1–24. <https://doi.org/10.3390/JMSE8080559>
- Morffy, N., & Strader, L. (2018). Old town roads: routes of auxin biosynthesis across kingdoms. *Physiology & Behavior*. 176(1). 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.02.002.Old>
- Mueller, R. S., Beyhan, S., Saini, S. G., Yildiz, F. H., & Bartlett, D. H. (2009). Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 191(11), 3504-3516., <https://doi.org/10.1128/jb.01240-08>
- Müller, M., Spiers, A. J., Tan, A., & Mujahid, A. (2023). Investigating quorum-quenching marine bacilli as potential biocontrol agents for protection of shrimps against Early Mortality Syndrome (EMS). *Scientific Reports*. 13(1). 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31197->
- Muthukrishnan, S., Shariff, M., Ina-Salwany, M. Y., Yusoff, F. M., & Natrah, I. (2022). Expression of AHPND toxin genes (pirAB), quorum sensing master regulator gene (luxR) and transmembrane transcriptional regulator gene (toxR) in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* during infection of *Penaeus vannamei* (Bonne, 1931). *Aquaculture*. 551(December 2021). 737895. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737895>
- Nagahawatta, D., Liyanage, N., Jayawardena, T., Yang, F., Jayawardena, H., Kurera, M., Wang, F., Fu, X., & Jeon, Y. J. (2023). Functions and values of sulfated polysaccharides from seaweed. *Algae*. 38(4). 217–240. <https://doi.org/10.4490/algae.2023.38.12.1>
- Naiel, M. A., Farag, M. R., Gewida, A. G., Elnakeeb, M. A., Amer, M. S., & Alagawany, M. (2021). Using lactic acid bacteria as immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus spp.* *Aquaculture International*, 29, 219-231. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00620-2>
- Natrah, F. M. I., Ruwandepika, H. A. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors through quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiology*. 154(1). 124-129.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.024>

- Nelson, D. R., Mystikou, A., Jaiswal, A., Rad-menendez, C., Preston, M. J., Boever, F. De Assal, D. C. El Daakour, S., Lomas, M. W., Twizere, J., Green, D. H., Ratcliff, W. C., & Salehi-ashtiani, K. (2024). Macroalgal deep genomics illuminate multiple paths to aquatic . photosynthetic multicellularity. *Molecular Plant*. 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2024.03.011>
- Nguyen, D.-A. Le. Cheng, L.-W., Wang, P.-C., & Chen, S.-C. (2023). Phenotypic. Phylogenetic Analysis and Pathogenic Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* in Farmed *Penaeus Vannamei* in Taiwan . *Taiwan Veterinary Journal*. 48(01n02). 35–44. <https://doi.org/10.1142/s1682648523500026>
- Noble, T. H., Samsing, F., Wade, N., Osborne, S., Addepalli, R., & Wynne, J. W. (2023). Stimulation of shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes by lipopolysaccharide-like molecules derived from Novacq™. *Animal Feed Science and Technology*. 299(March). 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115626>
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*. 111(1). 81-86. <https://doi.org/10.3354/dao02776>
- Ochoa-Pereira, P. M., & Velásquez-López, P. C. (2023). Effect of fasting on molting and survival rate in post-larvae of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 58(1), 10-18. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2023.58.1.4133>
- Östin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 118(1), 285-296.
- Otero, P., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Echave, J., Soria-Lopez, A., Garcia-Perez, P., Fraga-Corral, M., Cao, H., Nie, S., Xiao, J., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2023). Seaweed polysaccharides: Emerging extraction technologies. chemical modifications and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 63(13). 1901–1929. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1969534>
- Ouattara, A., Kpan, B. W., Ouattara, D., Kone. W. M., & Komoe, K. (2021). The acute toxicity of *Sargassum fuillans* (Børgesen) Børgesen and *Sargassum natans* (Børgesen) Børgesen on some rats of wistar stock. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 47(2). 8542–8551. <https://www.m.elewa.org/Journals/wp-content/uploads/2021/03/5.Ouattara.pdf>
- Panigrahi, A., Sivakumar, M. R., Sundaram, M., Saravanan, A., Das, R. R., Katneni, V. K., Ambasankar, K., Syama Dayal, J., & Gopikrishna, G. (2020). Comparative study on phenoloxidase activity of biofloc-reared pacific white shrimp *Penaeus vannamei* and Indian white shrimp *Penaeus indicus* on graded protein diet. *Aquaculture*. 518. 734654.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734654>

- Paopradit, P., Tansila, N., Surachat, K., & Mittraparp-arthorn. (2021). *Vibrio alginolyticus* influences quorum sensing-controlled phenotypes of acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *PeerJ*. *June*. 1–22. <https://doi.org/10.7717/peerj.11567>
- Pazhani, G. P., Chowdhury, G., & Ramamurthy, T. (2021). Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival. Host colonization. And infection. *Frontiers in Microbiology*. *12*(October). 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737299>
- Peng, Y., Xie, E., Zheng, K., Fredimoses, M., Yang, X., Zhou, X., Wang, Y., Yang, B., Lin, X., Liu, J., & Liu, Y. (2013). Nutritional and chemical composition and antiviral activity of cultivated seaweed sargassum naozhouense Tseng et Lu. *Marine Drugs*. *11*(1). 20–32. <https://doi.org/10.3390/md11010020>
- Pereira, L., & Cotas, J. (2023). Therapeutic potential of polyphenols and other micronutrients of marine origin. *Marine Drugs*. *21*(6). <https://doi.org/10.3390/md21060323>
- Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020). Innovative strategies toward the disassembly of the eps matrix in bacterial biopelículas. *Frontiers in Microbiology*. *11*(May). 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00952>
- Pozo, F., Borbor, M., Solórzano, R., Sonnenholzner, S., & Bayot, B. (2024). Optimized swarming motility assay to identify anti-virulence products against *Vibrio parahaemolyticus*. a pathogen of farmed shrimp. *MethodsX*. *12*(February). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102622>
- Prathiviraj, R., Rajeev, R., Fernandes, H., Rathna, K., Lipton, A. N., Selvin, J., & Kiran, G. S. (2021). A gelatinized lipopeptide diet effectively modulates immune response. disease resistance and gut microbiome in *Penaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. *112*(March). 92–107. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.02.018>
- Prithvisagar, K. S., Krishna Kumar, B., Kodama, T., Rai, P., Iida, T., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2021). Whole genome analysis unveils genetic diversity and potential virulence determinants in *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. *Virulence*. *12*(1). 1936–1949. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1947448>
- Qian, H., Li, W., Guo, L., Tan, L., Liu, H., Wang, J., Pan, Y., & Zhao, Y. (2020). Stress Response of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* Biopelículas to Different Modified Atmospheres. *Frontiers in Microbiology*. *11*(February). 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00023>

