



Respuesta biológica, nutricional y hematoinmune en juveniles *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) alimentados con mezcla probiótica

Yuniel Méndez-Martínez^{1*} ; Yenny G. Torres-Navarrete¹ ; Edilmar Cortés-Jacinto² ;
Marcelo U. García-Guerrero³ ; Luis H. Hernández-Hernández⁴ ; Danis M. Verdecia⁵ 

¹Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Facultad de Ciencias Pecuarias y Biológicas, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Programa de Acuicultura, La Paz, BCS, Mexico.
³Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, Mexico.
⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, Mexico.
⁵Universidad de Granma, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Bayamo, Granma, Cuba.
*Correspondencia: ymendezm@uteq.edu.ec

Recibido: Noviembre 2021; Aceptado: Julio 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar indicadores biológicos, nutricionales y hematoinmunes en juveniles *Cherax quadricarinatus* que fueron cultivados y alimentados con una mezcla de probióticos. **Materiales y métodos.** Un diseño completamente aleatorizado (DCA) con seis tratamientos: 0 (control), 1×10^2 μL , 2×10^2 μL , 3×10^2 μL , 4×10^2 μL y 5×10^2 μL de mezcla de probióticos (Bacterol Shrimp Forte), con tres repeticiones cada una; se utilizaron 18 tanques experimentales de diámetro 1.7 m y área de 2.26 m², con una densidad de 20 juveniles (0.95 ± 0.10 g y 7.78 ± 0.77 mm) por tanque durante 60 días. Se midieron los parámetros biológicos (peso, longitud, aumento de peso, aumento de peso, tasa de crecimiento específico, aumento de longitud, aumento de longitud y supervivencia), nutricionales (conversión alimenticia, eficiencia alimenticia y eficiencia proteica) y hematoinmune (total de hemocitos, hemocitos diferenciales, tasa fagocítica, superóxido dismutasa y estrés hipóxico). **Resultados.** Para los indicadores biológicos, los mejores resultados ($p < 0.05$) se obtuvieron al utilizar 4×10^2 μL del probiótico (peso final: 9.11 g; longitud final: 68.95 mm; tasa de crecimiento específico: 3.74). En cuanto a los parámetros nutricionales, los mejores resultados se obtuvieron con 3×10^2 μL (conversión alimenticia: 1.09, eficiencia alimenticia: 0.91 y eficiencia proteica: 2.61); aunque no hubo diferencias entre 3×10^2 y 4×10^2 μL . Para la respuesta hematoinmune, hubo diferencias ($p < 0.05$) para todos los indicadores en estudio, con un mejor desempeño para 4×10^2 μL de la mezcla de probióticos. **Conclusiones.** La mezcla de probióticos induce la respuesta hematoinmune, biológica y nutricional con la mejor respuesta para concentraciones de 3×10^2 μL y 4×10^2 μL .

Palabras clave: Células hemocitos; estrés hipóxico; tasa de crecimiento; tasa fagocítica; supervivencia (Fuente: DeCS).

Como citar (Vancouver).

de Almeida AC, da Silva NJJ, Santos AJ, de Macedo A, de Souza SC, da Cruz da ST, et al. Respuesta biológica, nutricional y hematoinmune en juveniles *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) alimentados con mezcla probiótica. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2578. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2578>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the effect on biological, nutritional, and hematoimmune indicators of juvenile *Cherax quadricarinatus* were cultivated and fed with a probiotic mixture. **Materials and methods.** A completely randomized design (DCA) with six treatments: 0 (control), 1×10^2 μL , 2×10^2 μL , 3×10^2 μL , 4×10^2 μL and 5×10^2 μL of a probiotic mixture (Bacterol Shrimp Forte), with three repetitions each, 18 experimental tanks of diameter 1.7 m and area of 2.26 m² were used, with a density of 20 juveniles ($0.95 \pm 0.10\text{g}$ and $7.78 \pm 0.77\text{mm}$) per tank for 60 days. Biological (weight, length, weight gain, weight increase, specific growth rate, length gain, length increase and survival), nutritional (feed conversion, feed efficiency and protein efficiency rate) and hematoimmune (total of hemocytes, differential hemocytes, phagocytic rate, superoxide dismutase and hypoxic stress) parameters were measured. **Results.** For biological indicators, the best results ($p < 0.05$) were obtained when using 4×10^2 μL of the probiotic (final weight: 9.11 g; final length: 68.95 mm; specific growth rate: 3.74). Regarding the nutritional parameters, the best results were found with for 3×10^2 μL (feed conversion: 1.09, feed efficiency: 0.91, and protein efficiency: 2.61); although there were no differences between 3×10^2 and 4×10^2 μL . For the hematoimmune response, there were differences ($p < 0.05$) for all the indicators under study, with a better performance for 4×10^2 μL of the probiotic mixture. **Conclusions.** The probiotic mixture induces the hematoimmune, biological, and nutritional response with the best response for concentrations of 3×10^2 μL , 4×10^2 μL .

Keywords: Growth rate; hemocytes cells; hypoxic stress; phagocytic activity; survival (*Source: DeCS*).

INTRODUCCIÓN

La acuicultura se ha convertido en una de las industrias de producción de alimentos de más rápido crecimiento en América Latina (20%) y el mundo (7%) por año; contribuyendo significativamente a la seguridad alimentaria mundial y este crecimiento se ha extendido continuamente durante más de dos décadas (1,2). Después de los peces, los crustáceos se sitúan como el segundo producto de la acuicultura mundial.

