

Review

Manano oligosacáridos como prebióticos en acuicultura de crustáceos

Oreste Gainza¹ & Jaime Romero²

¹Doctorado en Acuicultura, Programa Cooperativo Universidad de Chile

Universidad Católica del Norte, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

²Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)

Universidad de Chile, Santiago, Chile

Corresponding author: Oreste Gainza (ogainzar@gmail.com)

RESUMEN. Los prebióticos tienen el potencial de incrementar la eficiencia y sostenibilidad de la producción acuícola. Uno de los prebióticos más promisorios en acuicultura son los Manano oligosacáridos (MOS). Estos MOS son moléculas de carbohidratos complejos derivados de la pared de la célula de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que impiden la adhesión de patógenos bacterianos porque actúan bloqueando la adherencia de las lectinas microbianas con los carbohidratos presentes en la superficie de las células intestinales. Esta prevención de la adhesión impide la colonización y proceso infectivo de los patógenos. La ventaja del uso de MOS es que puede prevenir infecciones a través de mecanismos diferentes a los utilizados por los antibióticos. Este artículo muestra los avances obtenidos en uso de MOS como prebióticos en la acuicultura, en particular en el cultivo de crustáceos, donde han generado respuestas positivas en todas las experiencias actuando sobre el incremento del crecimiento, la supervivencia, modulando la respuesta inmune y modificando la morfología del tracto digestivo. La identificación de las cepas que son promovidas o excluidas y la caracterización de la acción moduladora en la microbiota resultante quedan abiertas como uno de los campos a desarrollar en conjunto con la extensión de estos resultados a la práctica productiva.

Palabras clave: crustáceos, manano oligosacáridos, MOS, prebióticos, microbiota, crecimiento.

Mannan oligosaccharides as prebiotics in crustacean aquaculture

ABSTRACT. Probiotics have the potential to increase the efficiency and sustainability of aquaculture production. The mannan-oligosaccharides (MOS) are complex carbohydrates derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which act by blocking adherence of bacterial lectins to carbohydrates on the surface of intestinal cells; this action prevents colonization and infection processes carried out by bacterial pathogens. In this work, we review the current evidence about the use of MOS as prebiotics in shellfish aquaculture, enlightening the positive responses in most of the experiences, such as improvement in growth and survival, modulating the immune response and modifying the morphology of the digestive tract. The identification of strains that are promoted or excluded, and the characterization of the resulting modulating action in gut's microbiota, remains open as one of the fields to be developed in conjunction with the extension of these results to the productive practice.

Keywords: crustaceans, mannan oligosaccharides, MOS, prebiotics, microbiota, growth.

INTRODUCCIÓN

La producción acuícola es vulnerable a los efectos adversos de las enfermedades y las condiciones ambientales, que pueden afectarla diferencialmente de acuerdo a la zona geográfica, sistemas de cultivo y especies objetivo. En el caso de la acuicultura de camarones peneidos, el desarrollo de nuevos sistemas de cultivos orientados a la intensificación de sistemas

de cultivo con cero recambio, en condiciones de invernadero permite reducir el riesgo de ingreso y diseminación de patógenos al tiempo que proporciona los beneficios nutricionales de la productividad natural en estanques naturales (Burford *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2006; Ballester *et al.*, 2010). El control sobre las condiciones ambientales del cultivo también ha permitido expandir el cultivo a áreas geográficas no tradicionales y cultivar durante todo el

año (Wasielensky *et al.*, 2006). En los últimos años el salmón del atlántico chileno, las ostras y el cultivo de camarones en varios países de Asia, América del Sur y África se han visto afectadas por brotes de enfermedades que causaron pérdidas parciales y en algunos casos más dramáticos, la pérdida total de la producción (FAO, 2012). En estos casos las estrategias tradicionales de control como el uso de antibióticos se han visto sobrepasadas. Este contexto ha motivado el interés por el desarrollo de productos alternativos que se pueden utilizar para la gestión de la salud y control de enfermedades, ajustándose al desarrollo de las regulaciones medioambientales y a las restricciones de los mercados objetivos (Reverter *et al.*, 2014).

La producción global de crustáceos acuícolas consiste principalmente en crustáceos decápodos, incluyendo camarones, cangrejos y langostas ha crecido a un promedio de 16% anual desde 1950, hasta 6.915.072 ton el 2014 de las cuales el 53% corresponde al cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei* (FAO, 2016). La industria de este camarón es importante en regiones como el sur y sudeste de Asia, convirtiéndose en uno de los más importantes rubros económicos de la acuicultura a nivel mundial. En América Latina existe una importante industria acuícola de *P. vannamei* donde destacan las producciones de Ecuador, México, Honduras y Brasil (Bondad-Reantaso *et al.*, 2012).

El éxito de los cultivos acuícolas está fuertemente condicionado por el estado de salud de las especies acuáticas cultivadas, que está influenciado por las interacciones entre medio ambiente, patógenos y hospedador. En los sistemas de producción de crustáceos, muchos patógenos potenciales, como bacterias, hongos y virus coexisten, sin causar un impacto negativo en la producción, debido al equilibrio en los factores de la Triada epidemiológica (Martín *et al.*, 1987). Sin embargo, cualquier alteración de estos factores puede desencadenar enfermedades agudas que provocan pérdidas significativas para la industria (Flegel & Pasharawipas, 1998; Moriarty, 1999; Cappy *et al.*, 2000; Spann *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2013).

El empleo masivo de antibióticos para controlar los brotes de enfermedades bacterianas en los cultivos acuícolas ha suscitado la preocupación de los consumidores por la aparición potencial de bacterias resistentes a los antibióticos. Este fenómeno subyace en la presión selectiva ejercida por la presencia de residuos de antibióticos en fondos, sedimentos, especies de cultivo y silvestres expuestas involuntariamente (Miranda & Zemelman, 2002; Holmström *et al.*, 2003; Miranda & Rojas, 2007; Gainza, 2009; Fernández-Alarcón *et al.*, 2010; Hoa *et al.*, 2011; Ringø *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2016). Esta situación ha limitado

la eficiencia de los antibióticos como herramienta en el manejo de la salud de los cultivos (Moriarty, 1999; Miranda & Rojas, 2007; Reverter *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2016), al tiempo que se han generado numerosas iniciativas legales tanto en los países productores como en los principales mercados objetivo, para regular su empleo, debido a las implicaciones ambientales y en la salud humana que han generado su mal manejo (Miranda & Zemelman, 2002; Romero *et al.*, 2012; Reverter *et al.*, 2014).

Las superficies epiteliales de vertebrados e invertebrados incluidos los crustáceos, son colonizadas por un gran número de microorganismos al nacer, que establecen relaciones de comensalismo con sus hospederos; a este grupo de microorganismos se les denomina microbiota o más recientemente microbioma (Spor *et al.*, 2011). La microbiota se ha definido como la comunidad de microorganismos presentes en la mayoría de los individuos de una población o una especie que, a pesar del contacto continuo con diferentes tejidos, no causan daño a su hospedero (Berg, 1996). La mayoría de estos microorganismos residen en el tracto digestivo, donde influyen en una amplia gama de procesos biológicos que generan efectos benéficos al hospedero. Como por ejemplo, su aporte en la nutrición complementando procesos de digestión, contribuyendo con vitaminas, jugando un papel protector al prevenir la colonización por patógenos, controlando su crecimiento, competición por nutrientes, competencia por exclusión, producción de sustancias antimicrobianas y modulación del sistema inmune del hospedero (Verschuere *et al.*, 2000; Rawls *et al.*, 2004; Chabrállón *et al.*, 2005; Ringø *et al.*, 2006; Hovda *et al.*, 2007; Brestoff & Artis, 2013; Huang *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2014; Rungrassamee *et al.*, 2014).

El rol esencial de la microbiota intestinal en la salud del hospedero, ha generado un amplio interés en modular su composición y función metabólica. Numerosas estrategias, han sido desarrolladas para modificar la microbiota intestinal, permitiendo la colonización de bacterias benéficas e impidiendo la colonización de bacterias patógenas mediante suplementos en el alimento. Estos suplementos pueden ser i) probióticos; definidos por Merrifield *et al.* (2010) como cualquier célula microbiana suministrada a través de la dieta o el agua de cultivo que beneficie al cultivo, al productor o al consumidor y al menos, mejorando el equilibrio microbiano del cultivo; ii) prebióticos, definidos por Bindels *et al.* (2015), como un compuesto no digerible que, a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, modula la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere un efecto beneficioso en el hospedero como mejora del

crecimiento y eficiencia de la alimentación (Ringø *et al.*, 2014); iii) simbióticos, los que de acuerdo a Gibson & Roberfroid (1995), son suplementos nutricionales que contienen tanto un prebiótico como un probiótico que trabajan juntos y afectan de manera beneficiosa al huésped mejorando la supervivencia e implantación de suplementos dietéticos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, los prebióticos se presentan como alternativas promisorias, ambientalmente amigables, en la prevención de enfermedades, especialmente en la acuicultura de crustáceos.