- Quyoom, N., & Iqbal, G. (2023). Chapter-4 Crustacean Immune System and their Responses. *Latest Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*. 37.
- Rahman, F., Abdul, A., Ahsan, T., Islam, T., Alam, M., & Hossain, M. N. (2021). Screening of potential bioactive compounds from Padina gymnospora found in the Coast Of St. Martin Island Of Bangladesh. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*. 6(1). 1–7. <https://doi.org/10.15436/2381-0750.21.3010>
- Rahul, J., & Varsha, S. (2020). Swarming in bacteria: a tale of plasticity in motility behavior. *Journal of the Indian Institute of Science*. 100(3). 515–524. <https://doi.org/10.1007/s41745-020-00177-2>
- Rakariyatham, K., Teerawutgulrag, A., Laokuldilok, T., Osiriphun, S., Ackcharoensuk, N., & Tanbamrung, W. (2024). Combinatorial effects of longan (*Dimocarpus longan*) peel extract and lecithin on stability of soybean oil and the oxidative stability of fried shrimp crackers during storage. *Lwt*. 198(October 2023). 116065. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116065>
- Ramírez, M., Domínguez-Borbor, C., Salazar, L., Debut, A., Vizuete, K., Sonnenholzner, S., Alexis, F., & Rodríguez, J. (2022). The probiotics *Vibrio diabolicus* (Ili), *Vibrio hepatarius* (P62), and *Bacillus cereus* sensu stricto (P64) colonize internal and external surfaces of *Penaeus vannamei* shrimp larvae and protect it against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 549. 737826. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737826>
- Rattanaphan, P., Mittraparp-Arthorn, P., Srinoun, K., Vuddhakul, V., & Tansila, N. (2020) a. Indole signaling decreases biopellicula formation and related virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*. 367(14). 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa116>
- Rattanaphan, P., Yaikhan, T., Rachniyom, P., Mittraparp-Arthorn, P., Vuddhakul, V., & Tansila, N. (2020) b. Altered virulence of non-indole-producing pathogenic bacteria by indole signaling. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 42(3). 515–520. ()
- Ren, X., Yu, Z., Xu, Y., Zhang, Y., Mu, C., Liu, P., & Li, J. (2020). Integrated transcriptomic and metabolomic responses in the hepatopancreas of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) under cold stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 206(June). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111360>
- Restrepo, L. Bayot, B., Betancourt, I., & Pinzon, A. (2016). Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2. associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. *Genom Data*. 9. 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.08.008>

- Restrepo, L., Bayot, B., Arciniegas, S., Bajaña, L., Betancourt, I., Panchana, F., & Reyes Muñoz, A. (2018). PirVP genes causing AHPND identified in a new species of *Vibrio* (*Vibrio punensis*) within the *Orientalis* commensal clade. *Scientific Reports*, 8 (1), 13080. –14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30903-x>
- Reyes, G., Betancourt, I., Andrade, B., Panchana, F., Román, R., Sorroza, L., .., & Bayot, B. (2022). Microbiome of *Penaeus vannamei* larvae and potential biomarkers associated with high and low survival in shrimp hatchery tanks affected by acute hepatopancreatic necrosis disease. *Frontiers in Microbiology*, 13, 838640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838640>
- [Richmond, A. \(2013\). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. En Handbook of Microalgal Culture \(pp. 169-204\). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11](https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11)
- Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M., & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(2), 151-155.
- Rojas, V., Rivas, L., Cárdenas, C., & Guzmán, F. (2020). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as emerging sources of antibacterial peptides. *Molecules*, 25(24), 5804.
- Romanenko, E. A., Kosakovskaya, I. V., & Romanenko, P. O. (2015). Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. auxins, abscisic acid, ethylene. *International Journal on Algae*, 17(3).
- Rosilan, N. F., Jamali, M. A. M., Sufira, S. A., Waiho, K., Fazhan, H., Ismail, N., Sung, Y. Y., Mohamed-Hussein, Z.-A., Hamid, A. A. A., & Afiqah-Aleng, N. (2024). Molecular docking and dynamics simulation studies uncover the host-pathogen protein-protein interactions in *Penaeus vannamei* and *Vibrio parahaemolyticus*. *PLOS ONE*, 19(1), e0297759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297759>
- Roy, S., Bossier, P., Norouzitallab, P., & Vanrompay, D. (2020). Trained immunity and perspectives for shrimp aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. 12(4). 2351–2370. <https://doi.org/10.1111/raq.12438>
- Ruangpan, L., & Tendencia, E. A. (2004). Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. In *Southeast Asian Fisheries Development Center Aquaculture Department*.
- Rudtanatip, T., Boonsri, N., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2017). A sulfated galactans supplemented diet enhances the expression of immune genes and protects against *Vibrio parahaemolyticus* infection in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 65. 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.020>

- Ruhal, R., & Kataria, R. (2021). Biopelícula patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*. 251(March). 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>
- Rushdi, M. I., Abdel-Rahman, I. A. M., Saber, H., Attia, E. Z., Madkour, H. A., & Abdelmohsen, U. R. (2021). A review on the pharmacological potential of the genus *Padina*. *South African Journal of Botany*. 141. 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.018>
- Salehpour, R., Amrollahi, N., Mohammadi, M., Dashtiannasab, A., & Ebrahimnejad, P. (2021). The dietary effect of fucoidan extracted from brown seaweed. *Cystoseira trinodis* (C. Agardh) on growth and disease resistance to WSSV in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 119(September). 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.005>
- Salih, S., Abdulrazziq, AA y Abdulwhab, OA (2023). Evaluación de la tolerancia de seis genotipos de *Triticum aestivum* al estrés salino. *Revista científica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sirte*, 3 (2), 105-109.
- Salini, R., Santhakumari, S., Veera Ravi, A., & Karutha Pandian, S. (2019). Synergistic antibiopelícula efficacy of undecanoic acid and auxins against quorum sensing mediated biopelícula formation of luminescent *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 498. 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.038>
- Sánchez-Muros, M. J., Renteria, P., Vizcaino, A., & Barroso, F. G. (2020). Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. *Reviews in Aquaculture*. 12(1). 186–203. <https://doi.org/10.1111/raq.12312>
- Sanderson, K. J., Jameson, P. E., & Zabkiewicz, J. A. (1987). Auxin in a seaweed extract: Identification and quantitation of indole-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of plant physiology*, 129(3-4), 363-367. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80093-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80093-7)
- Saputra, A., Maftuch, Andayani, S., & Yanuhar, U. (2023). Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Serang, Banten, Indonesia. *Biodiversitas*. 24(4). 2365–2373. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240451>
- Saucedo-Vázquez, J. P., Gushque, F., Vispo, N. S., Rodríguez, J., Gudiño-Gomezjurado, M. E., Albericio, F., Tellkamp, M. P., & Alexis, F. (2022). Marine Arthropods as a Source of Antimicrobial Peptides. *Marine Drugs*. 20(8). <https://doi.org/10.3390/md20080501>
- Sengupta, D., Datta, S., & Biswas, D. (2018). Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(4). 1587–1598.