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* es una de las especies cultivadas. Es nativa del norte de Australia y al sureste de Papúa Nueva Guinea (3), y se introdujo en varios países de América Latina en los años 90. Es una especie adaptable a un amplio rango de condiciones climáticas, con notables ventajas por sus hábitos alimenticios omnívoros, alta tasa de crecimiento, fácil manejo, adecuadas características organolépticas, buena calidad de carne rica en aminoácidos y ácidos grasos (4). Se aprecia en el mercado tanto con fines ornamentales como para el consumo humano (5).

Sin embargo, en la acuicultura se requiere controlar el estrés y las enfermedades y sin importar la especie, el propósito de esto es asegurar su salud y rendimiento productivo (6).

El uso de tratamientos profilácticos y terapéuticos (antibióticos) se ha utilizado para maximizar la salud y el rendimiento de los organismos cultivados. Sin embargo, los antibióticos han demostrado tener algunas desventajas, ya que penetran en los tejidos corporales reduciendo su calidad de consumo y provocando otros problemas de salud (7,8).

Los antibióticos también están muy restringidos por su impacto en el medio ambiente (9) y porque, eventualmente, muchos microorganismos patógenos se vuelven resistentes (7,10). En este sentido, el uso de aditivos alimentarios amigables con el medio ambiente, como los probióticos, se ha convertido en una buena opción como complementos dietéticos seguros en la industria de alimentos acuícolas, y se encuentran entre las muchas estrategias y alternativas para reducir el uso excesivo de agentes quimioterapéuticos como los antibióticos, desarrollar la capacidad de tolerancia en condiciones de estrés y mejorar la resistencia y la inmunidad del huésped (11,12). También pueden aprovecharse de su huésped invertebrado combatiendo los patógenos a través de un mecanismo de exclusión competitivo (7,13), así como promoviendo el crecimiento, la supervivencia y animales más sanos (11,14). Los probióticos comúnmente utilizados en la acuicultura incluyen bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, bacteriófagos, levaduras y algas unicelulares (10,13,15).

Varios estudios han atribuido una mejora en el crecimiento animal a los beneficios nutricionales de las bacterias probióticas, ya que estimulan la producción de enzimas digestivas y vitaminas y ponen a disposición minerales y oligoelementos (9). Sin embargo, todos los modos de acción discutidos anteriormente requieren que el probiótico particular que se desea utilizar pueda colonizar con éxito la región en la que su efecto pueda ocurrir con éxito (10,12).

En los últimos años, *Bacillus* spp. (16) y levaduras (17) se han probado con frecuencia en la acuicultura de crustáceos. En el caso de *Bacillus* spp., este microorganismo puede esporular, crecer rápidamente y tolerar una amplia gama de condiciones en el hospedador. También se ha demostrado que son muy útiles para mejorar la calidad del agua, reducir la cantidad de bacterias dañinas en el cultivo y maximizar la capacidad de respuesta del huésped sin la adición de antibióticos (18). Además, se ha demostrado que la administración oral de especies de levadura, en particular *Saccharomyces cerevisiae*, mejora la respuesta inmunitaria en los crustáceos (19).

Previamente, se han llevado a cabo muchas investigaciones que involucran la aplicación de bacterias beneficiosas como probióticos (13,14,15). A partir de estas investigaciones, es evidente que una mezcla de varios probióticos podría producir mejores resultados (20). En este sentido, la adición de probióticos mixtos al alimento ha proporcionado beneficios en especies como *Macrobrachium rosenbergii* (6). Sin embargo, la relación dosis-efecto de un probiótico debe determinarse cuidadosamente para evitar una sobredosis, que puede causar una disminución en sus efectos promotores del crecimiento y un aumento en los costos, o por el contrario, el uso de dosis muy bajas podría reducir drásticamente su eficacia en los animales cultivados (14,20).

A pesar de los avances científicos, el conocimiento actual sobre el uso de probióticos como aditivos alimentarios y la respuesta hematoinmune en la acuicultura es escaso para las etapas iniciales de desarrollo en muchas especies, como *Cherax quadricarinatus*. En consideración a lo anterior, el propósito de esta investigación fue evaluar varios indicadores biológicos, nutricionales y hematoinmunes de juveniles de garra roja *Cherax quadricarinatus* alimentados con mezcla de probióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Acuicultura, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Quevedo, Los Ríos, Ecuador (01°03'18"S, 79°25'24"W). A una altitud de 120 msnm con una temperatura media de 24°C.

Consideraciones éticas. El estudio se realizó en estricto apego a los Procedimientos Operativos Estándar (POE) para el Uso de Animales Experimentales de la UTEQ.

Tratamientos y alimentación. Se emplearon seis tratamientos, los cuales consistieron en dosis crecientes de mezcla de probióticos: 0 (control), 1×10^2 μ L, 2×10^2 μ L, 3×10^2 μ L, 4×10^2 μ L y 5×10^2 μ L / 100 L de agua, respectivamente. La mezcla probiótica (Bacterol Shrimp Forte, Dukay SA, CL) que se utilizó contenía cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (5×10^8 CFU / mL), *Lactobacillus acidophilus* (5×10^8 CFU / mL) y *Bacillus* spp. (5×10^8 CFU / mL). La mezcla se incubó con melaza y agua en una proporción de 1.5: 10: 3×10^3 , respectivamente, durante 24 horas, antes de ser suministrada directamente al agua en los tanques de cultivo cada tres días.

Los juveniles se alimentaron diariamente al 5% de su peso vivo con dieta peletizada basal, distribuidos en dos porciones (50% a las 9:00 am y 50% a las 5:00 pm). La dieta peletizada basal se formuló (Tabla 1) y se preparó de acuerdo con Méndez-Martínez et al (4,21) y el análisis proximal (materia seca, proteínas, extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno, cenizas y energía bruta) se realizaron según los métodos de la AOAC (22).

