CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, TORRES TROYA MARCO GEOVANNY, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado EFECTO DE KÉFIR DE AGUA EN LA CONCENTRACIÓN DE VIBRIOS EN EL CULTIVO DE JUVENILES DE Penaeus vannamei, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 24 de septiembre de 2021

TORRES TROYA MARCO GEOVANNY
0705625689

EFECTO DE KÉFIR DE AGUA EN LA CONCENTRACIÓN DE VIBRIOS EN EL CULTIVO DE JUVENILES DE *Penaeus vannamei*

RESUMEN

El uso de bacterias benéficas contribuye a mejorar la salud de los camarones. El kéfir es un conglomerado probiótico conformado por un grupo de microorganismos que conviven en simbiosis con bacterias ácido-lácticas y levaduras. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del kéfir de agua en la reducción de vibrios presente en el cultivo de *Penaeus vannamei*. Se prepararon tres dietas elaboradas con 75% kéfir y 25% productos extracelulares (T1); 50% kéfir y 50% productos extracelulares (T2); 50% kéfir deshidratado y 25% productos extracelulares (T3), se alimentó los camarones con los tratamientos antes mencionado por 10 d y se comparó con una dieta control solamente a base de balanceado. Los resultados del efecto inhibitorio de vibrios indican que los tres tratamientos fueron significativamente diferentes en relación al control reduciendo una fase exponencial. En cuanto, a la salud los tratamientos con kéfir y sus productos extracelulares presentaron hepatopáncreas con grado 1 en contenido de lípido y mejor formación de túbulos con respecto al control (grado 3). Asimismo, en branquias los tratamientos mostraron grado 2 en formaciones necróticas mientras el control presentó grado 3. Se recomienda el uso de kéfir como un aditivo dietético para disminuir la carga bacteriana, particularmente tipo vibrios en el cultivo de juveniles de *P. vannamei*.

Palabras clave: Vibrios; Kéfir de agua; Probióticos; camarón; inhibición

EFFECT OF WATER KEFIR ON THE CONCENTRATION OF VIBRIOS IN THE CULTURE OF JUVENILES OF *Penaeus vannamei*

ABSTRACT

The use of beneficial bacteria contributes to improving shrimp health. Kefir is a probiotic conglomerate of microorganisms that coexist in symbiosis with lactic acid bacteria and yeasts. The objective of the work was to evaluate the effect of water kefir in the reduction of vibrios present in the Penaeus vannamei culture. Three diets made with 75% kefir and 25% extracellular products (T1) were prepared; 50% kefir and 50% extracellular products (T2); 50% dehydrated kefir and 25% extracellular products (T3), the shrimp were fed with the treatments above for 10 d and compared with a control diet based only on balanced. The inhibitory effect of vibrios indicates that the three treatments were significantly different concerning the control reducing an exponential phase. Regarding health, the treatments with kefir and its extracellular products presented hepatopancreas with grade 1 in lipid content and better formation of tubules concerning the control (grade 3). Likewise, in gills, the treatments showed grade 2 in necrotic appearances while the control presented grade 3. The use of kefir is recommended as a dietary additive to reduce the bacterial load, particularly the vibrios type in the culture of juvenile *P. vannamei.*

Keywords: Vibrios; Water kefir; Probiotics; shrimp, inhibition.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad en continuo crecimiento y evolución dentro de su ámbito de obtención de alimento de origen animal (Kibenge, 2019), esto se debe al incremento exponencial de la población (Millard *et al.,* 2020) y demanda una producción sostenible. Dentro del campo acuícola la camaronicultura ocupa el segundo lugar de las producciones más

comercializadas en las últimas décadas a nivel global (Wang *et al.,* 2020), particularmente el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) cuyo cultivo ha avanzado tecnológicamente pudiendo ser latamente productivo a un elevado intervalo de salinidad, lo que ha dado paso a su expansión en muchos países alrededor del mundo (Li *et al.,* 2018).

Los principales problemas que ha venido atravesando la acuicultura en los procesos de producción, es la presencia de las enfermedades presentadas por agentes biológicos (Figueredo *et al.,* 2020), particularmente por microorganismos bacterianos, los cuales han ocasionado impactos en los diferentes sistemas productivos. En el cultivo de *P. vannamei* las bacterias patógenas con mayor impacto son del género *Vibrio*, bacilos gran-negativos, flagelados que son un componente de la microbiota estuarina (Aguilera *et al.,* 2019). Según la documentación científica, las especies más letales en este grupo son el *Vibrio alginolyticus* (Kong *et al.,* 2018)*, V. campbellii* (Thirugnanasambandam *et al.,* 2017)*, V. harveyi* (Ma *et al.,* 2020; Thirugnanasambandam *et al.,* 2019)*, V. parahaemolyticus* (Dong *et al.,* 2020) y *V. splendidus* (Chandrakala y Priya, 2017).