Prebióticos

Los prebióticos definidos como “un compuesto no digerible que, a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, modula la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, lo que confiere un efecto fisiológico beneficioso en el hospedero” (Bindels *et al.*, 2015).

Dada la alta variación de la estructura anatómica del tracto gastrointestinal en animales acuáticos, Lauzon *et al.* (2014) proponen que los prebióticos deben:

- no ser ni hidrolizados ni absorbidos en la parte anterior del tracto gastrointestinal, *e.g.*, Oligosacáridos No Digeribles (NDO) cuyos enlaces glicosídicos son resistentes a las enzimas digestivas del tracto intestinal (Gibson & Fuller, 2000).
- mejorar el balance de la microbiota intestinal a favor de una composición más saludable que sin prebiótico.
- Inducir efectos beneficiosos en el hospedero como mejorar la digestibilidad de nutrientes, resistencia a las enfermedades, la inmunidad no específica, la morfología intestinal, supervivencia y crecimiento.

Los prebióticos ejercen su acción a través de la modulación de la composición de la microbiota intestinal. De esta forma, estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas reportadas en peces, moluscos y crustáceos, como *Lactobacillus* (Li *et al.*, 2007; Kongnum & Hongpattarakere, 2012), mientras que limita la presencia de bacterias potencialmente patógenas, como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Streptococcus* (Zhou *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014). Otros efectos de los prebióticos, como la modulación del sistema inmune, se pueden considerar indirectos porque son mediados por los cambios promovidos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal (De Vrese & Schrezenmeir, 2008; Bindels *et al.*, 2015)

La disponibilidad de enfoques moleculares modernos, han revelado que los prebióticos establecidos no son tan específicos como se suponía anteriormente (Bindels *et al.*, 2015). Un mecanismo clave por el cual se considera que los prebióticos ejercen beneficios para

la salud del hospedero, es la producción de ácidos grasos de cadena corta (scFAs), por la microbiota. Estos scFAs presentan actividad antimicrobiana, reducen el pH intestinal y de esta forma excluyen bacterias patógenas (Gibson & Roberfroid, 1995; Bindels *et al.*, 2013). Evidencia el enfoque inicial de que los prebióticos promueven selectivamente cepas de bifidobacterias y lactobacilos, y se debilita la base para incluir en el concepto de prebiótico, el requisito de la fermentación por taxones selectivos. Esto en vista que los carbohidratos y los prebióticos que son generalmente fermentados confieren similares beneficios fisiológicos al hospedero, probablemente inducidos a través de mecanismos equivalentes (síntesis bacteriana de scFAs) (Bindels *et al.*, 2015). En el caso de los crustáceos, se ha detectado la existencia de una carencia en cuanto a la información sistematizada acerca de los efectos sobre la relación microbiota-hospedero, incluyendo evidencia de las relaciones de causa-efecto entre la composición de la microbiota, fisiología del hospedero y efecto de los prebióticos promoviendo o regulando la microbiota.

Los prebióticos que han sido objeto de investigación experimental en acuicultura de crustáceos son los manano oligosacáridos (MOS), la inulina (INL), fructo-oligosacáridos (FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta (scFOS), xylo-oligosacáridos (XOS), isomalto-oligosacáridos (IMO), GroBiotic (Daniels & Hoseinifar, 2014; Lauzon *et al.*, 2014). Por ejemplo, Hoseinifar *et al.* (2015) en postlarvas del camarón *Fenneropenaeus indicus* determinó que la vía más adecuada de suministrar la INL era a través del enriquecimiento de nauplios de *Artemia*, pues de acuerdo a su análisis de cambios en la microbiota cultivable, esta inclusión generó un incremento significativo de los niveles de bacterias acidolácticas y de la supervivencia de postlarvas. Dong & Wang (2013) plantean que la inclusión de FOS en la dieta del cangrejo de río *Procambarus clarkii*, incrementó significativamente la actividad de la polifenol oxidasa y de superóxido dismutasa, aumentando la supervivencia frente a un desafío por *Aeromonas hydrophila*. Zhou *et al.* (2007) en juveniles de *Penaeus vannamei* reportó que la inclusión de scFOS en la dieta provocó una reducción de los conteos de *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus faecalis*, mejorado los índices de crecimiento y reduciendo la conversión. Wang *et al.* (2010) suplementando XOS a *P. vannamei* a través de la dieta, reportaron incrementos significativos en la actividad de la polifenol oxidasa, superóxido dismutasa, peroxidasa y lisozima. Recientemente Sui *et al.* (2015) con el Prebiótico Poli-β-Hidroxibutirato (PBH), Febrianti & Yuhana (2016) con MOS y Mohan *et al.* (2016) con polisacáridos de *Ganoderma lucidum* en *Erichoeir sinensis*, *Penaeus*

vannamei y *Macrobrachium rosenbergii* respectivamente, reportaron significativas mejoras en el crecimiento, la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva, la composición y perfil de aminoácidos musculares. Estos resultados refuerzan la inferencia que los prebióticos se presentan como alternativas promisorias, ambientalmente amigables, en la prevención de enfermedades, especialmente en la acuicultura de crustáceos.

Manano oligosacáridos (MOS)

En comparación con el amplio rango de prebióticos cuyo empleo experimental ha sido documentado en acuicultura, existen relativamente pocos cuyo empleo haya sido documentado en acuicultura de crustáceos (Daniels & Hoseinifar, 2014). Dentro de los prebióticos más empleados se seleccionaron los MOS, dado que han sido ampliamente estudiados en especies de crustáceos cultivados, abordando su efecto sobre la fisiología, respuesta inmune, crecimiento y cambios en la morfología intestinal (Genc *et al.*, 2007; Sang *et al.*, 2009; Daniels *et al.*, 2010; Sang & Fotedar, 2010; Mazlum *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2011, 2014; Genc & Ebeoglu, 2013; Hoang & Jones, 2014). Otra consideración es su amplia disponibilidad comercial (AGRIMOS, Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France; MOS Fubon, Angel Yeast Angel Yeast Co., Ltd, Hubei, China continental; MOS, Hangzhou Gosun Biotech Co., Ltd, Zhejiang, China continental; Manano Oligosacáridos de Alta Calidad, Xian Shunyi Bio-Chemical Technology Co., Ltd. Shaanxi, Xi'an, China continental; Bio-Mos, Alltech Inc, Nicholasville, KY, USA; YCW MOS, Tangshan Top Bio-Technology Co., Ltd, Hebei, China continental). En el mismo sentido, la revisión de la literatura mostró la existencia de información disponible pero no sistematizada, que al organizarse en esta revisión se logra una síntesis del estado del arte de MOS como prebiótico en los cultivos comerciales de crustáceos. Esto ayuda a definir las áreas de carencias de sustento científico como nuevos campos de investigación.

Los manano oligosacáridos (MOS) son carbohidratos complejos (Fig. 1), derivados de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dilley *et al.*, 1997; Ringo *et al.*, 2010). Estos oligosacáridos contienen manano (Fig. 1), un azúcar reconocido por ciertas bacterias durante los procesos de adhesión. Este mecanismo de reconocimiento está presente en muchas cepas de carácter patógeno general, como *E. coli*, *Salmonella* sp. y cepas patógenas con importante influencia en la acuicultura como *Vibrios* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* (Dilley *et al.*, 1997; Ofek *et al.*, 2003; Franklin *et al.*, 2005).