Diseño experimental. Los juveniles de *C. quadricarinatus* (0.95 ± 0.10 g y 7.78 ± 0.77 mm) se obtuvieron en condiciones de laboratorio (UTEQ), y se aclimataron durante una semana antes de iniciar el cultivo experimental de duración de 60 días.

Se aplicó un diseño completamente al azar de seis tratamientos con 3 repeticiones (tanques experimentales) con 20 juveniles de *C. quadricarinatus* por tanque, para un total de 360 juveniles y dieciocho tanques circulares de plástico (diámetro: 0.70 cm y área: 9.39 cm²) conteniendo agua dulce (200 L), respectivamente. El agua de los tanques experimentales se

reemplazó (40%) cada tres días, para eliminar las heces y restos de alimentos. Los parámetros de calidad del agua eran monitoreados, para la determinación de temperatura del agua se empleó un termómetro de mercurio, el oxígeno disuelto (OD) se determinó con un oxímetro digital (55-DO, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA). El pH, amonio (NH_3/NH_4), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) se midieron con Kit colorimétrico (Saltwater Master Test, OH, USA), respectivamente (21).

Tabla 1. Formulación y composición química de la dieta peletizada.

Ingredientes	%
Harina de pescado ¹	48.50
Pasta de soya ²	11.93
Harina de Sorgo ²	10.65
Harina de trigo ³	13.90
Harina de maíz ²	4.50
Lecitina de Soya ³	1.00
Aceite de pescado ⁴	1.52
Grenetina ³	2.00
Carbonato de calcio ³	1.00
Cloruro de colina ³	0.50
Premezclas minerales ^{3*}	2.0
Premezclas vitamínicas ^{3**}	2.0
Vitamina C ³	0.50
Composición proximal real (% Materia Seca)	
Materia seca	92.56
Ceniza	7.76
Extracto Etéreo	7.40
Proteína	35.20
Fibra	3.43
E. L. N. N [†]	38.77
Energía bruta (MJ/g)	15.38

¹Comercial El Gordillo, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. ²Valencia- Avícola, Valencia, Ecuador. ³Supermaxi, Quevedo, Ecuador, ⁴Productos Pesqueros S.A, Manta, Ecuador. ⁶Suministros AZ, La Paz, México.

*(mg/kg dieta) Premezcla mineral: KCl. 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 0.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 0.09; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. 0.0234; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. 0.005; KI. 0.005; $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 0.0025; Na_2HPO_4 . 2.37.

** (mg/kg dieta) Premezcla vitamínica: Vitamina B12 (0.02); Acetato de vitamina A. 5000 UI; Vitamina D3. 4000 UI; acetato de α -tocoferol 100 UI; menadiona (5); tiamina HCl (60); riboflavina (25); piridoxina HCl (50); ácido fólico (10); ácido dl-capantoténico (75); ácido nicotínico (5); biotina (1); inositol (5). [†]Extracto libre de nitrógeno = 100 - (% proteína bruta + % extracto etéreo + % fibra bruta + % ceniza).

La temperatura se mantuvo entre 27.5 y 30°C con ayuda de termostatos (JADAquarium Co., Guangdong, CN) incorporados. El pH de 7.0 – 8.0, el oxígeno disuelto (OD) de 4.7 a 6.2 mg/L, amonio desde 0 a 0.25 ppm, el nitrito en 0.01 ppm y el nitrato con valores de 0 a 10 ppm.

Parámetros biológicos y nutricionales. Para la determinación del peso en juveniles se empleó una balanza digital (PE 3600 Mettler-Toledo, ± 0.01 g, Columbus, OH, USA), la longitud se evaluó con un calibrador vernier (GT-MA15 Gester, ± 0.001 mm, Xiamen, CN), previamente eran anestesiados para la biometría. Se calcularon las siguientes variables (23):

Incremento de peso (%) = (peso final - peso inicial) \times 100

Ganancia de peso (g) = (peso final - peso inicial)

Tasa de crecimiento específico = (logaritmo del peso final - logaritmo del peso inicial / número de días) \times 100

Ganancia de longitud (mm) = (longitud final - longitud inicial)

Incremento de longitud (%) = (longitud final - longitud inicial) \times 100

Supervivencia (%) = (número de organismos finales / número de organismo iniciales) \times 100

Eficiencia alimentaria = (ganancia de peso / consumo de alimento) \times 100

Eficiencia proteica = (ganancia de peso / consumo de proteína)

Conversión alimentaria = (consumo de alimento / ganancia de peso)

Respuesta hematoimmune. Al final de la prueba de alimentación, los juveniles de *C. quadricarinatus* se mantuvieron en ayunas durante 14 horas antes de la extracción de la hemolinfa. Para ello, se colocaron dorsoventral, exponiendo el seno hemolinfático ventral. La superficie se desinfectó con alcohol (90%). La extracción de la hemolinfa se realizó con jeringas estériles (27G \times 13 mm) con aguja hipodérmica entre el primer par de pleópodos. Se utilizó SIC-EDTA como anticoagulante (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.3) a 4 ° C, para preservar una relación 2: 1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen extraído de hemolinfa). Se insertó la aguja hacia arriba, se extrajo la hemolinfa y se homogeneizó inmediatamente para prevenir la coagulación (24).

Luego, las muestras se colocaron en microtubos estériles de polipropileno Eppendorf de 1.5 mL y se etiquetaron. Posteriormente, se diluyeron en una proporción de 3: 1 (150 μ L de formaldehído al 4% por 50 μ L de mezcla de anticoagulante y hemolinfa), los cuales se almacenaron a 4 °C para realizar el recuento total de hemocitos y diferenciales (hialino, semi-granulosos y granulados) (25). Para el análisis de la actividad fagocítica, superóxido dismutasa (SOD) y oxihemocianina, se utilizó hemolinfa sin formaldehído.