Para mejorar la producción ante la presencia de enfermedades bacterianas es frecuente el uso de antibióticos (Zeng *et al.,* 2019); sin embargo, se ha restringido el uso de estos fármacos en el campo acuícola por el impacto generado al medio ambiente acuático y la resistencia que adquieren las bacterias patógenas (Mingmongkolchai y Panbangred, 2018; Wang *et al.,* 2019; Won *et al.,* 2020). Es por ello, que se sugiere usar microorganismos benéficos, amigables con el medio ambiente, con la finalidad de minimizar los impactos negativos (Fernandes *et al.,* 2021; Ringo *et al.,* 2020), por la cual, una eficiente alternativa preventiva para sustituir los productos químicos son los probióticos (Wang *et al.,* 2019; Hai, 2015; Fernandes *et al.,* 2021; Roomiani *et al.,* 2018).

El término probiótico ha sido establecido como microorganismos que generan beneficios altamente positivos para la salud del huésped cuando se aplican en cantidades dosis adecuadas (Olmos *et al.,* 2020; Mathur y Sai, 2020; Yang *et al.,* 2019; Plaza-Diaz *et al.,* 2019; Wang *et al.,* 2018) y particularmente modifica de manera positiva la microbiota gastrointestinal (Meybodi y Mortazavian, 2017) y el ambiente que lo rodea (Toledo *et al.,* 2018). Para poder ser considerado dentro de este concepto debe poseer características ineludibles como tener la facultad de poder soportar el ambiente gastrointestinal, sobrevivir y poder mantener su actividad metabólica (Bergmann *et al.,* 2010). Además, los probióticos tienen que colonizar y adherirse al tracto gastrointestinal (Ringo *et al.,* 2020; Suez *et al.,* 2019), modular el sistema inmunológico (Garibay *et al.,* 2020), competir contra patógenos por espacio (Ringo *et al.,* 2020), producir compuestos benéficos y sustancias antagónicas en los mecanismos de *quorum sensing* (Toledo *et al.,* 2018; Ringo *et al.,* 2020).

Actualmente el uso de probióticos se está aplicando en la medicina humana, agronomía y acuicultura (McKenzie *et al.,* 2018). Dentro de la acuicultura, los cultivos de camarones y peces son donde más se ha experimentado con el uso de bacterias probióticas (Zorriehzahra *et al.,* 2016), y su forma de administración a través del alimento, mejorando la actividad enzimática y digestiva o de forma directa al agua, controlando enfermedades y mejorando su calidad (Kuebutornye *et al.,* 2019).

Uno de los probióticos utilizados en el campo de la medicina humana (Egea *et al.,* 2020) y veterinaria (Metras *et al.,* 2020) es el kéfir de agua (KA), el cual es un producto compuesto de comunidades bacterianas que viven en consorcio con otros microrganismos como levaduras. Entre las bacterias que mayormente predominan son las ácido-lácticas, ácido-acéticas (Fels *et al.,* 2018) y bifidobacterias (Eckel y Vogel, 2020; Fels *et al.,* 2018; Laureys y De Vuyst, 2014).

El KA tiene el potencial de producir compuestos fermentativos como dióxido de carbono (CO_2), etanol (C_2H_5OH), ácido acético (CH_3COOH), ácido láctico ($C_3H_6O_3$) (Xu *et al.,* 2018) y otros productos incluyendo compuestos aromáticos volátiles, a partir de metabolizar productos a base de azúcar (Fels *et al.,* 2018). La estructura de sus gránulos es irregular y posee una apariencia similar a una coliflor con una textura gelatinosa. Su diámetro oscila entre 0,3- 3,5 cm, y está compuesta de 890-900 g/kg de agua, 30 g/kg de proteínas, 2 g/kg de lípidos, 60 g/kg de azúcar y 7 g/kg de cenizas (Bergmann *et al.,* 2010).

El presente trabajo evalúa el efecto del kéfir de agua en la concentración de bacterias tipo vibrios en el cultivo de juveniles del camarón *Penaeus vannamei*.