<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8745-7>

- Serrano, A. E., & Tumbokon, B. L. M. (2022). Hepatopancreatic transcriptome response of *Penaeus vannamei* to dietary ulvan. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*. 74. 1–13. <https://doi.org/10.46989/001c.55685>
- Sethupathy, S., Shanmuganathan, B., Kasi, P. D., & Karutha Pandian, S. (2016). Alpha-bisabolol from brown macroalga *Padina gymnospora* mitigates biopellicula formation and quorum sensing controlled virulence factor production in *Serratia marcescens*. *Journal of Applied Phycology*. 28(3). 1987–1996. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0717-z>
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine drugs*, 14(4), 81.
- Shannon, E., Conlon, M., & Hayes, M. (2021). Seaweed components as potential modulators of the gut microbiota. *Marine Drugs*. 19(7). 1–50. <https://doi.org/10.3390/md19070358>
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria 1. *Journal of phycology*, 43(3), 605–608.
- Shinoda, S. (1977). Formation and Function of *Vibrio parahaemolyticus* Lateral Flagella. 129(3). 1266–1271.
- Shoubaky, G. A. El. & Salem, E. A. (2016). Effect of abiotic stress on endogenous phytohormones profile in some seaweeds. *January*.
- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biopelliculas: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00242-y>
- Song, S. S., Lu, Y. Y., Zhu, M. J., Zuo, Q. Y., Zhou, L. X., Zhu, G. Y., Zhang, Y. J., Lu, X. F., Gong, J., Wang, S. Y., Herrera-Balandrano, D. D., Laborda, P., & Chen, X. (2024). Anti-biopellicula activity and in vivo efficacy of quinoline for the control of *Vibrio parahaemolyticus* in Chinese white shrimps. *Food Control*. 156(April 2023). 110118. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110118>
- Song., & Li. (2014). Shrimp immune system -special focus on Penaeidin. *Journal of Marine Science and Technology*. 22(1). <https://doi.org/10.6119/JMST-013-0813-1>
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and environmental microbiology*. 81(5). 1689-1699.

- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Montfort, G. R. C., Zenteno, E., Sánchez-Salgado, J. L., Vibanco-Pérez, N., & Aguilar Rendón, K. G. (2022) a. New insights into the mechanism of action of pirab from *Vibrio parahaemolyticus*. *Toxins*. 14(4). <https://doi.org/10.3390/toxins14040243>
- Soto-Rodriguez, S. A., Lozano-Olvera, R., Ramos-Clamont Montfort, G., Zenteno, E., Luis Sánchez-Salgado, J., Vibanco-Pérez, N., & Rendón Aguilar, K. G. (2022) b. PirAB from *Vibrio parahaemolyticus* exhibits a binary toxin action with bactericidal activity and cytotoxicity in *Penaeus vannamei*. *January*. <https://doi.org/10.20944/preprints202201.0200.v1>
- Soutourina, O. A., & Bertin, P. N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 27(4). 505–523. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00064-0)
- Stiger-Pouvreau, V., Jégou, C., Cérantola, S., Guérard, F., & Lann, K. Le. (2014). Phlorotannins in sargassaceae species from brittany (France): Interesting molecules for ecophysiological and valorisation purposes. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 71. Issue January 2019). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00013-5>
- Stirk, WA, Van Staden, J. Comparación de la actividad similar a la de las citoquininas y a las auxinas en algunos extractos de algas marinas de uso comercial. *J Appl Phycol* 8, 503–508 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF02186328>
- Stuepp, C. A., Wendling, I., Trueman, S. J., Koehler, H. S., & Zuffellato-Ribas, K. C. (2017). The use of auxin quantification for understanding clonal tree propagation. *Forests*, 8(1), 27.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Saputra, F. I., Alviredieta, U., Aditiawati, P., & Putri, S. P. (2021). The effect of feed supplementation with fermented red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) on growth and survival of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-larvae culture. *HAYATI Journal of Biosciences*. 28(4). 287–292. <https://doi.org/10.4308/HJB.28.4.286-392>
- Subasinghe, R., Alday-Sanz, V., Bondad-Reantaso, M. G., Jie, H., Shinn, A. P., & Sorgeloos, P. (2023). Biosecurity: Reducing the burden of disease. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(2), 397-426. <https://doi.org/10.1111/jwas.12966>
- Sun, J., Li, X., Qiu, Y., Xue, X., Zhang, M., Yang, W., Zhou, D., Hu, L., Lu, R., & Zhang, Y. (2022). Quorum sensing regulates transcription of the pilin gene mshA1 of MSHA pilus in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene*. 807(September 2021). 145961. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145961>
- Sun, M., Li, S., Lv, X., Xiang, J., Lu, Y., & Li, F. (2021). A lymphoid organ specific anti-lipopolysaccharide factor from *Litopenaeus vannamei* exhibits strong antimicrobial

- activities. *Marine Drugs*. 19(5). <https://doi.org/10.3390/md19050250>
- Swift, S., Allan, D., Whitehead, N., Barnard, A., Salmond, G., & Williams, P. (2001). (Vol. 45). Academic Press.
- Tamilselvan, M., & Raja, S. (2024). Exploring the role and mechanism of potential probiotics in mitigating the shrimp pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 103938. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103938>
- Tan, X., Qiao, J., Zhou, Q., Huang, D., Li, H., Wang, J., & Wang, X. (2021). Identification of a phosphoethanolamine transferase for lipid A modification in *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*. 125(January). 108033. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108033>
- Tang, J., Wang, W., & Chu, W. (2020). Antimicrobial and Anti-Quorum Sensing Activities of Phlorotannins From Seaweed (*Hizikia fusiforme*). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10(October). 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586750>
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & John Thomas. (2016). Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*. 464. 529-536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.001>
- Thi Ngoc Anh, N., Thanh Toi, H., & Van Hoa, N. (2023). Evaluating Artemia biomass and gut weed (*Ulva intestinalis*) meal as a dietary protein source for black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 49(1). 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.11.003>
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., .. & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*, 105(1), 45-55. <https://doi.org/10.3354/dao02621>
- Tran, N. T., Liang, H., Zhang, M., Bakky, M. A. H., Zhang, Y., & Li, S. (2022). Role of cellular receptors in the innate immune system of crustaceans in response to White Spot Syndrome Virus. *Viruses*. 14(4). 1–18. <https://doi.org/10.3390/v14040743>
- Tran, P., Kumar, V., & Bossier, P. (2020). Do acute hepatopancreatic necrosis disease-causing PirABVP toxins aggravate vibriosis? *Emerging Microbes and Infections*. 9(1). 1919–1932. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1811778>