La adhesión y colonización son requisitos previos para el establecimiento de la patogénesis bacteriana, condicionando la activación de diversos procesos, como la formación de biopelículas o translocación de proteínas que puede ser seguido por la entrada en la célula del hospedador y la difusión sistémica posterior (Sharon & Ofek, 2002; Bavington & Page, 2005; Wagner & Hensel, 2011; Torrecillas *et al.*, 2014). Esto sustenta a la prevención de la adhesión como objetivo para el desarrollo de nuevas estrategias, preventivas de la infección bacteriana (Bavington & Page, 2005). El empleo de MOS como un bloqueador de la colonización de patógenos evoluciona desde el concepto de que ciertos azúcares, como la manosa, podrían ser utilizados como inhibidores de la adhesión de patógenos mediada por lectinas presentes en las fimbrias. Estas lectinas bacterianas se unen a los carbohidratos constituyentes complementarios de glicoproteínas o glicolípidos en la superficie de los tejidos del hospedador (Fig. 2). Se sugiere que la consecuencia de esta adhesión impedida, resulta en una reducción de la colonización del tracto digestivo con patógenos, que son excretados en las heces, lo cual mejora la integridad y funcionalidad de la barrera epitelial intestinal (Torrecillas *et al.*, 2014). De esta forma, los MOS previenen infecciones bacterianas mediante mecanismos diferentes a los utilizados por los antibióticos, soslayando la habilidad de desarrollar resistencia por parte de los patógenos (Newman *et al.*, 1993; Dilley *et al.*, 1997; Finucane *et al.*, 1999; Torrecillas *et al.*, 2014).

MOS en acuicultura de crustáceos

El potencial de manano oligosacáridos (MOS) como prebióticos en acuicultura de crustáceos ha sido estudiado por investigadores de varios países (Tabla 1). Algunas de las principales especies cultivadas a nivel mundial han sido objeto de estudio en cuanto a la suplementación dietaria con MOS y su impacto sobre la fisiología, patología y condiciones de cultivo. Las especies estudiadas abarcan desde camarones peneidos (Genc *et al.*, 2007; Van Hai & Fotedar, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Genc & Ebeoglu, 2013; Sang *et al.*, 2014) langostas australianas de agua dulce (Sang *et al.*, 2009, 2011) y langostas (Sang & Fotedar, 2010; Hoang & Jones, 2014).

Crecimiento y supervivencia

Es incuestionable el aporte del MOS incluido en la dieta como promotor del crecimiento y la supervivencia en crustáceos desde las etapas larvales (Tabla 1). El enriquecimiento con MOS de la dieta viva, permite emplearlo desde las etapas larvales. Por ejemplo el enriquecimiento de *Artemia salina* con MOS en la lar-

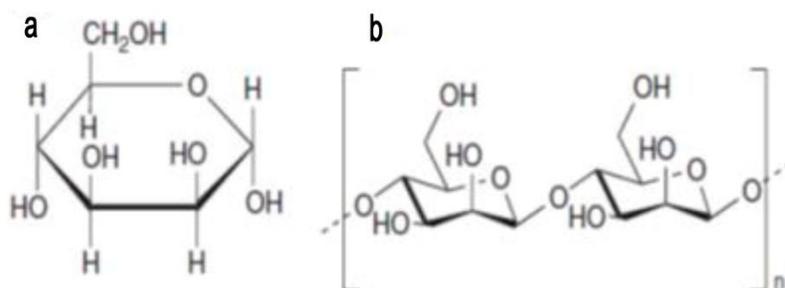


Figura 1. Estructura química. a) Manosa, b) manano oligosacáridos constituidos por la unión de 2 a 10 unidades cíclicas de manosa mediante enlaces glicosídicos de forma lineal o ramificada (Lauzon *et al.*, 2014).

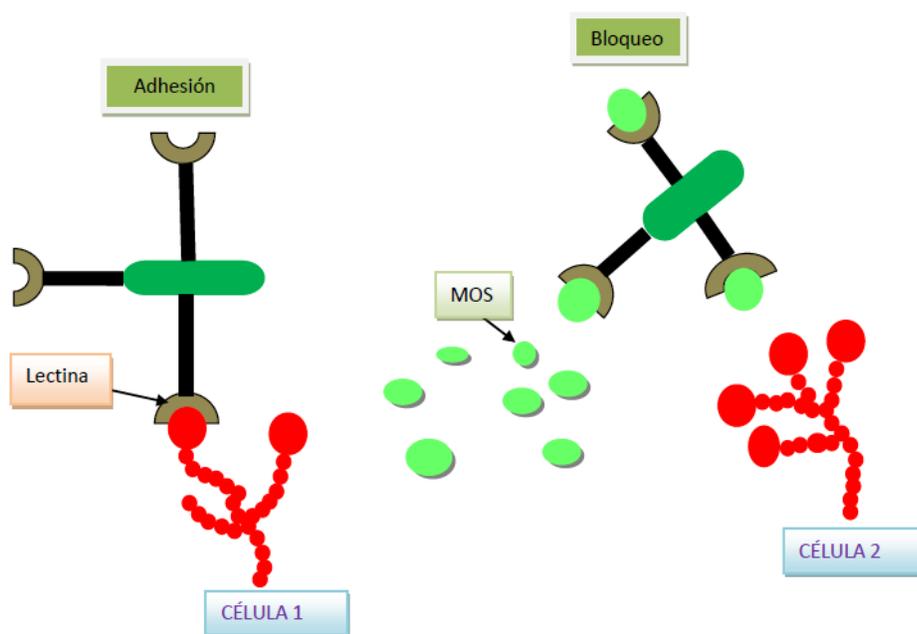


Figura 2. Esquemización de la inhibición competitiva de la adhesión bacteriana del hospedero mediante el bloqueo por afinidad de las lectinas bacteriales por MOS. Célula 1 adhesión de las lectinas bacteriales a las unidades de manosa constituyentes de las glicoproteínas del epitelio intestinal. Célula 2 Adhesión bloqueada por ocupación competitiva de las lectinas bacteriales por MOS.

vicicultura del bogavante *Homarus gammarus* reporta incrementos significativos ($P < 0,05$) de los parámetros productivos, donde destaca aumento del peso promedio de ~25% sobre el control (Daniels *et al.*, 2010).

Los MOS también pueden ser incluidos en la dieta de juveniles para mejorar estos parámetros. Por ejemplo la inclusión de 0,4% de MOS en la dieta de juveniles de langosta espinosa *Panulirus ornatus* (Sang & Fotedar, 2010) donde los animales alimentados con dieta suplementada con MOS alcanzaron significativamente ($P < 0,05$) un incremento de peso de 20% sobre el control. MOS también mejoró el RS frente a un desafío por *Vibrio* spp., logrando 25% más supervivencia que el control. Estos datos coinciden con lo

reportado por Sang *et al.* (2011) en la experiencia con juveniles de Yabbie *Cherax destructor* con niveles de inclusión de MOS 0,04%, donde se reporta incremento significativo ($P < 0,05$) en relación al crecimiento logrando un 10% de mejora en los parámetros productivos respecto al control.

Otros autores indican que el efecto positivo de MOS parece estar relacionado a la dosis en que este prebiótico se incluye en la dieta. En juveniles de la langosta festoneada *Panulirus homarus* (Hoang & Jones, 2014) se reportan incrementos significativos ($P < 0,05$) en el crecimiento del orden de 30 veces al usar una inclusión de MOS de 0,4 y 0,6%. Mientras el comportamiento de la supervivencia (RS) refleja los

Tabla 1. Efecto de la inclusión de manano oligosacáridos en la dieta de crustáceos.