El estudio fue llevado a cabo en dos etapas, la primera enfocada en la parte experimental en la Estación de Maricultura y la segunda de culminación fue la microbiología en el laboratorio de sanidad, ambos se encuentran ubicados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, la misma que pertenece a la Universidad de Técnica de Machala, situada en la provincia de El Oro, Ecuador.

Se realizó un ensayo *in-vivo* utilizando un total de ocho contenedores plásticos con capacidad de 55 L, en el cual, se adicionó 30 L de agua de mar, en los cuales se mantuvieron 15 juveniles con un peso promedio de 1,39 ± 0,03 g, con 6% de recambio diario del agua. Durante el experimento se mantuvo la salinidad a 22 ppt, temperatura de 28,2±0,39 ºC, oxígeno de 4,74±0,007 mg/L, amonio de 1,17±0,032 mg/L y pH neutro. Los organismos, previo al comienzo de los tratamientos con Kefir de agua, se mantuvieron en un periodo de 6 días con alimento balanceado (36% de proteína, aquaxel).

Para la preparación del KA se pesó 1 g de la muestra, el cual fue colocado en 1⁄2 L de agua esterilizada (autoclave) al que se le adicionaron 30 ml de melaza. Cada 3 d se añadió el mismo volumen de melaza y el preparado se mantuvo a temperatura ambiente. Para la preparación de la dieta se utilizó balanceado al 36% de proteína (aquaxel), donde se tomó 0,1 g de pegante (Naturalblind) mezclado con 5 ml de kéfir para 100 g de alimento. Asimismo, se determinó la prueba de hidroestabilidad en una relación de 1:20 (1 ml de productos extracelulares-PE: 20 g de balanceado).

El ensayo constó de tres tratamientos y el control con su respectiva réplica como se detalla a continuación: T1 (balanceado con 75% de kéfir y 25% de PE); T2 (balanceado con 50% de kéfir y 50% de PE); T3 (balanceado con 50% de kéfir deshidratado-KAD y 25% de PE) y TC (solo con alimento balanceado). Los animales fueron alimentados por un periodo de 10 d, con las dietas preparadas a base de kéfir. A las 24 h de haber concluido el ensayo, se procedió a pesar y recolectar las muestras para los análisis respectivos de los camarones a partir de intestino, hepatopáncreas y branquias.

Los camarones fueron alimentados dos veces al día con el 3% de su peso corporal durante sus tres primeros días, a partir del cuarto día se incrementó al 4%, y del 5% desde el octavo día hasta su culminación.

Al final del estudio, para evaluar la condición de los animales se realizó un análisis en fresco siguiendo la metodología Morales y Cuéllar, (2008) con observaciones al microscopio óptico, los daños en branquias, hepatopáncreas, contenido lipídico e intestinal, se valoraron de 0 a 4 dependiendo el grado de severidad o alteración en dichos órganos, siendo 1 el grado más leve y 4 el más alto.

La evaluación de los tratamientos se realizó mediante análisis microbiológicos utilizando la metodología descrita por Goméz *et al.* (2019). Todas las pruebas microbiológicas se realizaron en ambiente estéril (campana de flujo laminar). Se extrajo 1 g de hepatopáncreas de los camarones el cual se maceró y se realizó diluciones seriadas de 1/10, 1/100 y 1/1000 en solución salina (1%), para cada replica de los tratamientos, las diluciones se hicieron por triplicado. Posteriormente, se sembró un volumen de 100 µL en placas Petri, con CHROMagar^{TM}Vibrio, selectivo para bacterias del género *Vibrio*. Las placas fueron colocadas en un incubador por un periodo de 48 h a 26 ºC, transcurrido ese tiempo se contó las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en cada tratamiento.

Para analizar la incidencia de vibrios (UFC) en juveniles de camarones en los diferentes tratamientos, se utilizó ANOVA simple con una confiabilidad del 95%; previamente, los supuestos de normalidad de datos fueron verificados con el test de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la independencia de errores y el test de Levene. Cuando mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos se aplicó la prueba de rangos y comparaciones múltiples de Duncan. El paquete estadístico para el procesamiento de los datos fue SPSS Statistics 24 versión de prueba Windows.

El incremento en peso de los camarones alcanzado después de 10 d de haber alimentado a los animales fue de 0,87±0,07 g en el T1 en comparación con el control, pero, no existió diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 1).