- Truong, H. H., Hines, B. M., Emerenciano, M. G., Blyth, D., Berry, S., Noble, T. H., ., & Simon, C. J. (2023). Mineral nutrition in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, *15*(4), 1355-1373. <https://doi.org/10.1111/raq.12780>
- Tu, K. C., Long, T., Svenningsen, S. L., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2010). Negative feedback loops involving small regulatory rnas precisely control the *Vibrio harveyi* quorum-sensing response. *Molecular Cell*, *37*(4), 567–579. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.022>
- Ungureanu, C. M., Manca, A. M., Dumbrava, D., Raba, D., Petcu, C. D., Rivis, A., & Poiana, M. (2023). Freeze-dried extracts from blackberry processing by-products to enhance the antioxidant function of sunflower oil during high-temperature heating. *LXVI*(1).
- Vairappan, C. S., Daitoh, M., Suzuki, M., Abe, T., & Masuda, M. (2001). Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry*, *58*(2), 291-297. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00243-6)
- Van Overbeek, J. (1938). Distribución de auxinas en plántulas y su relación con el problema de la inhibición de yemas. *Botanical Gazette*, *100* (1), 133-166.
- Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gómez-Gil, B., Calderón, J., Sorgeloos, P., & Swings, J. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *J Appl Environ Microbiol*. 1999; *65* (6): 2592–2597.
- Veluchamy, C., & Palaniswamy, R. (2020). A review on marine algae and its applications. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. *13*(3). 21–27. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2020.v13i3.36130>
- Viana, F., Peringathara, S. S., Rizvi, A., & Schroeder, G. N. (2021). Host manipulation by bacterial type III and type IV secretion system effector proteases. *Cellular Microbiology*. *23*(11). 1–15. <https://doi.org/10.1111/cmi.13384>
- Vijayaram, S., Ringø, E., Zuorro, A., van Doan, H., & Sun, Y. (2023). Beneficial roles of nutrients as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture and Fisheries*. *January*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2023.02.001>
- Wang, C., Qi, M., Guo, J., Zhou, C., Yan, X., Ruan, R., & Cheng, P. (2021). The active phytohormone in microalgae: the characteristics, efficient detection, and their adversity resistance applications. *Molecules*, *27*(1), 46. <https://doi.org/10.3390/molecules27010046>
- Wang, C., Wei, M., Wu, G., He, L., Zhu, J., Juventus Aweya, J., Chen, X., Zhao, Y., Zhang, Y., & Yao, D. (2022). Proteomics analysis reveals a critical role for the WSSV immediate-early protein IE1 in modulating the host prophenoloxidase system.

Virulence. 13(1). 936–948. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2078471>

- Wang, D., Flint, S. H., Palmer, J. S., Gagic, D., Fletcher, G. C., & Stephen, L. (2022). Global expansion of *Vibrio parahaemolyticus* threatens the seafood industry : Perspective on controlling its biopelecula formation. *LWT*. 158(January). 113182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113182>
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., & Zhang, Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Molecular cell*, 8(6), 1207-1217. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00405-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00405-1)
- Wang, S., Li, H., Li, Q., Yin, B., Li, S., He, J., & Li, C. (2023). Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated Toll in response to bacterial infection in shrimp. *Frontiers in Immunology*. 14(February). 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1119879>
- Wang, Y., Wang, K., Huang, L., Dong, P., Wang, S., Chen, H., Lu, Z., Hou, D., & Zhang, D. (2020). Fine-scale succession patterns and assembly mechanisms of bacterial community of *Litopenaeus vannamei* larvae across the developmental cycle. *Microbiome*. 8(1). 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00879-w>
- Wu, J., Xiong, W., Liu, W., Wu, J., Ruan, R., Fu, P., Wang, Y., & Liu, Y. (2024). The effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth antioxidant capacity immunity and oxylipin profiles in *Acipenser dabryanus*. *Antioxidants*.
- Wu, M., Zhu, R., Lu, J., Lei, A., Zhu, H., Hu, Z., & Wang, J. (2020). Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. *Annals of Microbiology*. 70(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01588-3>
- Wu, Q., Li, X., Zhang, T., Zhang, M., Xue, X., Yang, W., Hu, L., Yin, Z., Zhou, D., Sun, Y., Lu, R., & Zhang, Y. (2022). Transcriptomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* underlying the wrinkly and smooth phenotypes. *Microbiology Spectrum*. 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02188-22>
- Wu, R., Patocka, J., Nepovimova, E., Oleksak, P., Valis, M., Wu, W., & Kuca, K. (2021). Marine invertebrate peptides: antimicrobial peptides. *Frontiers in Microbiology*. 12(December). 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.785085>
- Xie, C., Lee, Z. J., Ye, S., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. (2023). A review on seaweeds and seaweed-derived polysaccharides: Nutrition, chemistry, bioactivities, and applications. *Food Reviews International*, 40(5), 1312-1347. <https://doi.org/10.1080/87559129.2023.2212055>
- Xie, S., Wei, D., Fang, W., Yin, P., Liu, Y., Niu, J., & Tian, L. (2020). Survival and protein

- synthesis of post-larval White Shrimp. *Litopenaeus vannamei* were affected by dietary protein level. *Animal Feed Science and Technology*. 263(January). 114462. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114462>
- Xue, M., Gao, Q., Yan, R., Liu, L., Wang, L., Wen, B., & Wen, C. (2023). Comparative genomic analysis of shrimp-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* LC and intraspecific strains with emphasis on virulent factors of mobile genetic elements. *Microorganisms*. 11(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112752>
- Yaikhan, T., Chuerboon, M., Tippayatham, N., Atimuttikul, N., Nuidate, T., Yingkajorn, M., Tun, A. W., Buncherd, H., & Tansila, N. (2019). Indole and derivatives modulate biopeľicula formation and antibiotic tolerance of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Microbiology*. 59(4). 460–467. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00830-0>
- Yalçın, S., Okudan, E. Ş., Karakaş, Ö., & Önem, A. N. (2019). Identification and quantification of some phytohormones in seaweeds using UPLC-MS / MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 0(0). 1–10. <https://doi.org/10.1080/10826076.2019.1625374>
- Yalçın, S., Okudan, E. A., Karakaş, Ö., & Önem, A. N. (2020). Determination of major phytohormones in fourteen different seaweeds utilizing SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatographic Science*. 58(2). 98–108. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz074>
- Yan, P., Lin, C., He, M., Zhang, Z., Zhao, Q., & Li, E. (2022). Immune regulation mediated by JAK/STAT signaling pathway in hemocytes of Pacific white shrimps. *Litopenaeus vannamei* stimulated by lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 130(August). 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.048>
- Yang, F., Xu, L., Huang, W., & Li, F. (2022). Highly lethal *Vibrio parahaemolyticus* strains cause acute mortality in *Penaeus vannamei* post-larvae. *Aquaculture*. 548(P1). 737605. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737605>
- Yang, F., You, Y., Lai, Q., Xu, L., & Li, F. (2023). *Vibrio parahaemolyticus* becomes highly virulent by producing Tc toxins. *Aquaculture*. 576(February). 739817. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739817>
- Yang, M., Liang, Y., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, H., Ye, Y., Gao, X., Wu, Q., and Tan, Z. (2020) Isolation and Characterization of the Novel Phages vB_VpS_BA3 and vB_VpS_CA8 for Lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 11:259. doi: 10.3389/fmicb.2020.00259
- Yang, Q., & Defoirdt, T. (2015). Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environmental Microbiology*. 17(4). 960–968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12420>