Especie	MOS Dosificación	Resultado	Referencia
<i>Homarus gammarus</i>	<i>Artemia</i> enriquecida	+ Crecimiento + Supervivencia Cambios en la morfología intestinal	Daniels <i>et al.</i> (2010)
<i>Panulirus ornatus</i>	0,4%	+ Crecimiento + Condición Fisiológica + Respuesta Inmune + Supervivencia Cambios en la morfología intestinal	Sang & Fotedar (2010)
<i>Panulirus homarus</i>	0-0,2-0,4-0,6-0,8%	+ Supervivencia Cambios en la morfología intestinal + Crecimiento	Hoang & Jones (2014)
<i>Cherax tenuimanus</i>	0-2-4%	+ Supervivencia + Respuesta Inmune	Sang <i>et al.</i> (2009)
<i>Astacus leptodactylus</i>	0-0,15 -0,3-0,45%	+ Crecimiento	Mazlum <i>et al.</i> (2011)
<i>Cherax destructor</i>	0,4%	+ Respuesta Inmune + Crecimiento + Condición Fisiológica	Sang <i>et al.</i> (2011)
<i>Penaeus semisulcatus</i>	0-0,15-0,3-0,45%	+ Crecimiento + Supervivencia	Genc <i>et al.</i> (2007)
<i>Penaeus latisulcatus</i>	0,5%	+ Supervivencia + Crecimiento Cambios en la morfología intestinal	Van Hai & Fotedar (2009)
<i>Penaeus monodon</i>	0,1-0,2-0,4-0,8 %	+ Respuesta Inmune + Crecimiento + Respuesta Inmune Cambios en la morfología intestinal + Condición Fisiológica	Sang <i>et al.</i> (2014)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	0-0,2-0,4%	+ Crecimiento	Genc & Ebeoglu (2013)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	0-0,1-0,2-0,4-0,6-0,8%	+ Crecimiento Cambios en la morfología intestinal + Supervivencia + Respuesta Inmune	Zhang <i>et al.</i> (2012)

mejores resultados, con una inclusión de 0,2 y 0,4% de MOS que logran >75% de supervivencia. En el cangrejo de río europeo *Astacus leptodactylus* (Mazlum *et al.*, 2011) y el camarón tigre verde *Penaeus semisulcatus* (Genc *et al.*, 2007) obtienen los mejores resultados frente a la inclusión de 0,3% de MOS en la dieta. En el cangrejo de río europeo se lograron mejoras del orden del 20% en los parámetros asociados a crecimiento, mientras en el camarón tigre verde se obtuvieron mejoras del 40% en las variables asociadas al crecimiento, particularmente en el peso final.

Sang *et al.* (2014) reporta para juveniles del camarón tigre *Penaeus monodon* el mejor resultado con relación al crecimiento con un nivel de inclusión de 0,1% de MOS proporcionando un incremento significativo ($P < 0,05$) del 25% en las variables relativas al crecimiento, sin que se expresen diferencias significativas en la supervivencia. Para el camarón

blanco *Litopenaeus vannamei* Zhang *et al.* (2012) reportaron incremento en todas las variables relativas al crecimiento a todos los niveles de inclusión de MOS en la dieta evalúa (0,1% a 0,8%) por sobre el grupo control, siendo significativamente ($P < 0,05$) mayores los parámetros del grupo tratado con 0,2% de MOS en el alimento, logrando un incremento del 66% en la ganancia de peso (WG). Interesantemente, Genc & Ebeoglu, 2013, para la misma especie reporta un incremento del 17% en el RS con la inclusión de MOS a 0,4% en la dieta condicionados a una salinidad de 38. sin embargo, no se obtuvo resultados positivos a salinidad de 20‰ revelando la influencia ambiental sobre estos manejos con prebióticos.

Cambios en la morfología intestinal

La inclusión de MOS en la dieta tiende a reducir la colonización del tracto digestivo por patógenos, lo que

refuerza la integridad y funcionalidad de la barrera epitelial intestinal (Torrecillas *et al.*, 2014). Se han reportado cambios en la morfología intestinal en varias especies de crustáceos tras la inclusión de MOS en la dieta (Van Hai & Fotedar, 2009; Daniels *et al.*, 2010; Sang & Fotedar, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Hoang & Jones, 2014). Estos cambios están descritos generalmente asociados al incremento de la superficie de contacto y las estructuras de absorción de nutrientes en el intestino (Fig. 3).

Daniels *et al.* (2010) reporta incrementos en superficie de absorción intestinal de larvas o postlarvas de bogavante que recibieron dietas suplementadas con MOS y la microscopía electrónica reveló aumentos significativos ($P \leq 0,001$) de longitud y densidad de las microvellosidades intestinales en comparación con el grupo control. Sang & Fotedar (2010) en una investigación con la langosta espinosa tropical *Panulirus ornatus* reportaron incremento de la superficie de absorción intestinal basados en un incremento significativo ($P < 0,05$) de la relación perímetro interno/perímetro externo intestinal, la cual aumentó en 60% con MOS al 0,4%. Resultados similares fueron reportados en la langosta espinosa festoneada *Panulirus homarus* (Hoang & Jones, 2014). Van Hai & Fotedar (2009) indican que los tratamientos con MOS en la dieta en langostino real *Penaeus latisulcatus* mostraron el incremento en el tamaño y profundidad de los pliegues intestinales. Resultados similares fueron reportados en el camarón tigre (Sang *et al.*, 2014). En el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se observó una respuesta dependiente de la dosis con un incremento en la longitud de las microvellosidades intestinales en los ejemplares suplementados con 0,2% de MOS, en comparación al control y dosis mayores de MOS (0,4-0,6-0,8%), (Zhang *et al.*, 2012).

Modulación de la microbiota intestinal

Este es uno de los aspectos fundamentales en la argumentación del MOS como prebiótico pero ha sido también uno de los menos desarrollados. Gibson *et al.* (2004) determinaron, que se requería más información sobre la estructura final de los cambios provocados por la ingestión de prebióticos obtenida mediante las nuevas técnicas moleculares que deben aportar información más detallada sobre estos cambios en la microbiota y la relación estructura función de los prebióticos. En el caso de las investigaciones enfocadas al empleo de MOS como prebióticos en acuicultura de crustáceos, éste ha sido uno de los aspectos menos desarrollados pese a disponer de un conjunto de nuevas técnicas moleculares de análisis directo de la micro-

biota, denominadas Técnicas de Secuenciación Masiva o Next Generation Sequencing (NGS).

Los estudios de MOS y sus efectos en la microbiota generalmente se basan en mediciones de recuentos de bacterias cultivables, los cuales pueden no representar los microorganismos más abundantes en el ambiente examinado (Amman *et al.*, 1995). Daniels *et al.* (2010) en larvicultura del bogavante *Homarus gammarus* reporta que la suplementación de MOS en la dieta estabilizó los niveles de bacterias intestinales en comparación con el control y al mismo tiempo disminuyó significativamente ($P < 0,05$) el recuento total de vibrios (TVC). En juveniles de la langosta espinosa tropical *Panulirus ornatus*, la dieta suplementada con MOS 0,4% promovió un aumento de 10 veces en los recuentos de las bacterias aerobias totales, respecto de la dieta control. Al mismo tiempo, los recuentos totales de *Vibrio* (TVC) aumentaron en menor proporción, solo 7 veces, al usar MOS (Sang & Fotedar, 2010). En contraste, las experiencias con juveniles de langosta espinosa festoneada indican que la inclusión de MOS (0,2-0,4-0,6-0,8%) reduce significativamente ($P < 0,025$) el recuento de vibrios (Hoang & Jones, 2014). Por lo tanto, se resume que la inclusión de MOS en la dieta, en general, tiene un efecto de reducción de vibrios en los crustáceos cultivados.

Modulación respuesta inmune

La primera barrera de defensa inmune en los crustáceos está constituida por el exoesqueleto como barrera física frente a los patógenos (Fonseca *et al.*, 2013; Cárcamo-Arechiga *et al.*, 2016). La primera respuesta del hospedero frente a la infiltración de patógenos está a cargo de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos son capaces de reconocer estructuras extracelulares altamente conservadas en microorganismos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs. El reconocimiento de los PAMPs permite generar una rápida respuesta humoral y celular. Varios tipos de PRR han sido identificados en crustáceos, incluyendo proteínas de unión Gram negativas, proteínas de unión a lipopolisacáridos (LPS), proteínas de reconocimiento de peptidoglicanos (PGRP), proteínas de unión a B1-3-glucano (Romo-Figueroa *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2011), lectinas de tipo c (Wang & Wang, 2013) y proteínas relacionadas con el fibrinógeno (Chai *et al.*, 2012). Se han descrito varias vías de respuesta a patógenos, donde la cascada de señalización ha sido propuesta, pero no demostrada aún.