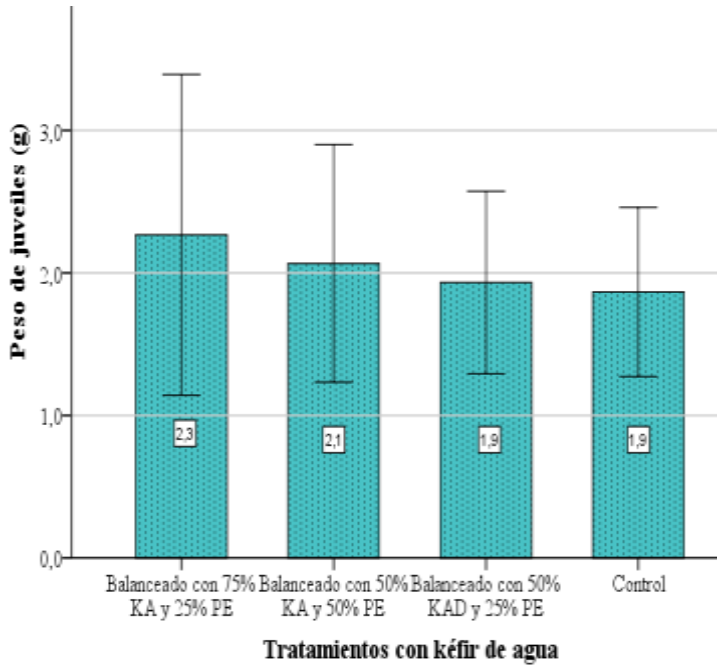

Figura 1. Peso promedio de los juveniles en los diferentes tratamientos y el control (T1- Balanceado con 75% KA y 25% PE; T2- Balanceado con 50% KA y 50% PE; T3- Balanceado con 50% KAD y 25% PE; TC- Balanceado). Las barras verticales en la gráfica indican desviación estándar en cada tratamiento.

En relación con las UFC se observó que la dieta T3 redujo significativamente la mayor cantidad de vibrios durante la fase de experimentación. Asimismo T1 y T2 manifiestan que hay diferencia significativa con el control. Por otra parte, los tres tratamientos presentan diferencia significativa, lo que indica, que las combinaciones sirven para reducir la carga bacteriana de vibrios después de la utilización del balanceado suministrado con kéfir y sus productos celulares (PE) durante 10 d (Fig. 2).

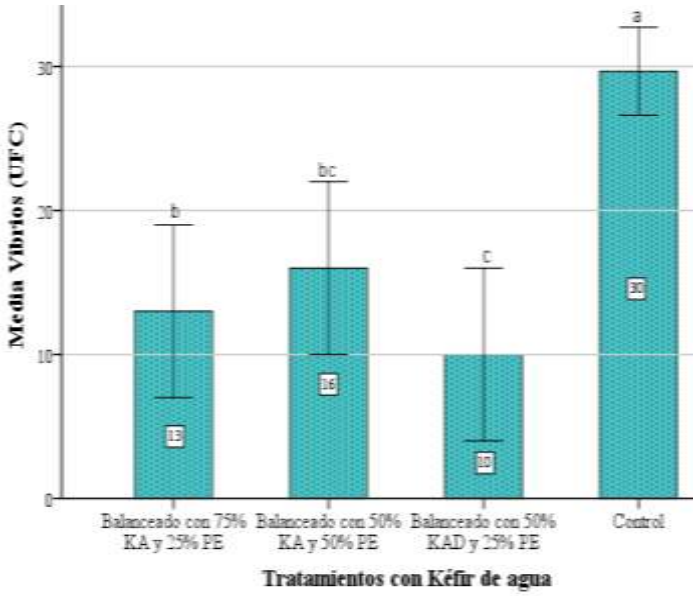

Figura 2. Reducción de UFC.g^{-1} de hepatopáncreas alimentados con kéfir de agua (T1- Balanceado con 75% KA y 25% PE; T2- Balanceado con 50% KA y 50% PE; T3- Balanceado con 50% KAD y 25% PE; TC- Balanceado). Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre tratamientos ($p< 0,05$), las barras verticales en la gráfica indican desviación estándar en cada tratamiento.

En cuanto al estado de condición o salud, el análisis en fresco de las branquias de los camarones muestra que externamente los animales no presentaron necrosis ni sintomatología de alguna enfermedad (Fig. 3); sin embargo, internamente los animales en el tratamiento control a nivel de branquias, presentó mayor necrosis en las lamelas (grado 3), este estado el T2 y T3 con kéfir mostró un nivel menor (grado 2). Cabe mencionar que el T1 presentó las lamelas branquiales limpias sin síntomas aparentes de alguna posible lesión al igual que los otros tratamientos. La salud de los animales se pudo evidenciar en los tres tratamientos los cuales tenían incluidos el kéfir, lo que puede indicar que la suplementación de la dieta también contribuye a mejorar el estado interno de los camarones.