- Yang, Q., Pande, G. S. J., Wang, Z., Lin, B., Rubin, R. A., Vora, G. J., & Defoirdt, T. (2017). Indole signalling and (micro) algal auxins decrease the virulence of *Vibrio campbellii*, a major pathogen of aquatic organisms. *Environmental microbiology*, 19(5), 1987-2004. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13714>
- Yildiz, M. (2007). E-government research: Reviewing the literature, limitations, and ways forward. *Government Information Quarterly*, 24(3), 646-665. <https://doi.org/10.1016/j.giq.2007.01.002>
- Yu, Y., Tang, M., Wang, Y., Liao, M., Wang, C., Rong, X., ., & Zhang, Z. (2023). Virulence and antimicrobial resistance characteristics assessment of *Vibrio* isolated from shrimp (*Penaeus vannamei*) breeding system in south China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 252, 114615. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114615>
- Yuan, H., Song, W., Tan, J., Zheng, Y., Wang, H., Shi, L., & Zhang, S. (2023). The Effects of Dietary Protein Level on the Growth Performance. Body Composition. Intestinal Digestion and Microbiota of *Litopenaeus vannamei* Fed *Chlorella sorokiniana* as the Main Protein Source. *Animals*. 13(18). <https://doi.org/10.3390/ani13182881>
- Yudiati, E., Isnansetyo, A., & Handayani, C. R. (2016). Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 54, 46-53.
- Zan, Z., Mao, Q., Han, Z., & Sun, J. (2023). Changes in the intestinal microbiota of farmed northern sheatfish (*Silurus soldatovi*) associated with natural bacterial infection. *Journal of the World Aquaculture Society*. 54(6). 1575–1591. <https://doi.org/10.1111/jwas.13000>
- Zhang, Y.B., Li, Y., & Sun, X.L., (2011). Antibiotic resistance of bacteria isolated from shrimp hatcheries and cultural ponds on Donghai Island. China. *Marine Pollution Bulletin*. 62(11). 2299–2307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.048>
- Zhang, M., Cai, L., Luo, X., Li, X., Zhang, T., Wu, F., Zhang, Y., & Lu, R. (2023) a. Effect of sublethal dose of chloramphenicol on biopellicula formation and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 14(September). 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1275441>
- Zhang, M., Xue, X., Li, X., Wu, Q., Zhang, T., Yang, W., Hu, L., Zhou, D., Lu, R., & Zhang, Y. (2023) b. QsvR and OpaR coordinately repress biopellicula formation by *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*. 14(February). 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1079653>
- Zhang, S., Yang, Q., & Defoirdt, T. (2021). Indole decreases the virulence of pathogenic vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Journal of Applied Microbiology*. 132(1). 167–176. <https://doi.org/10.1111/jam.15227>

- Zhang, S., Zhang, W., Liu, N., Song, T., Liu, H., Zhao, X., Xu, W., & Li, C. (2017). Indole reduces the expression of virulence related genes in *Vibrio splendidus* pathogenic to sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Microbial Pathogenesis*, 111, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.032>
- Zhang, W., Yamasaki, R., Song, S. y Wood, TK (2019). La señal indol entre reinos inhibe el despertar de las células persistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*, 127 (6), 1768-1775., <https://doi.org/10.1111/jam.14434>
- Zhang, X., Sun, J., Chen, F., Qi, H., Chen, L., Sung, Y. Y., Huang, Y., Lv, A., & Hu, X. (2021). Phenotypic and genomic characterization of a *vibrio parahaemolyticus* strain causing disease in *Penaeus vannamei* provides insights into its niche adaptation and pathogenic mechanism. *Microbial Genomics*, 7(5). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000549>
- Zhang, Y., Liu, H., Gu, D., Lu, X., Zhou, X., & Xia, X. (2020). Transcriptomic analysis of PhoR reveals its role in regulation of swarming motility and T3SS expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiological research*, 235, 126448. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126448>
- Zhang, Y. Zhang, L., Hou, S., Huang, X., Sun, F., & Gao, H. (2016). The Master *Quorum-Sensing* Regulator OpaR is Activated Indirectly by H-NS in *Vibrio parahaemolyticus*. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1018-8>
- Zhao, Y., Wang, H. P., Han, B., & Yu, X. (2019). Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: A review. *Bioresource technology*, 274, 549-556.
- Zhou, H., Chen, X., Aweya, J. J., Zhao, Y., Yao, D., & Zhang, Y. (2021). Interaction of *Penaeus vannamei* hemocyanin and $\alpha 2$ -macroglobulin modulates the phenoloxidase activity. *Molecular Immunology*, 138(August), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.08.011>
- Zidan, S., Eid, A., Ali, M., & Sharawy, Z. (2021). Effect of using different levels of *Spirulina platensis* on growth performance of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 24(3), 431–437. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2021.210843>
- Zorriehzahra, M., & Banaederakhshan, R. (2015). Early mortality syndrome (ems) as new emerging threat in shrimp industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3, 64-72. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.64.72>
- Zuo, H., Weng, K., Luo, M., Yang, L., Weng, S., He, J., & Xu, X. (2020). A MicroRNA-1–Mediated Inhibition of the NF- κ B Pathway by the JAK-STAT Pathway in the Invertebrate *Litopenaeus vannamei* . *The Journal of Immunology*, 204(11), 2918–2930. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000071>

ANEXOS O APÉNDICES

LISTA DE PUBLICACIONES


Optimized swarming motility assay to identify anti-virulence products against *Vibrio parahaemolyticus*, a pathogen of farmed shrimp.