La actividad fagocítica se evaluó de acuerdo con Hauton (26) y Chen et al. (27). Se extendió hemolinfa reciente (40 μ l) sobre portaobjetos de vidrio. Luego, se incubaron los portaobjetos hasta que se secó la hemolinfa. Mientras tanto, se preparó una solución de trabajo de zimosan disolviendo 0.0125 g de zimosan en polvo en 25 mL de agua de marina estéril. A las muestras de hemolinfa secas en el portaobjeto se añadió la solución de zimosan (40 μ L) y se secaron al aire. Luego, se trataron con una solución de formaldehído al 10% (disolvente de agua de mar) durante 20 min. Posteriormente, los portaobjetos de vidrio se transfirieron a una solución de GIEMSA y se incubaron durante 20 min para la tinción celular de hemocitos.

Para la determinación de concentración de oxihemocianina, se emplearon 20 μ L de hemolinfa diluida con 80 μ L de SIC-EDTA y se leyó la absorbancia a 335 nm con espectrofotómetro (28, 29). La enzima SOD se determinó a partir de 10 μ L de hemolinfa el cual fue tratado con Kit (Ransel, Randox, Crumlin, Antrim, UK), con principio en la oxidación de glutatión (GSH) por el hidropéroxido de cumeno catalizado por la GPx; en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH; la lectura de absorbancia se realizó a 340 nm.

Al final del bioensayo, se determinó el estrés por hipoxia. Para ello, se utilizaron 18 recipientes de plástico de 200 mL cada uno y seis organismos para cada prueba. Cada recipiente se consideró una repetición. La eliminación del oxígeno disuelto (<0.1 mg / L) en el agua se aseguró mediante la adición de bisulfito de sodio (NaHSO₃) (0.15 g / 500 mL). Los Juveniles se expusieron a hipoxia durante 1 hora. Se realizaron muestreos cada 5 minutos y se registró el número de organismos vivos y muertos.

Análisis estadísticos. Se aplicaron las pruebas de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov. Luego se aplicó un Análisis de Varianza Simple (ANOVA) ($p \leq 0.05$) a los diferentes niveles de mezcla de probióticos, que fue la única fuente de variación. Para el análisis de diferencias entre medias se aplicó una prueba de Tukey. Todo el procesamiento estadístico ($p \leq 0.05$) se realizó con el programa estadístico 14.0v (InfoStat®, Cordova, AR).

RESULTADOS

Los índices biológicos en la presente investigación para los juveniles evaluados se presentan en la Tabla 2. El peso final, incremento de peso, ganancia de peso, tasa de crecimiento específico, longitud final, incremento de longitud y ganancia de longitud ($p < 0.05$) en tratamientos con 3×10^2 μ L y 4×10^2 μ L de la mezcla de probióticos no hubo diferencia estadística, pero sí ($p < 0.05$) en comparación con el control y los demás tratamientos. La supervivencia fue significativamente mayor ($p < 0.05$) (88.33%) para el tratamiento con 3×10^2 μ L de la mezcla de probióticos.

En los parámetros nutricionales (conversión alimenticia, eficiencia alimentaria y eficiencia proteica) (Tabla 2); no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con 3×10^2 μ L y 4×10^2 μ L de la mezcla de probióticos, pero sí hubo diferencias ($p < 0.05$) en comparación con el control y todos los demás.

Diferencias significativas en la respuesta hematoinmune se presentan en la Tabla 3. Los hemocitos totales (9.27 y 11.74 millones de células/mL) y hemocitos hialinos (28.30 y 25.86%) mostraron una mejor respuesta ($p < 0.05$) en los tratamientos con 3×10^2 y 4×10^2 μ L de la mezcla probiótica, respectivamente. Un mayor recuento de hemocitos granulocitos (33.17%) y tasa de fagocitosis (38.28%) se observó ($p < 0.05$) en el tratamiento de 4×10^2 μ L, respectivamente. Mientras que los semigranulocitos fueron mayores en el control con 60.79%. Para la oxihemocianina, los valores más altos ($p < 0.05$) fueron 0.84 y 0.82 mmol / L, cuando se aplicaron 2×10^2 μ L y 3×10^2 μ L de mezcla de probióticos, siendo mayor ($p < 0.05$) en comparación con el control.

Tabla 2. Indicadores biológicos y nutricionales en juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados con mezcla de probióticos durante 60 días.

Indicadores	Mezcla de probióticos ($\times 10^2 \mu\text{L}$)						EE \pm	P-valor
	0	1	2	3	4	5		
PI (g)	0.97	0.93	0.93	0.96	0.96	0.94	0.055	0.567
TI (mm)	7.95	7.56	7.58	7.8	7.84	7.68	0.995	0.494
PF (g)	6.21 ^d	7.33 ^c	7.51 ^c	8.85 ^a	9.11 ^a	8.28 ^b	1.967	0.001
TF (mm)	47.26 ^e	58.71 ^c	55.37 ^d	67.62 ^a	68.95 ^a	63.52 ^b	3.567	0.001
TCE	3.09 ^d	3.44 ^c	3.48 ^c	3.71 ^a	3.74 ^a	3.62 ^b	0.040	0.001
IP (%)	523.98 ^d	640.25 ^c	658.17 ^c	789.23 ^a	815.01 ^a	733.10 ^b	10.34	0.001
GP (g)	5.24 ^d	6.40 ^c	6.58 ^c	7.89 ^a	8.15 ^a	7.33 ^b	0.578	0.001
IT (%)	65.53 ^e	85.24 ^c	79.65 ^d	99.71 ^a	101.84 ^a	93.07 ^b	3.789	0.001
GT (mm)	39.32 ^e	51.14 ^c	47.79 ^d	59.83 ^a	61.10 ^a	55.84 ^b	2.456	0.001
CA	1.54 ^d	1.33 ^c	1.27 ^{bc}	1.09 ^a	1.13 ^{ab}	1.24 ^{bc}	0.150	0.011
EA	0.65 ^d	0.75 ^c	0.79 ^c	0.91 ^a	0.89 ^{ab}	0.81 ^{bc}	0.110	0.012
EP	1.87 ^d	2.15 ^c	2.24 ^c	2.61 ^a	2.53 ^{ab}	2.31 ^{bc}	0.280	0.010
SP (%)	66.67 ^e	71.67 ^d	83.33 ^b	88.33 ^a	81.67 ^b	76.67 ^c	4.673	0.020