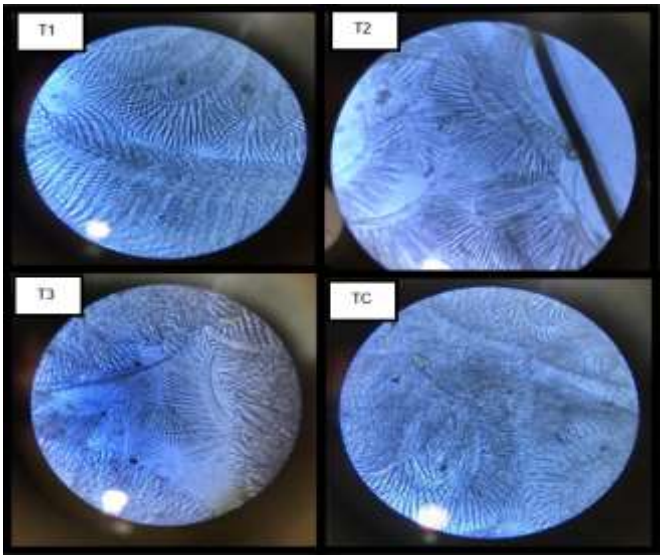

Figura 3: Análisis en fresco de lamelas branquiales de juveniles obtenidas en el ensayo respecto a cada uno de los tratamientos (T1- Balanceado con 75% KA y 25% PE- grado 0; T2- Balanceado con 50% KA y 50% PE- grado 2; T3- Balanceado con 50% KAD y 25% PE- grado 2; TC- Balanceado- grado 3).

A nivel de hepatopáncreas el contenido de lípidos en los túbulos en los tres tratamientos fue mayor que el control (Fig. 4), indicando que los camarones tenían una condición más saludable, con mayor asimilación de los nutrientes de la dieta, los cuales son almacenados como reserva energética en los animales para después ser utilizados en sus diversos procesos fisiológicos y metabólicos. De igual manera, la dieta control presentó deformidad de los túbulos grado 3 y menor presencia de vacuolas lipídicas en comparación con los otros tratamientos que mostraron los túbulos lisos y llenos de contenido lipídico, sugiriendo un estado de salud menor en la dieta del control (Morales y Cuéllar 2008).

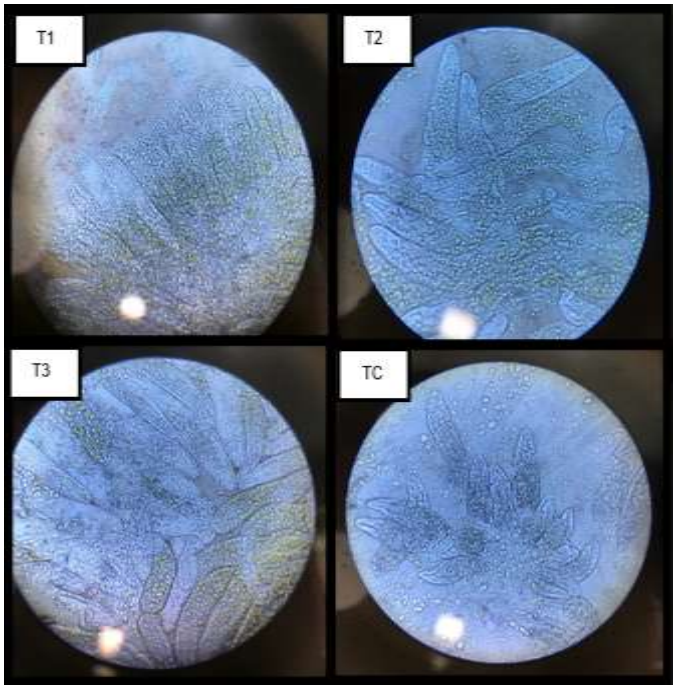

Figura 4: Análisis en fresco de hepatopáncreas de juveniles en los tratamientos y el control (T1- Balanceado con 75% KA y 25% PE- grado 1; T2- Balanceado con 50% KA y 50% PE- grado 1; T3- Balanceado con 50% KAD y 25% PE- grado 1; TC- Balanceado- grado 4).

En cuanto al contenido intestinal no se observaron diferencias notables entre los tratamientos con respecto al control, esto se explica ya que todos estuvieron alimentados con alimento balanceado sin complementos naturales.