En línea: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215016124000761>

Exploration of Virulence Factors in *Vibrio Parahaemolyticus* in *Penaeus Vannamei* Shrimp: A Bibliometric Analysis. Sometido en Academic Journal of Interdisciplinary Studies, y aceptado para publicación en el Vol 13 No 5 September 2024. En línea:

<https://www.richtmann.org/journal/index.php/ajis/article/view/13996>

Anexo 1. Resultados del análisis histopatológico de la prueba con extractos ricos en IAA

																			 Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas				
Tratamiento: Tiempo 0 (H139)		REPORTE DE HISTOLOGIA																					
Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Organo linfoide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
		1	Normal																				
2	Necrosis												3									2	
3	Normal																						
3	Normal																						
4	Normal																						
5	Normal																						
6	Normal																						
7	Normal																						
8	Necrosis												2										
9	Normal																						
10	Normal																						
11	Necrosis												2										
12	Normal																						
13	Necrosis												2									2	
14	Normal																						
15	Normal																						
16	Normal																						
Valor																							
	Grado de lesión en órganos y/o tejidos examinados																						
1	Muy leve																						
2	Leve																						
3	Media																						
4	Severa																						

Tratamiento: *Sargassum natans* 10 µg/L (H140 - T1)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Organos y Tejidos													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfoide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pericópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis																2							
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis																3							
3	Necrosis																3							
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3												
	Necrosis															2								
	Bacterias filamentosas																	3						
5	Necrosis																				3			
	Bacterias																					3		
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Bacterias											4							4					
	Necrosis																				4			
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Bacterias											4							4					
	Necrosis																				4			
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis																				4			
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis																			3				
	Bacterias	4																	4					
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Bacterias filamentosas																		4					
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
12	Necrosis (Sin cabeza)																	4						
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis															4	4				4			
14	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3												

Tratamiento: *Sargassum natans* 20 µg/L (H141 - T2)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección Bacteriana												4										
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Bacterias Necrosis												4				4	3					
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias												4					4			4		
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias												4					4			4		
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias												4					4			4		
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección Bacteriana Necrosis Bacterias												4					4			4		
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias												4					4			4		
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección Bacteriana Necrosis												4					4			4		
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis												4					4					
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis												3								4		
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias												4					4			4		
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
14	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias filamentosas												3					4			3		
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										

Tratamiento: *Padina gymnospora* 10 µg/L (H142 - T3)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	4																4						
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	4																						
	Bacterias	4																						
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			
	Bacterias																							
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			
14	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
16	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis	3															3				3			

Tratamiento: *Padina gymnospora* 20 µg/ L (H143 - T4)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales											Observaciones									
		Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas		Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino
1	Túbulos hipertrofiados											2										
2	Necrosis (Sin cabeza)															2						
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4			4	3			4			
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Bacterias											4			4							
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4			4	3			4			
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4							4			
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis Bacterias		4												4				4			
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4				3						
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4				3			4			
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infeccion Bacteriana Necrosis											4						4		4		
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4							4			
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											4							4			
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4										
14	Necrosis (Sin cabeza)		3															3		3		

Tratamiento: Indole-3-acetic acid sintético 10 µg/ L (H144 - T5)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	Observaciones
1	Infección Bacteriana																3		4				
2	Infección Bacteriana																		4				
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis															4			4		4		
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis															4							
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										

Tratamiento: Indole-3-acetic acid sintético 20 µg/ L (H145 - T6)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	Observaciones
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																				3		
	Bacterias												4						4				
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis		3														2				3		
	Bacterias			4																			
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																				4		
	Bacterias			4																		4	
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																				4		
	Bacterias			4																			
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias																						
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias																3	4					
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																				4		
	Bacterias																				4		
	Bacterias filamentosas																				4		
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																					4	
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																4						
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																					4	
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias			4																	4		
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																					3	
14	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																4						
	Bacterias filamentosas																		4				
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
16	Bacteria (Sin cabeza)																				4	4	
17	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																					4	
	Bacterias			4																			
18	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																3	4	4			4	

Tratamiento: Control positivo (H146 - T7)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfoide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																3		4				
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						
	Bacterias				3															3		4	
	Bacterias filamentosas																			3			
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias filamentosas																						3
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4
	Bacterias																						4
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacteria																						4
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4
	Bacterias																						4
	Bacterias filamentosas																						4
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4
14	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						3
																							3
																							3
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
16	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
17	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																						4

Tratamiento: Control negativo (H147 - T8)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis											3											3	
2	Necrosis											3												
3	Normal																							
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
5	Necrosis																2							
6	Necrosis																2							
7	Normal																							
8	Necrosis											3				3								
9	Necrosis											2												
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3												
11	Normal																							
12	Necrosis											2				2								
13	Necrosis											3												
14	Necrosis																	4						
15	Necrosis (Sin cabeza)																					4		
16	Normal																							
17	Necrosis (Sin cabeza)																						3	

Anexo 2. Resultados del análisis histopatológico de la prueba con extractos crudos



Tratamiento: Tiempo 0 (H201)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Perciópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
1	Necrosis Infección bacteriana Bacterias															2		2				
2	Normal																					
3	Infección bacteriana Bacterias		2															3				
4	Bacterias		3																			
5	Bacterias filamentosas																		3			
6	Normal																					
7	Necrosis															2						
8	Necrosis Infección bacteriana															2		2				
9	Bacterias filamentosas																	3				
10	Normal																					
11	Normal																					
12	Túbulos hipertrofiados Bacterias filamentosas											3							3			
13	Necrosis Túbulos hipertrofiados											2								3		
14	Infección bacteriana Necrosis		2													2						
15	Necrosis Bacterias															3		3				
16	Necrosis															3						
17	Necrosis Infección bacteriana		2													3						
18	Túbulos hipertrofiados Bacterias Necrosis											3								3	4	
19	Túbulos hipertrofiados											3										
20	Túbulos hipertrofiados Necrosis											3				2						

Valor	Grado de lesión en órganos y/o tejidos examinados
1	Muy leve
2	Leve
3	Media
4	Severa