EE \pm = Error Estándar. ^{abcde} Superíndices distintos difieren significativamente ($p < 0.05$), dentro de las filas. Peso Final, Longitud Final, TCE: Tasa de Crecimiento Específico, IP: Incremento de Peso, GP: Ganancia de Peso, IL: Incremento de longitud, GL: Ganancia de longitud, CA: Conversión Alimentaria, EA: Eficiencia Alimentaria, EP: Eficiencia Proteica, SP: Supervivencia.

Tabla 3. Indicadores inmunes en juveniles de *Cherax quadricarinatus* alimentados con mezcla de probióticos durante 60 días.

Indicadores	Mezcla de probióticos ($\times 10^2 \mu\text{L}$)						EE \pm	P-valor
	0	1	2	3	4	5		
HT (millón de células/mL)	4.39 ^d	6.35 ^c	5.84 ^c	9.27 ^{ab}	11.74 ^a	8.16 ^b	2.17	0.034
CHH (%)	15.71 ^c	15.50 ^c	21.72 ^b	28.30 ^a	25.86 ^a	21.41 ^b	3.64	0.031
CHS (%)	60.79 ^a	54.22 ^b	51.39 ^b	42.79 ^c	41.30 ^c	52.66 ^b	4.22	0.012
CHG (%)	23.50 ^d	30.27 ^b	26.88 ^{bc}	28.91 ^b	33.17 ^a	25.93 ^c	2.46	0.016
TF (%)	15.89 ^d	18.64 ^d	29.61 ^b	24.87 ^c	38.28 ^a	26.44 ^{bc}	3.37	0.043
OX (mmol/L)	0.66 ^c	0.63 ^c	0.84 ^a	0.82 ^a	0.73 ^b	0.71 ^b	0.21	0.006

EE \pm = Error Estándar. ^{abcd} Superíndices distintos difieren significativamente ($p < 0.05$), dentro de las filas. OX: Oxihemocianina, HT: Hemocitos Totales, CHH: Células hemocitos hialinos, CHS: Células hemocitos Semi granulocitos, CHG: Células hemocitos Granulocitos, TF: Tasa de Fagocitosis.

Al analizar los porcentajes de supervivencia al estrés por hipoxia de la actividad de SOD (Figuras 1 y 2), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) dependiendo de la dosis. Los mayores valores de supervivencia por hipoxia se encontraron en el tratamiento de $4 \times 10^2 \mu\text{L}$ con 76.19%. Cabe destacar que se obtuvieron incrementos de 19.05, 57.15,

47.62, 66.67 y 57.15% (1, 2, 3 y $4 \times 10^2 \mu\text{L}$ de mezcla probiótica) en comparación con el control. Mientras que la enzima SOD mantuvo una tendencia similar. Su valor más alto fue con la concentración de $2 \times 10^2 \mu\text{L}$ (41.18 Unidades / mL), aunque esta concentración no tuvo diferencias significativas en comparación con $4 \times 10^2 \mu\text{L}$ de la mezcla de probióticos.

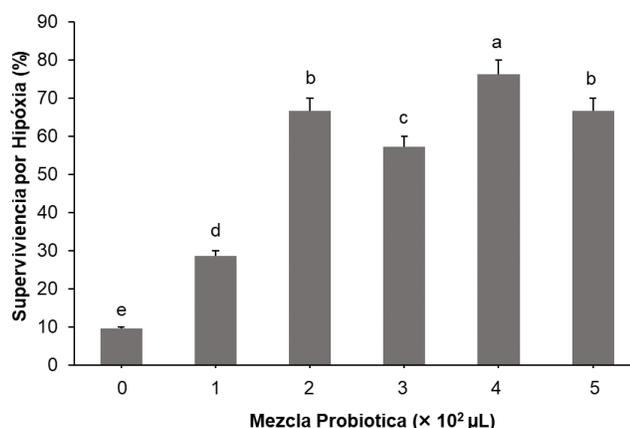


Figura 1. Supervivencia a estrés por hipoxia (\pm EE) en juveniles de *C. quadricarinatus* alimentados con mezcla de probióticos durante 60 días.

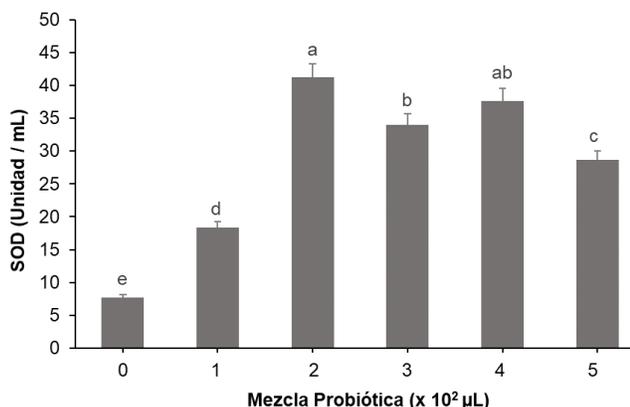


Figura 2. Actividad de enzima SOD (\pm EE) en juveniles de *C. quadricarinatus* alimentados con mezcla de probióticos durante 60 días.