Vías documentadas

El sistema de coagulación del camarón se ha relacionado con la expresión de péptidos antimicrobianos

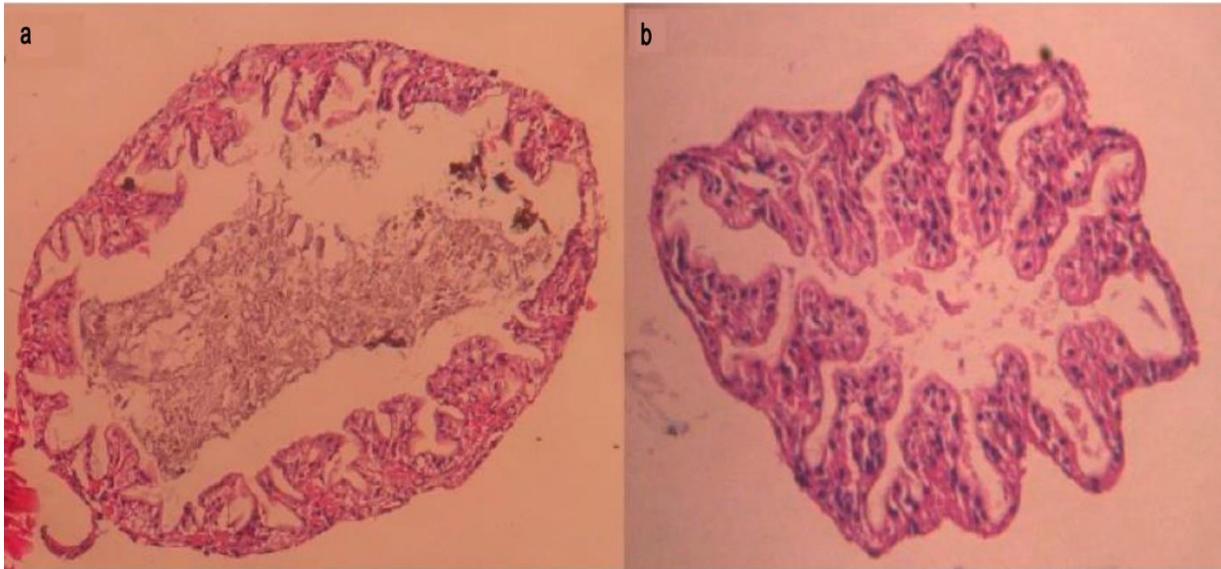


Figura 3. Sección transversal del intestino de la langosta espinosa alimentada con diferentes dietas a) Control, b) adición de 0,4% MOS (Sang & Fotedar, 2010).

(AMP), aunque el mecanismo de activación de la expresión de AMP en crustáceos no está totalmente aclarado (Maningas *et al.*, 2008). En este sentido, se conoce que las regiones N-terminales del factor B del camarón, y las enzimas favorecedoras de la coagulación, contienen dominios de unión similares a la defensina “AMP big defensin” (Iwanaga & Lee, 2005). La alfa-2-macroglobulina (A2M) es un sustrato reconocido para la glutamiltransferasa (TGasa) y es capaz de reticularse con proteínas coagulantes. Se cree que puede actuar como un inhibidor de la proteasas y evita que los microorganismos entren en una herida (Kopacek *et al.*, 1993). Por lo que se puede resumir que la cascada de señales en la coagulación media, en varios procesos para prevenir la infección que incluyen la coagulación, procesos de cicatrización y actividad antimicrobiana (Clark & Greenwood, 2016).

La cascada de melanización es una combinación compleja de respuestas inmunes innatas humerales y celulares. Esto implica el reconocimiento de PAMPS por PRRs seguido por el inicio del sistema de activación de propolifenol oxidasa (proPO) a través de una rápida cascada proteolítica. La enzima final que activa la proPO se denomina enzima activadora de la propolifenol oxidasa (PPEA), que participa activamente en la curación de las heridas, la eliminación de microorganismos en el lugar de las heridas y la destrucción o inmovilización eficaz de parásitos (Clarck & Greenwood, 2016). La cascada de señalización de la melanización da como resultado la producción de intermediarios citotóxicos como las

moléculas de oxígeno reactivo y nitrógeno reactivo que participan en la resistencia frente a patógenos (Clarck & Greenwood, 2016).

La vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLR) pasa la información de PRR a factores de transcripción nuclear para iniciar la expresión de moléculas inmunes. Varios TLR han sido descritos en crustáceos incluyendo los camarones *Marsupenaeus japonicus* (Mekata *et al.*, 2008), *Penaeus monodon* (Arts *et al.*, 2007), *Litopenaeus vannamei* (Wang *et al.*, 2010), *Erichoeir sinensis* (Yu *et al.*, 2013) *Carcinus maenas* (Verbruggen *et al.*, 2015), *Scylla cerrata* (Vidya *et al.*, 2014), *Portunus trituberculatus* (Zhou *et al.*, 2015), y la langosta *Homarus americanus* (Clarck, 2014).

El sistema de complemento se centra en la eliminación u opsonización de los microorganismos y la eliminación de los desechos celulares (Clark & Greenwood, 2016). Se ha sugerido que existe un sistema de complemento inmune innato en los crustáceos (Cerenius & Söderhäll, 1995), pero se han realizado muy pocas investigaciones en este campo (Clark & Greenwood, 2016).

Otros componentes del sistema de defensa de crustáceos incluye los péptidos antimicrobianos AMPs, se encuentran en todos los reinos y funcionan como antibióticos naturales actuando rápidamente contra microorganismos invasores. Generalmente son pequeños, <100 aminoácidos, catiónicos y anfipáticos para facilitar la asociación con la superficie externa de los mi-

croorganismos (Smith & Dyrinda, 2015). Varios tipos de AMPs de crustáceos han sido reportados anteriormente incluyendo peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), crustinas (Rosa & Barracco, 2010, Tassanakajon *et al.*, 2010), factores antilipopolisacáridos (ALF) (Rosa *et al.*, 2013) y Lisozimas (Pan *et al.*, 2010). Las proteínas de fase aguda APPs son proteínas de hemolinfa solubles sintetizadas en el hepatopáncreas en *H. americanus* (Clark *et al.*, 2013). Se liberan en el torrente sanguíneo durante la infección, los traumas, los procesos inflamatorios y el estrés, sugiriéndose su empleo como marcadores de la activación inmune innata en crustáceos (Clark *et al.*, 2015). Se conoce muy poco sobre las APPs de crustáceos pero ha sido identificada la proteína A amiloide sérica de fase aguda (SAA) en ensayos con la especie *H. americanus* en desafíos por patógenos (Clark *et al.*, 2013).

Con relación a la interacción del MOS con el sistema inmune de crustáceos, existen varios reportes de lectinas con capacidad de reconocimiento de manosa (MBL) generalmente asociadas al complemento. Estas lectinas han sido descritas en varias especies de crustáceos *Fenneropenaeus chinensis* (Sun *et al.*, 2008; Zhan *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010) en *Litopenaeus vannamei* (Zhan *et al.*, 2009a, 2009b). Song *et al.* (2014) sugiere una interacción directa entre los MOS y el sistema inmune innato de crustáceos a través de algunos PRRs con afinidad por manosa (Sun *et al.*, 2008; Arockiaraj *et al.*, 2015), los cuales a su vez presentan alta especificidad de reconocimiento de PAMPs asociados a *V. anguillarum*, *E. coli* y WSSV (Sun *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009a, 2009b; Zhao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Se ha sugerido que estos PRRs están generalmente vinculados a la vía del complemento (Arockiaraj *et al.*, 2015; Clark & Greenwood, 2016), pero existen carencias investigativas sobre este aspecto en particular (Clark & Greenwood, 2016). Por otra parte, De Vrese & Schrezenmeir (2008) y Bindels *et al.* (2015) plantean que las principales propiedades inmunomoduladoras de los prebióticos son indirectas, ya que resultan mediadas por los cambios promovidos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal.

Al modular la composición y/o actividad de la microbiota intestinal los MOS indirectamente modulan la respuesta inmune. La expresión de la inmunomodulación también ha sido objetivo de diversas investigaciones en crustáceos. Las langostas *Panulirus ornatus* alimentadas con una dieta suplementada con MOS presentaron un incremento del orden del 10% ($P < 0,05$) en los índices Conteo Total de Hemocitos (THC) y un aumento del 4% en la Proporción de Células Granulares (GC), mientras se registró una reducción en el recuento de bacterias

totales en la hemolinfa (Sang & Fotedar, 2010). De la misma forma, la respuesta inmune fue potenciada en el *Cherax destructor* tras la inclusión de 0,4% de MOS que logró un incremento significativo del THC, GC y Proporción de Células Semigranulares (SGC) en la hemolinfa (Sang *et al.*, 2011). En *Cherax tenuimanus* la inclusión de MOS logró un mejoramiento de los parámetros inmunes como el THC frente a un desafío con *Vibrio mimicus* y amoníaco. Estos agentes redujeron el THC en todos los animales experimentales, pese a la reducción, los animales suplementados con MOS 0,2% presentaban un nivel de THC 26% superior al control. Además, los animales suplementados con MOS 0,2%, presentaron una reducción cercana al 90% en los niveles de vibrio en la hemolinfa (Sang *et al.*, 2009).