Tratamiento: *Padina gymnospora* 14 ppm (H202 - T1)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones								
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino
1	Infección bacteriana															3							
	Bacterias																	3					
	Bacterias filamentosas																	3					
2	Túbulos hipertrofiados											4						2					
	Necrosis															3					4		
	Bacterias																				4		
3	Necrosis																				2		
4	Bacterias				4																		
	Necrosis										2					2					4		
5	Túbulos hipertrofiados										3												
	Bacterias																	4				3	
	Necrosis															3					3		
6	Túbulos hipertrofiados										3												
	Bacterias filamentosas																			3			
7	Infección bacteriana															3		3					
	Necrosis															3		3			3		
	Bacterias																					4	
8	Infección bacteriana		2																				
	Bacterias filamentosas																		3				
	Necrosis										2										4		
9	Túbulos hipertrofiados										3												
10	Túbulos hipertrofiados			2							3												
11	Bacterias filamentosas																			4			
12	Infección bacteriana															2							
	Bacterias																		3			4	
	Necrosis										2										3		
13	Bacterias				3																	4	
	Necrosis						3														4		
14	Necrosis										2										2		
15	Necrosis															3							
16	Túbulos hipertrofiados										2												
	Bacterias																					3	
	Necrosis															3					3		
	Bacterias filamentosas																		3				
17	Infección bacteriana																	3					
	Necrosis										2												
18	Necrosis							4			2					3	2						

Tratamiento: *Padina gymnospora* 1,4 ppm (H203 - T2)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones								
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino
1	Normal																						
2	Túbulos hipertrofiados											2											
3	Normal																						
4	Necrosis											2			3						2		
5	Infección bacteriana	3													3								
	Necrosis																				3		
6	Normal																						
7	Infección bacteriana		2														2						
	Bacterias filamentosas		3																				
	Necrosis														3								
8	Bacterias																			3			
9	Infección bacteriana		3																	3			
10	Infección bacteriana															3				3			
11	Infección bacteriana		3																	3			
12	Necrosis											2			2						4		
13	Túbulos hipertrofiados											2											
14	Necrosis																				2		
15	Bacterias	2																					

Tratamiento: *Padina gymnospora* 0,14 ppm (H204 - T3)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	
0	Normal																							H204 - T3 Pad 0,14 ppm
2	Infección bacteriana Bacterias				4														2					
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
4	Infección bacteriana Necrosis Bacterias											2								3				
																				4				
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección bacteriana											4								3				
6	Túbulos hipertrofiados Bacterias filamentosas											2									3			
7	Túbulos hipertrofiados Bacterias Bacterias filamentosas											2									3			
																				3				
8	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados Necrosis											2								2			4	
9	Infección bacteriana Bacterias Necrosis												3							3				
													2											
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
11	Infección bacteriana Bacterias Necrosis				3															2				
													2											
12	Infección bacteriana Bacterias filamentosas Túbulos hipertrofiados Necrosis				3																			
					3																			
												3											3	
												2												
13	Infección bacteriana Bacterias																			3				
																				4				
14	Normal																							
15	Normal																							
16	Bacterias				4																			
17	Necrosis Bacterias											2								3			4	
																							4	

Tratamiento: *Sargassum natans* 14 ppm (H205 - T4)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones								
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pericópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino
1	Necrosis Bacterias				4			3				2											
2	Túbulos hipertrofiados											3											
3	Túbulos hipertrofiados											3											
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Bacterias				4																	4	
	Necrosis																						
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Infección bacteriana															2							
	Necrosis															2					3		
	Bacterias																					4	
6	Necrosis											3											
7	Necrosis											3											
8	Túbulos hipertrofiados											3											
9	Infección bacteriana															3							
	Necrosis											3											
10	Infección bacteriana															2							
	Túbulos hipertrofiados											2											

Tratamiento: *Sargassum natans* 1,4 ppm (H206 - T5)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	
1	Normal																							
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Bacterias																		4					
	Necrosis																		4					
3	Túbulos hipertrofiados											2												
	Necrosis											3												
4	Necrosis											3												
	Infección bacteriana																		2					
5	Infección bacteriana		3																	2				
	Bacterias		3																					
6	Normal																							
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis																	3			3			
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
	Necrosis								4												4			
	Bacterias							4																
9	Normal																							
10	Infección bacteriana											2				3	3		3					
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4												
12	Túbulos hipertrofiados											4												
13	Túbulos hipertrofiados											3												
14	Necrosis											2												
15	Túbulos hipertrofiados											3												
16	Necrosis											2												
17	Túbulos hipertrofiados											3												

Tratamiento: *Sargassum natans* 0,14 ppm (H207 - T6)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	
1	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados							3					3						3					
2	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados												3						3					
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis							3					4											
4	Túbulos hipertrofiados												3											
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección bacteriana Bacterias filamentosas Necrosis Bacterias		3										4					3		4				
6	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados												3				2							
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Necrosis							3					4						4		4			
8	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados												3						3					
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección bacteriana Necrosis Bacterias												4				3				4			4
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND) Infección bacteriana Bacterias filamentosas												4				3		4					
11	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados Necrosis												3				3							4

Tratamiento: *Thalassiosira weissflogii* 14 ppm (H208 - T7)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Periópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
1	Infección bacteriana																2						
	Bacterias filamentosas		3																				
	Necrosis												2									3	
	Bacterias		3																				
2	Infección bacteriana							2															
	Bacterias filamentosas		3																				3
	Necrosis												2										
	Bacterias																						3
3	Infección bacteriana																						3
	Bacterias filamentosas																						3
	Bacterias																						3
4	Infección bacteriana													2									
	Necrosis													2									2
	Bacterias		4																				
5	Necrosis													2				3					3
	Bacterias																						3
6	Infección bacteriana																	2					
	Necrosis												2										2
7	Infección bacteriana		2																				
	Bacterias filamentosas																						3 4
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													4									
	Infección bacteriana																						3
	Necrosis							4															4
	Bacterias			4																			
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													4									
	Infección bacteriana																						3
	Necrosis							3															4
	Bacterias			4																			
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													4									
	Infección bacteriana																						3
	Necrosis							4															4
	Bacterias			3																			4
11	Infección bacteriana																						2
	Bacterias filamentosas																						3
	Bacterias																						3
	Necrosis												2										2
12	Normal																						
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													4									
	Infección bacteriana		3																				
	Necrosis																						4 4 4
14	Normal																						
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													3									
	Necrosis																						3
16	Infección bacteriana																						2
	Necrosis													3									4
17	Necrosis													2									
18	Infección bacteriana																						3
	Bacterias filamentosas																						3
19	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)													4									
	Bacterias filamentosas																						4
	Necrosis																						2
	Bacterias																						4

Tratamiento: *Thalassiosira weissflogii* 1,4 ppm (H209 - T8)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glandula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereópodos	Cutícula	Epitelio intestinal	Intestino	Observaciones
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Infección bacteriana	2																	3				
	Bacterias filamentosas																						
2	Necrosis												3										
	Bacterias				4																		
3	Túbulos hipertrofiados												3										
	Bacterias filamentosas		3																				
	Necrosis												2										
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana		2																				
	Bacterias filamentosas																		4				
5	Túbulos hipertrofiados												4										
	Necrosis																				4		
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																		4				
	Bacterias filamentosas	4																					
	Necrosis																	3					
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis							4														3	
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana	4																	3				
	Necrosis																	3				3	
11	Túbulos hipertrofiados												3										
	Bacterias filamentosas																				3		
	Necrosis																					4	
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias filamentosas																				4		
	Necrosis							4															
	Bacterias							4															