DISCUSIÓN

En la acuicultura, así como en otras industrias en crecimiento, el uso de organismos probióticos está teniendo una amplia aceptación, ya que es útil para mejorar la resistencia, para tratar infecciones y enfermedades, así como para mejorar el crecimiento, la supervivencia y la calidad del agua (6,12). Durante las prácticas de acuicultura, la acumulación de materia orgánica afecta la calidad del agua y causa contaminación. También permite que los patógenos crezcan dentro del cultivo. La calidad del agua en nuestro estudio estuvo de acuerdo con los estándares para los crustáceos decápodos de agua dulce, incluido *C. quadricarinatus* (23,30,31,32).

Los parámetros biológicos y nutricionales en la presente investigación fueron influenciados por la dosis de las mezclas probióticas como

resultado del efecto sinérgico entre las cepas y sus metabolitos secundarios. Este efecto puede ser beneficioso ya que las cepas probióticas no solo sintetizan enzimas extracelulares como proteasas, amilasas y lipasas, sino también otros compuestos necesarios para el crecimiento (vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos), que contribuyen a la absorción de nutrientes de manera más eficiente (15). Esto ha sido probado previamente por Seenivasan et al. (6), al complementar con diferentes dosis de probiótico, reportó supervivencia (90%), crecimiento (1.04 g), tasa de crecimiento (0.88%), conversión alimenticia (1.57 g) y eficiencia proteica (1.38%) significativamente mayor con respecto al control tratamiento. En otros estudios se han encontrado efectos positivos de los probióticos, como es el caso de *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp. sobre el crecimiento de *M. rosenbergii*, donde se ha demostrado que estos aditivos alimentarios mejoran la digestión, asimilación y metabolismo de nutrientes en crustáceos y peces al promover la síntesis de enzimas digestivas, mejorando el crecimiento y la supervivencia (33).

En algunas investigaciones anteriores se ha probado el uso de probióticos en *C. quadricarinatus*, donde Amrullah y Wahidah (14) encontraron aumentos de peso corporal de hasta 7.30 g, con 2.63 g superiores al tratamiento control y con una supervivencia del 73% mientras alimentaban a la especie con dietas suplementadas con tres concentraciones diferentes de la mezcla probiótica de *Micrococcus* spp. Este efecto puede ser causado por el comportamiento simbiótico de los probióticos, además de estimular la microbiota del tracto digestivo con una biota intestinal más eficiente y estimular la actividad de enzimas bacterianas (11).

Pérez-Chabela et al (34) encontraron que el uso de una mezcla con cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*, suministradas en los alimentos como probióticos a los juveniles de *Litopenaeus vannamei*, mejora las tasa de crecimiento al aumentar la concentración de la mezcla de probióticos. Madani et al (35), al evaluar el efecto de mezclar probióticos (*Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*) en larvas de *L. vannamei*, encontraron que la adición de la mezcla de probióticos al alimento tuvo un efecto positivo en el crecimiento, lo cual fue confirmado por Zhao et al (36) en *Macrobrachium rosenbergii*, encontrando efectos beneficiosos sobre parámetros biológicos y nutricionales, así como una mejora en la acción de las enzimas digestivas y optimización de costos.

La Tabla 2 muestra que los probióticos mejoraron el crecimiento y la absorción de nutrientes debido a su capacidad para estimular la microbiota intestinal beneficiosa, también con efectos hematoinmuno-reguladores (10). En *C. quadricarinatus*, Amrullah y Wahidah (14), encontraron que las mezclas de probióticos con *Micrococcus* spp. aumentaron los hemocitos totales, hemocitos hialinos, semigranulocitos y granulocitos, así como la actividad fagocítica. Esta es una de las razones del aumento de la actividad inmunológica provocada por la activación de la respuesta inmune inespecífica. Los hemocitos son un indicador confiable para determinar y prevenir enfermedades, así como un marcador del estado fisiológico del animal, dado a que los hemocitos en los crustáceos son la base del sistema inmunológico ya que realizan fagocitosis, encapsulación y lisis de células no deseadas (16).

Los hemocitos juegan un papel vital en la defensa, las células hialinas son responsables de la fagocitosis, los semigránulos también juegan un papel en la fagocitosis, encapsulación y liberación del sistema de profenoloxidasa. Además, sintetizan y liberan peneidinas y péptidos, las células granuladas almacenan las enzimas que constituyen el sistema profenoloxidasa a un nivel superior a las semigranulares, así como sintetizan y almacenan las peneidinas, intervienen en la encapsulación; que han demostrado ser una parte importante del sistema inmunológico innato (17). Zhao et al (36), al utilizar diferentes concentraciones de *Bacillus pumilus* en *M. rosenbergii*, no encontraron diferencias en el recuento total de hemocitos, mientras que para la actividad fagocítica (37%), las diferencias fueron altamente significativas.

Valipour et al (37), utilizaron *Lactobacillus plantarum* en *Astacus leptodactylus* para evaluar su efecto sobre la respuesta inmune, encontrando aumentos de 1.2×10^6 células / mL y 1.4×10^6 células / mL para el recuento total de hemocitos y hemocitos hialinos, respectivamente. Azad et al (38) evaluaron el efecto de los probióticos sobre la competencia inmunológica de *M. rosenbergii* contra *Vibrio* spp. y *Aeromonas* spp., encontrando que los langostinos tratados con probióticos mejoraron los parámetros hematoinmunes y el recuento total de hemocitos

(11×10^5 células / mL), hemocitos hialinos (79%) y hemocitos semigranulocitos (19%). Dichos resultados difieren de los obtenidos en este trabajo, los cuales pueden atribuirse a especies, condiciones experimentales, tipo de probiótico o diseño experimental. Los resultados obtenidos indican una mayor capacidad para prevenir la invasión de partículas extrañas. Se sabe que los hemocitos también están involucrados en diferentes funciones fisiológicas, incluido el metabolismo de los carbohidratos, el transporte y almacenamiento de proteínas y aminoácidos, la regulación del estrés, lo que conduce a una resistencia a las enfermedades (13,15).