Actualmente, es escasa la evidencia que corrobore el uso del kéfir de agua en el campo acuícola; sin embargo, Egea *et al.,* (2020) indican que dicho producto ha sido utilizado en el campo de la medicina humana con propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, probióticas y otros, aportando múltiples beneficios para la salud, tales como, la reducción de los niveles de colesterol y la intolerancia a la lactosa, mostrando resultados efectivos contra organismos patógenos. Sin embargo, Metras *et al.,* (2020) mencionan que no obtuvieron los resultados favorables utilizado en animales (perro y gatos) a una concentración de $1x10^9$ UFC/g.

La aplicación de cepas probióticas inmersas en las dietas alimenticias ha presentado beneficios respecto al crecimiento del camarón con resultados semejantes (Won *et al.,* 2020), donde también se pudo observar que mediante la adición de un potencial coctel de cepas probióticas a base de *Bacillus subtilis* y *Pediocuccus pentosaceus* a una concentración de $1x10^8$ UFC.g^{-1} mejoró notablemente el crecimiento de los camarones. A diferencia de esta investigación, donde los tratamientos alimentados con dietas a basa de kéfir no presentaron diferencias significativas respecto al incremento en biomasa.

En relación con los múltiples beneficios de las cepas probióticas, se conoce que contribuye en el crecimiento, digestibilidad del alimento y refuerzo del sistema inmunológico del camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*), como lo menciona Ringo *et al.,* (2020), quienes establecen que una mezcla de cepas probióticas (*Lactobacillus* sp. y *Lactobacillus pentosus*) a una concentración de 10^7 y $5x10^8$ UFC/g en el alimento mejoraron la digestibilidad enzimática. Por otra parte, Wang et al. (2019) sostienen que con la utilización de una dieta de cepas probióticas (*Lactobacillus pentosus, Lactobacillus fermentum, Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae)* en combinación con el alimento mejoraron significativamente el crecimiento y la tasa de supervivencia de camarones.

Asimismo, Li *et al.,* (2018) mencionan que la cepa probiótica de *Bifidobacterium* (bacterias encontradas en kéfir de agua) mezclado en alimento ha tenido resultados ampliamente positivos en la reducción de bacterias de género vibrios dentro del cultivo de *P. vannamei*. Por otra parte, Roomiani *et al.,* (2018) han probado con una cepa de *Lactobacillus bulgaricus* a una concentración de $10^9 UFC.g^{-1}$ con el alimento en el cultivo de *P. vannamei* y sus resultados son similares a los que presenta esta investigación, donde también encontramos reducción en las colonias de vibrios. Muchos investigadores indican que está ampliamente estudiado los beneficios que producen los conglomerados de bacterias probióticas, tal como lo es el kéfir de agua, que es un consorcio microbiano que podría ayudar en la salud de los animales, por otra parte, la combinación del 50% de kéfir deshidratado y 50% de los productos extracelulares mostraron una reducción significativa del total de las cepas de vibrios en el hepatopáncreas, lo que sugiere, que este consorcio tendría la capacidad de proteger a los animales frente a una enfermedad de origen bacteriano.

De igual manera, dentro del cultivo *P. vannamei* se presentan estudios que respaldan que mediante el uso de mezclas de cepas probióticas en conjunto con levaduras (*Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae)* aplicadas en alimentos han presentado resultados sobresalientes en cuanto a la reducción de vibrios (*V. parahaemolyticus*) asimismo, mostraron efectos preventivos ante la presencia de enfermedades como la hepatopancreatitis necrotizante o Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND), tal como lo menciona Pooljun *et al.,* (2020). El uso de consorcios bacterianos a partir de kéfir de agua aplicado en camarón podría tener impacto positivo a nivel inmunológico donde los tratamientos alimentados con kéfir de agua presentaron una reducción de UFC a diferencia del control que presentó niveles significativos. Estudios de respuestas inmunológicas del camarón alimentados con Kéfir y no, son necesarios para dilucidar la hipótesis antes señalada.

Los resultados obtenidos en esta investigación corroboran los datos de Rosales (2012) quien indica que después de haber administrado un consorcio microbiano de cepas probióticas (*Pedioccocus* sp. y *Bacillus* sp.) y levaduras (*Pichia* sp. y *Dekkera* sp.) observó en las branquias del camarón un bajo número de lamelas con melanosis a diferencias del control que presentó mayor cantidad de necrosis en este tejido, mientras que Kuebutornye *et al.,* (2019) mencionan que el uso de probióticos específicamente especies del género *Bacillus* presentan un efecto directo sobre el control de patógenos mediante la producción de antibióticos, optimización y digestibilidad del alimento, así como mejoramiento de la calidad del agua y fondo. Mientras que las cepas probióticas contenidas en el kéfir tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos, los cuales podrían potencializar la digestibilidad del alimento. Sin embargo, a nivel exógeno u aplicado directamente al agua para medir su efecto no se ha comprobado aun, investigaciones que son sugeridas a realizar.