Tratamiento: *Thalassiosira weissflogii* 0,14 ppm (H210 - T9)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	
1	Túbulos hipertrofiados												4											
2	Normal																							
3	Túbulos hipertrofiados Infección bacteriana Necrosis	3											3				3							
4	Normal																							
5	Bacterias filamentosas Necrosis Bacterias						3					2								3				
6	Túbulos hipertrofiados											2												
7	Túbulos hipertrofiados											4												
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3												
9	Necrosis											3												
10	Infección bacteriana Túbulos hipertrofiados											4						3						
11	Túbulos hipertrofiados											3												

Tratamiento: *IsochrYSIS galbana* 14 ppm (H211 - T10)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA											Observaciones									
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Hepatopáncreas		Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis															3						
	Bacterias filamentosas																3			3		
2	Necrosis										2											
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										3											
	Bacterias filamentosas																4					
	Necrosis																			3		
	Bacterias																4					
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis															3						
	Bacterias																			4		
	Bacterias filamentosas																			4		
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis															3				4		
	Bacterias															4			3		4	
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis							4								3						
	Bacterias							4			4					4						
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Infección bacteriana								3							3						
	Necrosis																		4			
	Bacterias										4											
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										3											
	Bacterias										4								4	4		
	Necrosis																		4			
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										3											
	Infección bacteriana																			3		
	Bacterias filamentosas																		4			
	Bacterias				4														4			
	Necrosis															4						
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis															4						
	Bacterias															4			4	4		
11	Necrosis										2										3	
12	Infección bacteriana																			3		
	Necrosis										2											
	Bacterias																		4			
13	Bacterias filamentosas																			3		
	Necrosis										2											
14	Túbulos hipertrofiados										4											
	Necrosis							3								3	4					
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										3											
	Infección bacteriana																			4		
	Necrosis															3	3					
	Bacterias															3			3			
16	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis															3			3			
	Bacterias																		3			
17	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										4											
	Necrosis																		3			
18	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)										3											
	Necrosis																			3		
	Bacterias																			3		
19	Túbulos hipertrofiados										4											
	Necrosis															3			3			
	Bacterias										3											

Tratamiento: *Isochrysis galbana* 1,4 ppm (H212 - T11)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	REPORTE DE HISTOLOGIA													Observaciones								
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón		Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3											
	Necrosis															3						4	
	Bacterias											4										4	
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											3											
	Infección bacteriana															4							
	Bacterias filamentosas																	3					
	Necrosis																	3				4	
	Bacterias																4						
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Necrosis																	3				4	
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Infección bacteriana																3						
	Necrosis																4						
	Bacterias											4					4						
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Necrosis								4							4		4			4		
	Bacterias											4				4		4					
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Necrosis		3														4						
	Bacterias											4											
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Necrosis																4					4	
	Bacterias											4					4						
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)											4											
	Infección bacteriana		4																				
	Bacterias filamentosas																				3		
	Necrosis																4						
	Bacterias		4																			4	

Tratamiento: *Isochrysis galbana* 0,14 ppm (H213 - T12)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices bucales	Branquias	Glándula aneal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Organo linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pericápiculos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	Observaciones
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias filamentosas																4						
	Necrosis																3				4		
	Bacterias												4			4						4	
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																3						
	Bacterias												4										
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias filamentosas																				3		
	Necrosis																3						
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																3						
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Bacterias filamentosas																			3			
6	Necrosis												2										
	Túbulos Hipertrofiados												2										
7	Necrosis												2										
	Infección bacteriana		3																				
	Bacterias																			4			
8	Necrosis												3				2						
9	Necrosis												2										
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Necrosis																3						
11	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Infección bacteriana		3																				
	Necrosis																3						
12	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Infección bacteriana																3						
13	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Infección bacteriana																3						
14	Infección bacteriana																			3			
	Necrosis											2								4	4		
	Bacterias																		4	4			
15	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana		4														3						
	Bacterias		4																				
16	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana		3																	3			
	Bacterias filamentosas																				4		
	Necrosis																					4	
	Bacterias		4										4										
17	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Bacterias filamentosas																			3	4		
	Necrosis						4													4		4	
	Bacterias																		4				
18	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																			4			
	Bacterias filamentosas																3			3	3		
	Necrosis																						
19	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																			3			
20	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																4			3			
	Bacterias filamentosas																				3		
	Necrosis																						
	Bacterias																4						

Tratamiento: Control positivo (H214)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Anatomía											Observaciones										
		Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide		Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Pereiópodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino
1	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Infección bacteriana																3						
	Necrosis																					4	
2	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Necrosis																4					4	
3	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																						
	Bacterias																						
4	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)																						
	Bacterias																						4
	Necrosis																3					4	
5	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Bacterias																						3
	Necrosis																3		3				
6	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)																						
	Infección bacteriana																						
	Bacterias																						4
7	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Bacterias filamentosas																						3
	Necrosis																					3	
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Bacterias																						4
	Necrosis																						3
9	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												3										
	Necrosis																						4
10	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Infección bacteriana																						3
	Bacterias filamentosas																						3
	Necrosis																						4
	Bacterias																						4

Tratamiento: Control negativo (H215)

REPORTE DE HISTOLOGIA

Número de Camarones / Larvas	Lesiones y/o agentes infecciosos asociados	Apéndices Bucales	Branquias	Glándula antenal	Estómago	Filtro Gástrico	Mandíbula	Epitelio de estómago	Tejido hematopoyético	Tejido conectivo de estómago	Ceca anterior	Órgano linfóide	Hepatopáncreas	Corazón	Gónadas	Epitelio general del cuerpo	Músculo	Cordón nervioso	Perciòpodos	Cutícula	Epitelio intestino	Intestino	Observaciones
1	Infección bacteriana	3																					
	Necrosis																3						
2	Normal																						
3	Necrosis												3										
4	Infección bacteriana																		3				
	Necrosis																3				4		
5	Infección bacteriana																3		3				
	Necrosis												3										
6	Infección bacteriana																		3				
	Necrosis																					4	
	Bacterias																					4	
7	Necrosis	3												3					3				
	Bacterias			4																			
8	Enfermedad de la Necrosis Aguda de Hepatopáncreas (AHPND)												4										
	Necrosis																					4	
	Bacterias																					4	4
9	Infección bacteriana																3		3				
	Necrosis												3										
10	Infección bacteriana																3						
	Necrosis												3										