Van Hai & Fotedar (2009) en juveniles de langostino real occidental, reportan solo un incremento significativo de GC y SGC en los animales suplementados con MOS al 0,5% en la dieta. Esta experiencia también marcó una reducción significativa ($P < 0,05$) en los rangos del tiempo de coagulación y la carga bacteriana de la hemolinfa del orden 1 logaritmo, en los animales suplementados con MOS en la dieta. En contraste, en la experiencia de Sang *et al.* (2014) con camarón tigre *Penaeus monodon* se reporta un incremento significativo ($P < 0,05$) del THC en animales suplementados con MOS en el alimento, reportándose el mayor incremento de THC (24%) para un nivel de inclusión de 0,4% de MOS en la dieta sin encontrar diferencias significativas en GC, SGC y HC entre todos los animales experimentales.

El incremento de la actividad de enzimas relacionadas con la respuesta inmune en crustáceos como la polifenol oxidasa (PO) y superóxido dismutasa (SOD) es referido por Zhang *et al.* (2012). Estos estudios fueron realizados en juveniles de camarón blanco, donde tras 24 h de una prueba por estrés de amoníaco los camarones suplementados con MOS presentan incremento significativo del 60% en la actividad de la PO. En tanto, la actividad de la SOD se incrementa significativamente en un 30% en la dieta con MOS, respecto al control.

Condición fisiológica

El crecimiento en los crustáceos puede ser considerado como la energía obtenida por el organismo que se almacena como reservas corporales (Lemos & Phan, 2001). La capacidad de mejorar la absorción de nutrientes en los ejemplares alimentados con dietas suplementadas con MOS puede ser evaluada a través de diversos indicadores de la condición fisiológica en los animales experimentales (Jussila, 1997; Sang & Fotedar, 2010; Sang *et al.*, 2011, 2014).

Los indicadores de condición fisiológica en la especie *Panulirus ornatus* (Sang & Fotedar, 2010) como el índice muscular de cola mojada (Tw/B), el índice hepatosomático (Hiw) y el índice muscular de cola seca (Td/B) fueron significativamente ($P < 0,05$) mayores (40-50%) en los animales suplementados con MOS frente a los alimentados con la dieta control. En otro ejemplo del efecto de MOS sobre la condición fisiológica, Sang *et al.* (2014) describen en el camarón *Penaeus monodon* un incremento significativo del Tw/B, Td/B y las proteínas del músculo de cola (TMP) en los animales que recibieron las dietas experimentales suplementadas con MOS frente a los animales que recibieron la dieta control.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Resumiendo brevemente la literatura revisada se observa que de manera general existe evidencia apoyando la suplementación de MOS, en cuanto a que presenta efectos positivos en términos de crecimiento y salud en las principales especies de crustáceos de cultivo.

La evidencia revisada indica que la reducción de bacterias patógenas oportunistas como *Vibrio*, es un efecto de la aplicación de MOS en las dietas. Al reducir la presencia de dichas bacterias, se reduce también la colonización del tracto digestivo con patógenos, lo que a su vez reduce colateralmente el efecto de las exotoxinas y la translocación bacteriana sobre el epitelio intestinal reforzando la integridad y funcionalidad de la barrera epitelial intestinal (Torrecillas *et al.*, 2014). Este proceso se refleja en los cambios en la morfología intestinal, dirigidos a hacer más rápida y eficiente la absorción de nutrientes, promoviendo un incremento de la disponibilidad y las reservas de energía que inducen cambios en la condición fisiológica de los crustáceos. Esto se refleja en el incremento de las tasas de crecimiento y la supervivencia. La consistencia de los resultados relacionados con la mejora de los parámetros de cultivo de crustáceos pese a las diferencias en dosificación óptima por especies y estadio de vida, son significativos, en contraste con las claras divergencias de resultados muchas veces no significativos reportados para el cultivo de peces (Ringø *et al.*, 2010; Torrecillas *et al.*, 2014).

La modulación de la microbiota intestinal por los MOS en términos cuantitativos y cualitativos es uno de los aspectos con menor desarrollo en acuicultura de crustáceos. En esta revisión se observaron coincidencias en cuanto a la reducción de los conteos de *Vibrio* spp. en los trabajos citados. De acuerdo a Daniels *et al.* (2010) la acción del MOS estabiliza la

composición de la microbiota y suprime, en cierta medida, variaciones y afluencias de nuevas cepas bacterianas provenientes del medio de cultivo. Se requiere más trabajo para estudiar estas comunidades microbianas complejas y las interacciones de los prebióticos con las bacterias propias de la microbiota y patógenas (Romero *et al.*, 2014). Los recientes avances de la secuenciación masiva han abierto un amplio campo para estudiar de forma más directa los efectos de la modulación de la microbiota intestinal de crustáceos por prebióticos y componentes de la dieta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a SENESCYT Ecuador y reconocen el aporte de Fondecyt Proyectos 1140734 y 1171129 de CONICYT Chile.

REFERENCIAS

- Amman, R.I., W. Ludwig & K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169.
- Arockiaraj, J., M.K., Chaurasia, V. Kumaresan, R. Palanisamy, R. Harikrishnan, M. Pasupuleti & M. Kasi. 2015. *Macrobrachium rosenbergii* mannose binding lectin: synthesis of MrMBL-N20 and MrMBL-C16 peptides and their antimicrobial characterization, bioinformatics and relative gene expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.*, 43(2): 364-374.
- Arts, J.A., F.H. Cornelissen, T. Cijssouw, T. Hermsen, H.F. Savelkoul & R.J. Steet. 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(3): 504-513.
- Ballester, E.L.C., P.C. Abreu, R.O. Cavalli, M. Emerenciano, L. De Abreu & Jr. W. Wasielesky. 2010. Effect of practical diets with different protein levels on the performance of *Farfantepenaeus paulensis* juveniles nursed in a zero exchange suspended microbial flocs intensive system. *Aquacul. Nutr.*, 16(2): 163-172.
- Bavington, C. & C. Page. 2005. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. *Respiration*, 72(4): 335-344.
- Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.*, 4(11): 430-435.
- Bindels, L.B., E.M. Dewulf & N.M. Delzenne. 2013. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol. Sci.*, 34(4): 226-232.
- Bindels, L.B., N.M. Delzenne, P.D. Cani & J. Walter. 2015. Towards a more comprehensive concept for

- prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 12(5): 303-310.
- Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, H. Josupeit, J. Cai & X. Zhou 2012. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: past, present and future. *J. Invert. Pathol.*, 110(2), 158-165.
- Brestoff, J.R. & D. Artis. 2013. Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.*, 14(7): 676-684.
- Burford, M.A., P.J. Thompson, R.P. McIntosh, R.H. Bauman & D.C. Pearson. 2003. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. *Aquaculture*, 219(1): 393-411.
- Cabello, F.C., H.P. Godfrey, A.H. Buschmann & H.J. Dölz. 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *The Lancet Infect. Dis.*, 16: 100-106.
- Capy, P., G., Gásperi, C. Biémont & C. Bazin. 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 85(2): 101-106.
- Cárcamo-Aréchiga, N., J.M. Grijalva-Chon, J. Hernández-López, A. Varela-Romero, M.A. López-Torres & L.Á. Medina-Juárez (2016). Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una revisión/defense mechanisms of peneid shrimp during the infective process: a review. *Biotecnica*, 18(1), 32-42.
- Cerenius, L. & K. Söderhäll. 1995. Crustacean immunity and complement: a premature comparison? *Am. Zool.*, 35(1): 60-67.
- Chabrilón, M., R.M. Rico, S. Arijo, P. Díaz-Rosales, M.C. Balebona & M.A. Moriñigo. 2005. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J. Fish Dis.*, 28(9): 531-537.
- Chai, Y.M., Q. Zhu, S.S. Yu, X.F. Zhao & J.X. Wang. 2012. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 32(2): 307-315.
- Clark, K.F., A.R. Acorn & S.J. Greenwood. 2013. Differential expression of American lobster (*Homarus americanus*) immune related genes during infection of *Aerococcus viridans* var. *homari*, the causative agent of Gaffkemia. *J. Invert. Pathol.*, 112(2): 192-202.
- Clark, K.F. 2014. Characterization and functional classification of American lobster (*Homarus americanus*) immune factor transcripts. *Fish Shellfish Immunol.*, 41(1): 12-26.
- Clark, K.F., A.R. Acorn, H. Wang & S.J. Greenwood. 2015. Comparative tissue expression of American lobster (*Homarus americanus*) immune genes during bacterial and scuticociliate challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, 47(2): 1054-1066.
- Clark, K.F. & S.J. Greenwood. 2016. Next-generation sequencing and the crustacean immune system: the need for alternatives in immune gene annotation. *Integr. Compar. Biol.*, icw023.
- Dall, W. 1967. Food and feeding of some Australian penaeid shrimp. *FAO, Experience Paper*, 4: 8 pp.
- Daniels, C. & S.H. Hoseinifar. 2014. Prebiotic applications in shellfish. In: D. Merrifield & S. Hossein (eds.). *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 401-418.
- Daniels, C.L., D.L. Merrifield, D.P. Boothroyd, S.J. Davies, J.R. Factor & K.E. Arnold. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture*, 304(1): 49-57.
- De Vrese, M. & J. Schrezenmeir. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 111: 1-66.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorselaer, J. Rodriguez & E. Bachère. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.*, 272(45): 28398-28406.
- Dildey, D., K. Sellars, M. Burrill, J. Tree, K. Newman & K. Jacques. 1997. Effect of mannan oligosaccharide supplementation on performance and health of Holstein calves. *J. Dairy Sci.*, 80(Suppl. 1): 188.
- Dong, C.J. & J. Wang. 2013. Immunostimulatory effects of dietary fructooligosaccharides on red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Aquacult. Res.*, 44(9): 1416-1424.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2012. The state of world Fisheries and Aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*, Rome, pp 9.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2016 Fisheries and Aquaculture Department. Information and Statistics Service Global Aquaculture. Production (online query at: [<http://www.fao.org/fishery/topic/16140/en>]). Reviewed: 28 November 2016.
- Febrianti, D. & M. Yuhana 2016. Dietary synbiotic microcapsule influence the immune responses, growth performance and microbial populations to white spot syndrome virus in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Fish. Aquat. Sci.*, 11(1): 28.
- Fernández-Alarcón, C., C.D. Miranda, R.S. Singer, Y. Lopez, R. Rojas, H. Bello & G. González-Rocha. 2010. Detection of the floR Gene in a diversity of florfenicol resistant gram-negative Bacilli from

- freshwater salmon farms in Chile. *Zoon. Public Health*, 57(3): 181-188.
- Finucane, M., P. Spring & K. Newman 1999. Incidence of mannose-sensitive adhesions in enteric bacteria. *Poult. Sci.*, 78(Suppl. 1): 139.
- Flegel, T.W. & T. Pasharawipas. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. *Adv. Shrimp Biotechnol.*, pp. 245-250.
- Fonseca-Moreno, E., R. González-Salas & R. Rico Gutiérrez. 2013. Sistema inmune de los camarones. *Rev. Aquatic.*, 38: 68-84.
- Franklin, S.T., M.C. Newman, K.E. Newman & K.I. Meek. 2005. Immune parameters of dry cows fed mannan oligosaccharide and subsequent transfer of immunity to calves. *J. Dairy Sci.*, 88(2): 766-775.
- Gainza, R.O. 2009. Terapia antimicrobiana con enrofloxacin en camaronicultura. *Aquacult. Cult.*, 76, 44-45.
- Genc, M.A., M. Aktas, E. Genc & E. Yilmaz. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquacult. Nutr.*, 13(2): 156-161.
- Genc, M.A. & B. Ebeoglu. 2013. The effects of different salinity and supplemented mannan oligosaccharides (MOS) on growth of *Litopenaeus varmamei* (Penaeus: Decapoda). *J. Anim. Veterin. Adv.*, 12(9): 942-947.
- Gibson, G.R. & M.B. Roberfroid. 1995. Pharmaceutiques, U.D.L. dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R. & R. Fuller. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.*, 130(2): 391S-395S.
- Gibson, G.R., H.M. Probert, J. Van Loo, R.A. Rastall & M.B. Roberfroid. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.*, 17(2): 259-275.
- Hoa, P.T.P., S. Managaki, N. Nakada, H. Takada, A. Shimizu, D.H. Anh & S. Suzuki. 2011. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. *Sci. Total Environ.*, 409(15): 2894-2901.
- Hoang, D.H. & C.M. Jones. 2014. Effects of dietary mannan oligosaccharides supplementation on juvenile spiny lobster (*Panulirus homarus*) (*Palinuridae*). *Aquaculture*, 432: 258-264.
- Holmström, K., S. Gräslund, A. Wahlström, S. Pongshompoo, B.E. Bengtsson & N. Kautsky. 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 38(3): 255-266.
- Hoseinifar, S.H., P. Zare & H.K. Miandare. 2015. The effects of different routes of inulin administration on gut microbiota and survival rate of Indian white shrimp post-larvae (*Fenneropenaeus indicus*). *Veterinary Research Forum, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia*, 6(4) 331 pp.
- Hovda, M.B., B.T. Lunestad, R. Fontanillas, & J.T. Rosnes. 2007. Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272(1): 581-588.
- Huang, Z., X. Li, L. Wang & Z. Shao. 2016. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.*, 47(6): 1737-1746. doi: 10.1111/are.12628.
- Huang, Z., X. Li, L. Wang & Z. Shao. 2016. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.*, 47(6): 1737-1746.
- Iwanaga, S. & B.L. Lee. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *BMB Rep.*, 38(2): 128-150.
- Jussila, J. 1997. Physiological responses of Astacid and Parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture Perth, Western Australia. University of Kuopio, Kuopio, 140 pp.
- Kongnum, K. & T. Hongpattarakere. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.*, 32(1): 170-177.
- Kopacek, P., M. Hall & K. Soderhall. 1993. Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Europ. J. Biochem.*, 213(1): 591-597.
- Lai, X., J. Kong, Q. Wang, W. Wang & X. Meng. 2011. Cloning and characterization of a β -1, 3-glucan-binding protein from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molec. Biol. Rep.*, 38(7): 4527-4535.
- Lauzon, H.L., A. Dimitroglou, D.L. Merrifield, E. Ringø & S.J. Davies. 2014. Probiotics and prebiotics: concepts, definitions and history. In: D.L. Merrifield & S. Hossein (eds.). *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 169-184.
- Lemos, D. & V.N. Phan. 2001. Energy partitioning into growth, respiration, excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture*, 199(1): 131-143.
- Li, P., G.S. Burr, D.M. Gatlin, M.E. Hume, S. Patnaik, F.L. Castille & A.L. Lawrence. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp,

- Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *J. Nutr.*, 137(12): 2763-2768.
- Luna-González, A., J.T. Moreno-Herrera, Á.I. Campa-Córdova, H.A. González-Ocampo, J.A. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruíz & M.A. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(5): 898-907.
- Maningas, M.B.B., H. Kondo, I. Hirono, T. Saito-Taki & T. Aoki. 2008. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Molec. Immunol.*, 45(5): 1269-1275.
- Martín, S.W., A.H. Meek & P. Willeberg. 1987. *Veterinary epidemiology. Principles and methods.* Iowa State University Press, Iowa, 343 pp.
- Mazlum, Y., E. Yilmaz, M.A. Genç & O. Guner. 2011. A preliminary study on the use of mannan oligosaccharides (MOS) in freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juvenile diets. *Aquacult. Int.*, 19(1): 111-119.
- Mekata, T., T. Kono, T. Yoshida, M. Sakai & T. Itami. 2008. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 24(1): 122-133.
- Merrifield, D.L., A. Dimitroglou, A. Foey, S.J. Davies, R.T. Baker, J. Børgwald & E. Ringø. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302(1): 1-18.
- Miranda, C.D. & R. Zemelman. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212(1): 31-47.
- Miranda, C.D. & R. Rojas. 2007. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture*, 266(1): 39-46.
- Mohan, K., A.M. Padmanaban, V. Uthayakumar, R. Chandirasekar, T. Muralisankar & P. Santhanam. 2016. Effect of dietary *Ganoderma lucidum* polysaccharides on biological and physiological responses of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 464: 42-49.
- Moriarty, D.J. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, pp. 237-243.
- Newman, K., K. Jacques & R. Buede. 1993. Effect of mannan oligosaccharide on performance of calves fed acidified and non-acidified milk replacers. *J. Dairy Sci.*, 71(Suppl. 1): 271.
- Ofek, I., D.L. Hasty & R.J. Doyle. 2003. Bacterial adhesion to animal cells and tissues. *Am. Soc. Microbiol.*, 416 pp.
- Pan, L., F. Yue, J. Miao, L. Zhang & J. Li. 2010. Molecular cloning and characterization of a novel c-type lysozyme gene in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29(2): 286-292.
- Rawls, J.F., B.S. Samuel & J.I. Gordon. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(13): 4596-4601.
- Reverter, M., N. Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs & P. Sasal. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433: 50-61.
- Ringø, E., S. Sperstad, R. Myklebust, T.M. Mayhew & R.E. Olsen. 2006. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquacult. Res.*, 37(9): 891-897.
- Ringø, E., R.E. Olsen, T.Ø. Gifstad, R.A. Dalmo, H. Amlund, G.I. Hemre & A.M. Bakke. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquacult. Nutr.*, 16(2): 117-136.
- Ringø, E., R.E. Olsen, I. Jensen, J. Romero & H.L. Lauzon. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Rev. Fish Biol. Fish.*, doi: 10.1007/s11160-014-9361-y.
- Romero, J., C.G. Feijoó & P. Navarrete. 2012. Antibiotics in Aquaculture - Use, abuse and alternatives, health and environment in aquaculture. In: E. Carvalho (ed.), *InTech*, doi: 10.5772/28157. Available from: <https://www.intechopen.com/books/health-and-environment-in-aquaculture/antibiotics-in-aquaculture-use-abuse-and-alternatives>
- Romero, J., E. Ringø & D.L. Merrifield. 2014. The gut microbiota of fish. In: D. Merrifield & S. Hassein (eds.). *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 75-100.
- Romo-Figueroa, M.G., C. Vargas-Requena, R.R. Sotelo-Mundo, F. Vargas-Albore, I. Higuera-Ciapara, K. Söderhäll & G. Yepiz-Plascencia. 2004. Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Develop. Compar. Immunol.*, 28(7): 713-726.
- Rosa, R.D. & M.A. Barracco. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invert. Surv. J.*, 7: 262-284.
- Rosa, R.D., A. Vergnes, J. De Lorgeril, P. Goncalves, L.M. Perazzolo, L. Sauné & D. Destoumieux-Garzón. 2013. Functional divergence in shrimp anti-lipoplysaccharide factors (ALFs): from recognition

- of cell wall components to antimicrobial activity. *PLoS ONE*, 8(7): e67937.
- Runggrassamee, W., A. Klanchui, S. Maibunkaew, S. Chaiyapechara, P. Jiravanichpaisal & N. Karoonuthaisiri. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS ONE*, 9(3): e91853.
- Sang, H.M., L.T. Ky & R. Fotedar. 2009. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors. *Fish Shellfish Immunol.*, 27(2): 341-348.
- Sang, H.M. & R. Fotedar. 2010. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performances of the tropical spiny lobsters juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius, 1798). *Fish Shellfish Immunol.*, 28(3): 483-489.
- Sang, H.M., R. Fotedar & K. Filer. 2011. Effects of dietary mannan oligosaccharide on the survival, growth, immunity and digestive enzyme activity of freshwater crayfish, *Cherax destructor* Clark (1936). *Aquacult. Nutr.*, 17(2): e629-e635.
- Sang, H.M., N.T. Kien & N.T. Thanh-Thuy. 2014. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, survival, physiological, immunological and gut morphological conditions of black tiger prawn (*Penaeus monodon* Fabricius 1798). *Aquacult. Nutr.*, 20(3): 341-348.
- Sharon, N. & I. Ofek. 2002. Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42(S3): 267-272.
- Silva, B.C., F.D.N. Vieira, J.L.P. Mouriño, N. Bolivar & W.Q. Seiffert, 2016. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Res.*, 47(2): 612-623.
- Smith, V.J. & E.A. Dyrinda. 2015. Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. *Molec. Immunol.*, 68(2): 383-398.
- Song, S.K., B.R. Beck, D. Kim, J. Park, J. Kim, H.D. Kim & E. Ringø. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & Shellfish Immunol.*, 40(1): 40-48.
- Spann, K.M., R.A. Donaldson, J.A. Cowley & P.J. Walker. 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Organ.*, 42(3): 221-225.
- Spor, A., O. Koren & R. Ley. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(4): 279-290.
- Sui, L., G. Ma, W. Lu, Y. Deng, P. Bossier & P. De Schryver. 2016. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth, enzyme activity and intestinal microbial community of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Milne-Edwards) juveniles. *Aquacult. Res.*, 11(47): 3644-3652.
- Sun, Y.D., L.D. Fu, Y.P. Jia, X.J. Du, Q. Wang, Y.H. Wang & J.X. Wang. 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molec. Immunol.*, 45(2): 348-361.
- Tassanakajon, A., P. Amparyup, K. Somboonwiwat & P. Supungul. 2010. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, 12(5): 487-505.
- Torrecillas, S., D. Montero & M. Izquierdo. 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: potential mode of action. *Fish Shellfish Immunol.*, 36(2): 525-544.
- Van Hai, N. & R. Fotedar. 2009. Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos® and β -1, 3-D-glucan) and the customized probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture*, 289(3): 310-316.
- Vidya, R., A. Paria, A. Deepika, K. Sreedharan, M. Makesh, C.S. Purushothaman & K.V. Rajendran. 2014. Toll-like receptor of mud crab, *Scylla serrata*: molecular characterisation, ontogeny and functional expression analysis following ligand exposure, and bacterial and viral infections. *Molec. Biol. Rep.*, 41(10): 6865-6877.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 64(4): 655-671.
- Verbruggen, B., L.K. Bickley, E.M. Santos, C.R. Tyler, G.D. Stentiford, K.S. Bateman & R. Van Aerle. 2015. De novo assembly of the *Carcinus maenas* transcriptome and characterization of innate immune system pathways. *BMC Genomics*, 16(1): 458.
- Wagner, C. & M. Hensel. 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. In: Linke, D. & Goldman, A. *Bacterial Adhesion* Springer, Netherlands, pp. 17-34.
- Wang, G., Y. Zhou, W. Huang, Y. Huang, X. Liu & S. Dong. 2010. Effects of xylooligosaccharide on growth, body composition and non-specific immunity in *Litopenaeus vannamei*. *Freshwater Fish.*, 40: 55-58.
- Wang, X.W. & J.X. Wang. 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Develop. Compar. Immunol.*, 39(1): 27-38.
- Wasielesky, W., H. Atwood, A. Stokes & C.L. Browdy. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258(1): 396-403.
- Xu, W.T., X.W. Wang, X.W. Zhang, X.F. Zhao, X.Q. Yu, & J.X. Wang. 2010. A new C-type lectin (FcLec5)

- from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids*, 39(5): 1227-1239.
- Yu, A.Q., X.K. Jin, X.N. Guo, S. Li, M.H. Wu, W.W. Li & Q. Wang. 2013. Two novel Toll genes (EsToll1 and EsToll2) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan. *Fish Shellfish Immunol.*, 35(4): 1282-1292.
- Zhang, X.W., W.T. Xu, X.W. Wang, Y. Mu, X.F. Zhao, X.Q. Yu & J.X. Wang. 2009a. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Molec. Immunol.*, 46(8): 1626-1637.
- Zhang, Y., L. Qiu, L. Song, H. Zhang, J. Zhao, L. Wang & B. Huang. 2009b. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellf. Immunol.*, 26(1): 183-192.
- Zhang, Q., B. Tan, K. Mai, W. Zhang, H. Ma, Q. Ai & Z. Liufu. 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquacult. Res.*, 42(7): 943-952.
- Zhang, J., Y. Liu, L. Tian, H. Yang, G. Liang, & D. Xu. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(4): 1027-1032.
- Zhao, Z.Y., Z.X. Yin, X.P. Xu, S.P. Weng, X.Y. Rao, Z.X. Dai & Li. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J. Virol.*, 83(1): 347-356.
- Zhou, Z., Z. Ding & L.V. Huiyuan. 2007. Effects of Dietary Short-chain Fructooligosaccharides on Intestinal Microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, 38(2): 296-310.
- Zhou, S.M., M. Li, N. Yang, S. Liu, X.M. Yuan, Z. Tao & G.L. Wang. 2015. First description and expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) from the swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 45(2): 205-210.

Received: 19 May 2016; Accepted: 22 December 2016