En el presente estudio, la actividad de la SOD fue influenciada significativamente ($p < 0.05$) por la concentración de probióticos. Dado que el estado nutricional es el factor más importante que influye en los mecanismos de defensa inmunológica, donde cantidades bajas o altas de nutrientes pueden alterar el sistema inmunológico y provocar estrés celular (32). En este sentido, Soberanes-Yepiz et al (39), encontraron que la alta actividad antioxidante es consecuencia de múltiples reacciones oxidativas y por lo tanto, un índice de una alta producción de radicales libres. En la presente investigación, el uso de probióticos puede ser una herramienta importante como inmunoestimulante para prevenir enfermedades, dado el papel que juegan las bacterias beneficiosas en la prevención de la propagación de patógenos.

Ranjit-Kumar et al (40), al utilizar diferentes concentraciones de *Bacillus licheniformis* como probiótico, encontraron un aumento de superóxido dismutasa (SOD) y actividad antibacteriana (76%), lo que confirma tales suposiciones. En los crustáceos decápodos, el nivel de SOD disminuye durante la infección patógena, y causa retraso de la actividad normal de las células del hepatopáncreas y los hemocitos. Por lo tanto, el aumento de la actividad de SOD con suplementación probiótica es un índice del estado inmunológico regulado positivamente.

En conclusión, las mezclas de probióticos inducen una respuesta hematoinmune mejorando los indicadores biológicos y nutricionales. Este efecto es mejor a concentraciones de 3×10^2 μ L y 4×10^2 μ L.

Conflicto de intereses

Declaramos todos los autores que durante la realización y elaboración de este trabajo no existió ningún tipo de conflicto de interés.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a L. Ramos y D. Zapatier, por el apoyo técnico. La investigación estuvo respaldada por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. El Proyecto de Investigación de soporte es de la convocatoria FOCYCYT- 6ta, proyecto: PFOC6-22-20.

REFERENCIAS

1. Sonnenholzner-Varas JI. ¿Hacia dónde va la acuicultura de equinodermos en América Latina? Potencial, retos y oportunidades. *Rev Biol Trop.* 2021; 69(S1):514-549. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69iSuppl.1.46393>
2. FAO. FishStatJ tool for fishery statistics analysis, Release 2.0.0. Universal software for fishery statistical time series. Global capture and aquaculture production: Quantities 1950-2019; Aquaculture values 1984-2019. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. Rome; 2021. <https://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
3. Numes AL, Zengeya TS, Hoffman AC, Measey GJ, Wey OLF. Distribution and establishment of the alien Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, in South Africa and Swaziland. *PeerJ.* 2017; 5:e3135. <https://doi.org/10.7717/peerj.3135>
4. Méndez-Martínez Y, Ceseña CE, Luna-González A, García-Guerrero MU, Martínez-Porchas M, Campa-Cordova AI, et al. Effects of different dietary protein-energy ratios on growth, carcass amino acid and fatty acid profile of male and female *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) pre-adults. *Aquac Nutr.* 2021. 00: 1-16. <https://doi.org/10.1111/anu.13379>
5. Norshida I, Mohd-Nasir MSA, Khaleel AG, Sallehuddin AS, Syed Idrus SN, Istiqomah I, et al. First wild record of Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) in the East Coast of Peninsular Malaysia. *Bioinvasions Rec.* 2021; 10(2):360-368. <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.2.14>
6. Seenivasan C, Saravana Bhavan P, Radhakrishnan S. Effect of probiotics (Binifit™) on survival, growth, biochemical constituents and energy budget of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Elixir Aquaculture.* 2011; 41:5919-5927. https://www.elixirpublishers.com/index.php?route=product/search&filter_name=macrobrachium&filter_type=Anywhere
7. Sapcharoen P, Rengpipat S. Effects of the probiotic *Bacillus subtilis* (BP 11 and BS 11) on the growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Nutr.* 2013; 19(6):946-954. <https://doi.org/10.1111/anu.12040>
8. Peredo AM, Buentello A, Gatlin DMIII, Hume M. Evaluation of a Dairy-Yeast Prebiotic in the Diet of Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J World Aquac Soc.* 2015; 46:92-101. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v42i1.47960>
9. Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol.* 2013; 15(7):1917-1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
10. Kuebutornye FK, Abarike ED, Lu Y. A review on the application of Bacillus as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 2019; 87:820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>

