



Evaluación del efecto de *Bacillus firmus* C101 en el crecimiento de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* Boone (camarón blanco) y *Brachionus plicatilis* s.s. Müller (rotífero)

Effect of *Bacillus firmus* C101 on the growth of *Litopenaeus vannamei* Boone (White Shrimp) post-larvae, and *Brachionus plicatilis* s.s. Müller (Rotifer)

Jordan Steven Ruiz-Toquica¹, Laura Milena Becerra-Real¹ y Luisa Marcela Villamil Díaz^{2*}

0000-0002-5456-2434

0000-0003-3565-2343

0000-0003-2188-5453

1. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias Naturales e Ingenierías. Programa de Biología Marina. Bogotá, Colombia. jordansteven6@gmail.com; laura_milena1990@hotmail.com
2. Doctorado en Biociencias, Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana. Chía, Colombia. luisa.villamil@unisabana.edu.co *Autora para correspondencia

RESUMEN

La creciente demanda de proteína acuícola sugiere buscar alternativas biotecnológicas que mejoren el cultivo de especies de interés comercial. En este estudio se evaluó *Bacillus firmus* C101 como promotor del crecimiento y potencial probiótico, el cual fue caracterizado y posteriormente administrado (10^6 UFC mL⁻¹ * día) en poslarvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y en rotíferos (*Brachionus plicatilis* sensu stricto). Se observó que *B. firmus* C101 tiene tolerancia a sales biliares, fuerte actividad fosfatasa y actividad antimicrobiana frente a patógenos como *Vibrio alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila*, entre otros. Por otro lado, tras su administración por tres semanas a poslarvas de camarón causó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la tasa específica de crecimiento (TEC = $3,8 \pm 0,7$ % día⁻¹), el incremento de peso diario (ADG = $1,5 \pm 0,1$ mg día⁻¹) y en la tasa de conversión alimenticia (TCA = $1,5 \pm 0,1$ %) en comparación con los controles sin adición de esta bacteria (PBS estéril). Así mismo, la administración de *B. firmus* C101 (10^6 UFC mL⁻¹ * día) a rotíferos causó un aumento en la tasa de crecimiento poblacional (TC = $20,2 \pm 1,5$ % día⁻¹), fecundidad (F = $0,4 \pm 0,03$ huevos individuos⁻¹) y productividad (R = $16,0 \pm 0,7$ individuos mL⁻¹ * día), después de 48 h de cultivo. Con base en lo anterior y en comparación con otros estudios, se sugiere a *B. firmus* C101 como potencial probiótico y promotor del crecimiento en poslarvas de camarón, y como primer reporte del efecto de su administración en rotíferos. No obstante, se precisan estudios sobre los posibles mecanismos de acción, y pruebas a escala piloto y comercial para validar estos resultados y su posible transferencia al sector productivo.

PALABRAS CLAVE: probiótico, promotor del crecimiento, *Bacillus firmus*, camarón blanco, rotíferos.

ABSTRACT

The growing demand for aquaculture protein suggests seeking biotechnological alternatives that improve the cultivation of species of commercial interest. In this study, *Bacillus firmus* C101 was evaluated as a growth promoter and probiotic potential, which was characterized and subsequently administered (10^6 CFU mL⁻¹ * day) in post-larvae of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rotifers (*Brachionus plicatilis* sensu stricto). *B. firmus* C101 was observed to have the tolerance to bile salts, strong phosphatase activity, and antimicrobial activity against pathogens such as *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila*, among others. On the other hand, after its administration for three weeks to postlarvae of shrimp, it caused a significant increase ($p < 0.05$) in the specific growth rate (TEC = 3.8 ± 0.7 % day⁻¹), the increase in daily weight (ADG = 1.5 ± 0.1 mg day⁻¹) and in the feed conversion rate (TCA = 1.5 ± 0.1 %) compared to controls without the addition of this bacterium (sterile PBS). Likewise, the administration of *B. firmus* C101 (10^6 CFU mL⁻¹ * day) to rotifers caused an increase in the population growth rate (TC = 20.2 ± 1.5 % day⁻¹), fertility (F = 0.4 ± 0.03 eggs individuals⁻¹) and productivity (R = 16.0 ± 0.7 individuals mL⁻¹ * day) after 48 h of culture. Based on the above and in comparison with other studies, *B. firmus* C101 is suggested as a potential probiotic and growth promoter in shrimp postlarvae, and as the first report of the effect of its administration in rotifers. However, studies on the possible mechanisms of action are required, as well as tests on a pilot and commercial scale to validate these results and their possible transfer to the productive sector.

KEYWORDS: probiotic, growth promoter, *Bacillus firmus*, white shrimp, rotifers.