Nuestros resultados evidencian el efecto del KA y sus productos extracelulares en reducir la carga bacteriana del género *Vibrio* presentes en hepatopáncreas de juveniles de *Penaeus vannamei*, y mejoran estado de salud en los animales, lo cual sugiere su uso en la prevención y control de vibriosis; sin embargo, aún falta someter a experimentación en cultivo a gran escala para determinar si se obtienen resultados similares a los del presente ensayo.

REFERENCIAS

Aguilera, D., Prieto, A., Rodríguez, G., Escalante, K., Gaxiola, G. (2019). A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei reared in biofloc and clear seawater. *Journal of invertebrate pathology*, 167:107-246.

Bergmann, R., Pereira, M., Veiga, S., Schneedorf, J., Oliveira, N., Fiorini, J. (2010). Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Food Science and Technology*, 30: 1022-1026.

Chandrakala, N., Priya, S. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology (IJSRSET)*, 3: 27-33.

Dong, X., Bi, D., Wang, H., Zou, P., Xie, G., Wan, X., . . . Huang, J. (2020). pirABvp -Bearing Vibrio parahaemolyticus and Vibrio campbellii Pathogens Isolated from the Same AHPND-Affected Pond Possess Highly Similar Pathogenic Plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 8:1859.

Eckel, V., Vogel, R. (2020). Genomic and physiological insights into the lifestyle of Bifidobacterium species from water kefir. *Archives of Microbiology*, 202: 1627-1637.

Egea, M., Santos, D., Oliveira Filho, J., Ores, J., Takeuchi, K., Lemes, A. (2020). A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.

Fels, L., Jakob, F., Vogel, R., Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers*, 189: 296-303.

Fernandes, S., Kerkar, S., D'Costa, A., Costa, M., Mishra, A., Shyama, S., Das, K. (2021). Immuno-stimulatory effect and toxicology studies of salt pan bacteria as probiotics to combat shrimp diseases in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 113: 69-78.

Figueredo, A., Fuentes, J., Cabrera, T., León, J., Patti, J., Silva, J., Marcano, N. (2020). Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión. *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 2: 1-22.

Garibay, E., Martínez, M., Calderón, K., Gollas, T., Martínez, L., Vargas, F., Arvayo, M. (2020). La microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biotecnia*, 22: 5-16.

Goméz, C., Carbay, Y., Sorroza, L., Rivera, L. (2019). Sinergia de combinaciones de extractos vegetales para el control de vibriosis en sistema productivo de camarón (Litopenaeus vannamei). *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2: 91-98.

Hai, N. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 119: 917-935.

Kibenge, F. (2019). Emerging viruses in aquaculture. *Current Opinion in Virology*, 34: 97-103.

Kong, J., Wei, W., Liang, Q., Qiao, X., Kang, H., Liu, Y., Wang, W. (2018). Identifying the function of LvPI3K during the pathogenic infection of Litopenaeus vannamei by Vibrio alginolyticus. *Fish & shellfish immunology*, 76: 355-367.

Kuebutornye, F., Abarike, E., Lu, Y. (2019). A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 87: 820-828.

Laureys, D., De Vuyst, L. (2014). Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Applied and enviroment microbiology*, 80: 2564-2572.

Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., . . . Chen, L. (2018). Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26: 381-399.

Ma, S., Kim, A., Lee, W., Kim, S., Lee, S., Yoon, D., . . . Kim, S. (2020). Vibrio harveyi Infection Significantly Alters Amino Acid and Carbohydrate Metabolism in Whiteleg Shrimp, Litopenaeus vannamei. *Metabolites*, 10: 265.

Mathur, N., Sai, C. (2020). Probiotics Therapy for Dermatophytosis. *Book Publisher International*.

McKenzie, V., Kueneman, J., Harris, R. (2018). Probiotics as a tool for disease mitigation in wildlife: insights from food production and medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1429: 18-30.

Metras, B., Holle, M., Parker, V., Miller, M., Swanson, K. (2020). Assessment of commercial companion animal kefir products for label accuracy of microbial composition and quantity. *Journal of animal science*, 98: 1-26.