11. Sumon MS, Ahmmed F, Khushi SS, Ahmmed MK, Rouf MA, Hasan-Chisty MA, et al. Growth performance, digestive enzyme activity and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* fed with probiotic *Clostridium butyricum* incorporated diets. J King Saud Univ Sci. 2018; 30(1):21-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2016.11.003>
12. Foysal J, Fotedar R, Siddik MA, Chaklader R, Tay A. *Lactobacillus plantarum* in black soldier fly (*Hermetica illucens*) meal modulates gut health and immunity of freshwater crayfish (*Cherax cainii*). Fish Shellfish Immunol. 2021; 108: 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.11.020>
13. Wee WC, Mok CH, Romano N, Ebrahimi M, Natrah I. Dietary supplementation use of *Bacillus cereus* as quorum sensing degrader and their effects on growth performance and response of Malaysian giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* juvenile towards *Aeromonas hydrophila*. Aquac Nutr. 2018; 24(6):1804-1812. <https://doi.org/10.1111/anu.12819>
14. Amrullah A, Wahidah W. Immune response and growth performance of crayfish *Cherax quadricarinatus* fed with synbiotic supplemented diet. JAI. 2019; 18(1):33-45. <https://doi.org/10.19027/jai.18.1.33-45>
15. Rebecca M, Gao Q, Sun C, Liu B, Song C, Adisu D, et al. Effect of dietary *Clostridium butyricum* and different feeding patterns on growth performance, antioxidant and immune capacity in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Aquac Res. 2020; 52(1):12-22. <https://doi.org/10.1111/are.14865>
16. Ambas I, Fotedar R, Buller N. Health Status of Marron, *Cherax cainii* (Austin, 2002) Fed Customized Probiotic *Bacillus mycoides*. J Aquac Mar Biol. 2017; 6(4):00165. <http://dx.doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00165>
17. Phupet B, Pitakpornpreecha T, Baowubon N, Runsaeng P, Utarabhand P. Lipopolysaccharide-and β -1, 3-glucan-binding protein from *Litopenaeus vannamei*: purification, cloning and contribution in shrimp defense immunity via phenoloxidase activation, Dev Comp Immunol. 2018; 81:167-179. <https://doi: 10.1016/j.dci.2017.11.016>
18. Kuebutornye FKA, Abarike ED, Lu Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 2019; 87:820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>
19. Babu DT, Antony SP, Joseph SP, Bright AR, Philip R. Marine yeast *Candida aquatextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. J Inverte Pathol. 2013; 112(3):243-252. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.002>
20. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol Rev. 2016; 30(3):404-427. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>
21. Méndez-Martínez Y, Pacheco-Morales GK, Del Barco-Ibarra KA, Torres-Navarrete YG, Hernández-Vergara MP. Respuesta bioquímica e inmune en tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* \times *O. niloticus*) con suplementación de quitosano en dieta. Rev Fac Agron Luz. 2021; 38(4), 1016-1034. [https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v38.n4.15](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v38.n4.15)
22. AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). Official methods of analysis of AOAC International. 21st ed., Rockville, MD, USA: AOAC; 2019. <https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/Front-Matter-List-of-Changes-2.pdf>
23. Méndez-Martínez Y, García-Guerrero MU, Arcos-Ortega FG, Martínez-Córdova LR, Yamasaki-Granados S, Pérez-Rodríguez JC, et al. Effect of different ratios of dietary protein-energy on growth, body proximal composition, digestive enzyme activity, and hepatopancreas histology in *Macrobrachium Americanum* (Bate, 1868) prawn juveniles. Aquaculture. 2018; 485:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.012>
24. Vargas-Albores F, Guzman MA, Ochoa JL. A lipopolysaccharide binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. Comp Biochem Physiol. 1993; 104:407-413. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90387-K](https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90387-K)
25. Johansson M, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture. 2000; 191:45-52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X)

26. Hauton C L. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*. 1998; 119(4):619–623. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)00036-4)
27. Chen H, Mai K, Zhang W, Liufu Z, Xu W, Tan B. Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish Shellfish Immunol*. 2005; 19(3):241–252. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.006>
28. Hagerman L. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. *Mar Biol*. 1983; 17:11-17. <https://doi.org/10.1007/BF00393205>
29. Chen W, Cheng JC. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. 2000; 10: 387-391. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0264>
30. Jones CM, Valverde C. Development of Mass Production Hatchery Technology for the Redclaw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Freshw Crayfish*. 2020; 25(1):1–6. <https://doi.org/10.5869/fc.2020.v25-1.001>.
31. Gainza O, Romero J. Manano oligosacáridos como prebióticos en acuicultura de crustáceos. *Lat Am J Aquat Res*. 2017; 45(2):246-260 <https://doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-2>
32. Paul P, Rahman A, Ghosh A. Observation of probiotics effect on the growth, survival and production of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in south-west part of Bangladesh. *Int J Biosci*. 2019; 14(3):45-53. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/14.3.45-53>
33. Pérez-Chabela ML, Alvarez-Cisneros YM, Soriano-Santos J, Pérez-Hernández MA. Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*. 2020; 30(1):93-105. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcb/hidro/2020v30n1>
34. Madani NSH, Adorian TJ, Ghafari-Farsani H, Hoseinifar SH. The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquac Res*. 2018; 49:1926-1933. <https://doi.org/10.1111/are.13648>
35. Zhao C, Zhu J, Hu J, Dong X, Sun L, Zhang X, et al. Effects of dietary *Bacillus pumilus* on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquac Nutr*. 2019; 25(3):712-720. <https://doi.org/10.1111/anu.12894>
36. Valipour A, Nedaei S, Noori A, Asghar A, Hossein S. Dietary *Lactobacillus plantarum* affected on some immune parameters, air exposure stress response, intestinal microbiota, digestive enzyme activity and performance of narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz). *Aquaculture*. 2019; 504:121-130. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.064>
37. Azad MAK, Islam SS, Sithi IN, Ghosh AK, Banu GR, Bir J, et al. Effect of probiotics on immune competence of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquac Res*. 2018; 50(2):644-657. <https://doi.org/10.1111/are.13942>
38. Soberanes-Yepiz ML, Méndez-Martínez Y, García-Guerrero MU, Ascencio F, Violante-González J, García-Ibañez S, et al. Superoxide dismutase activity in tissues of juvenile cauque river prawn (*Macrobrachium americanum* Bate, 1868) fed with different levels of protein and lipid. *Lat Am J Aquat Res*. 2018; 46(3):543-550. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue3-fulltext-7>
39. Ranjit-Kumar N, Prakash-Raman R, Jadhao SB, Kumar-Brahmchari R, Kumar K, Dash G. Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquacult Int*. 2013; 21:387-403. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9567-8>