Meybodi, N., Mortazavian, A. (2017). Probiotic supplements and food products: a comparative approach. *Biochem Pharmacol*, 6: 2167-0501.

Millard, R., Ellis, R., Bateman, K., Bickley, L., Tyler, C., van Aerle, R., Santos, E. (2020). How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. *Journal of invertebrate pathology*, 107369.

Mingmongkolchai, S., Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124: 1334-1346.

Morales, V., Cuéllar, J. (2008). *Patología e inmunología de camarones peneidos.* Rep. de Panamá.

Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., Pitones, V. (2020). Bacillus subtilis, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of microbiology*, 202: 427-435.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Gil-Campos, M., Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10: S49-S66.

Pooljun, C., Daorueang, S., Weerachatyanukul, W., Direkbusarakom, S., Jariyapong, P. (2020). Enhancement of shrimp health and immunity with diets supplemented with combined probiotics: application to Vibrio parahaemolyticus infections. *Diseases of Aquatic Organisms*, 140: 37-46.

Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S., Soltani, M., Hoseinifar, S., Harikrishnan, R., Song, S. (2020). Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 129: 116-136.

Roomiani, L., Ahmadi, S., Ghaeni, M. (2018). Immune response and disease resistance in the white shrimp, Litopenaeus vannamei induced by potential probiotic Lactobacillus. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65: 323-329.

Rosales, M. (2012). *Evaluación de un probiótico en cultivo comercial de camarón blanco Litopenaeus vannamei en Sonora, México. (Tesis de Grado).* Universidad de Sonora.

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicene*, 25: 716-729.

Thirugnanasambandam, R., Inbakandan, D., Abraham, L., Kumar, C., Sundaram, S., Subashni, B., . . . Balasubramanian, T. (2017). De novo assembly and annotation of the whole genomic analysis of Vibrio campbellii RT-1 strain, from infected shrimp: Litopenaeus vannamei. *Microbial pathogenesis*, 113: 372-377.

Thirugnanasambandam, R., Inbakandan, D., Kumar, C., Subashni, B., Vasantharaja, R., Abraham, L., . . . Balasubramanian, T. (2019). Genomic insights of Vibrio harveyi RT-6 strain, from infected "Whiteleg shrimp"(Litopenaeus vannamei) using Illumina platform. *Molecular phylogenetics and evolution*, 130: 35-44.

Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal*, 30: 57-71.

Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y., . . . Zhou, Z. (2018). Use of probiotics in aquaculture of China-a review of the past decade. *Fish Shellfish Immunology*, 86: 734-755.

Wang, L., Su, H., Hu, X., Xu, Y., Xu, W., Huang, X., . . . Wen, G. (2019). Abundance and removal of antibiotic resistance genes (ARGs) in the rearing environments of intensive shrimp aquaculture in South China. *Journal of Enviromental Science and Health, Part B*, 54: 211-218.

Wang, R., Guo, Z., Tang, Y., Kuang, J., Duan, Y., Lin, H., . . . Huang, J. (2020). Effects on development and microbial community of shrimp Litopenaeus vannamei larvae with probiotics treatment. *AMB Express*, 10: 1-14.

Wang, Y., Hu, S., Chiu, C., Liu, C. (2019). Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, Litopenaeus vannamei, than single probiotic strains. *Fish & shellfish immunology*, 84: 1050-1058.

Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W., Lee, S., Bai, S. (2020). Evaluation of Potential Probiotics Bacillus subtilis WB60, Pediococcus pentosaceus, and Lactococcus lactis on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, Litopenaeus vannamei. *Microorganisms*, 8: 281.

Xu, D., Bechtner, J., Behr, J., Eisenbach, L., Geißler, A., Vogel, R. (2018). Lifestyle of Lactobacillus hordei isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 141-149.

Yang, Q., Lü, Y., Zhang, M., Gong, Y., Li, Z., Tran, N., . . . Li, S. (2019). Lactic acid bacteria, Enterococcus faecalis Y17 and Pediococcus pentosaceus G11, improved growth performance, and immunity of mud crab (Scylla paramamosain). *Fish & shellfish immunology*, 93: 135-143.

Zeng, S., Hou, D., Liu, J., Ji, P., Weng, S., He, J., Huang, Z. (2019). Antibiotic supplement in feed can perturb the intestinal microbial composition and function in Pacific white shrimp. *Applied microbiology and biotechnology*, 103: 3111-3122.

Zorriehzahra, M., Delshad, S., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Lazado, C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*, 36: 228-241.