DOI: 1025268/bimc.invemar.2020.49.1.774.

Publicado por INVEMAR

Este es un manuscrito de acceso abierto bajo la licencia CC Reconocimiento-No Comercial-Compartir Igual

Published by INVEMAR

This is an open Access article under the CC BY-NC-SA

INTRODUCCIÓN

En acuicultura, los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades apropiadas, proveen beneficios en la salud de los hospederos” (FAO, 2001; Bajagai *et al.*, 2016). Estos microorganismos son capaces de secretar sustancias antagonicas, factores de crecimiento, nutrientes esenciales y enzimas digestivas, que promueven y mejoran la digestión, el crecimiento, la respuesta inmune y la respuesta al estrés (Nimrat *et al.*, 2013; Hoseinifar *et al.*, 2017). Para su aplicación en organismos acuáticos de cultivo, deben cumplir con ciertas características tales como una alta tolerancia a sales biliares, crecimiento a amplios rangos de temperatura, salinidad y pH, así como habilidad para adherirse a la mucosidad del tracto intestinal y no mostrar factores de virulencia (Kazuñ y Kazuñ, 2014; Dawood *et al.*, 2018).

En la actualidad, numerosas cepas bacterianas del género *Bacillus* se utilizan como probióticos para promover el crecimiento en organismos acuáticos cultivados (Kumar *et al.*, 2016; Ringø y Song, 2016), especialmente en estadios larvarios (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2016; Zorriehzahra *et al.*, 2016). De esta manera, se ha descrito previamente el efecto de cepas de *B. firmus* como promotores del crecimiento y supervivencia en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Yuniarti *et al.*, 2013; Barman *et al.*, 2017), una especie de interés comercial que actualmente se ve afectada por enfermedades bacterianas, especialmente durante las etapas larvarias (Flores-Miranda *et al.*, 2012; López León *et al.*, 2016).

Así mismo, se ha demostrado que las bacterias probióticas tienen un efecto positivo en la productividad, crecimiento poblacional y fecundidad de organismos como los rotíferos del género *Brachionus* sp. (Najmi *et al.*, 2018), los cuales son utilizados como alimento vivo en el cultivo de organismos acuáticos en estadios larvarios (Gatesoupe, 1991; Hirata *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2013). En consecuencia, la creciente demanda en la bioseguridad en la cadena de producción, ha exigido el uso de estrategias biotecnológicas que eviten el uso inadecuado de antibióticos, y que permitan mejorar la respuesta fisiológica en los estadios larvarios y postlarvarios de especies como el camarón blanco, así como la calidad y los parámetros de los cultivos de rotíferos (Vieira *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Por consiguiente, el presente estudio presenta las características de *B. firmus* C101 como promotor del crecimiento y posible candidato probiótico para poslarvas de camarón blanco (*L. vannamei*), y en el cultivo de rotíferos (*B. plicatilis* s.s.).

INTRODUCTION

In aquaculture, probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in appropriate amounts, provide benefits to the health of the hosts” (FAO, 2001; Bajagai *et al.*, 2016). These microorganisms are capable of secreting antagonistic substances, growth factors, essential nutrients, and digestive enzymes, which promote and improve digestion, growth, immune response, and the stress response (Nimrat *et al.*, 2013; Hoseinifar *et al.*, 2017). For their application in cultured aquatic organisms, they must meet certain characteristics such as a high tolerance to bile salts, growth at wide ranges of temperature, salinity, and pH, as well as the ability to adhere to mucus in the intestinal tract and not show factors of virulence (Kazuñ and Kazuñ, 2014; Dawood *et al.*, 2018).

Currently, numerous bacterial strains of the *Bacillus* genus are used as probiotics to promote growth in cultured aquatic organisms (Kumar *et al.*, 2016; Ringø and Song, 2016), especially in larval stages (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2016; Zorriehzahra *et al.*, 2016). In this way, the effect of *B. firmus* strains as growth and survival promoters has been previously described in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (Yuniarti *et al.*, 2013; Barman *et al.*, 2017), a species of commercial interest that is currently affected by bacterial diseases, especially during the larval stages (Flores-Miranda *et al.*, 2012; López León *et al.*, 2016).

Likewise, probiotic bacteria have been shown to have a positive effect on the productivity, population growth and fertility of organisms such as rotifers of the genus *Brachionus* sp. (Najmi *et al.*, 2018), which are used as live food in the cultivation of aquatic organisms in larval stages (Gatesoupe, 1991; Hirata *et al.*, 1998; Zink *et al.*, 2013). Consequently, the growing demand for biosecurity in the production chain has required the use of biotechnological strategies that avoid the inappropriate use of antibiotics, and that allow improving the physiological response in the larval and post-larval stages of species such as white shrimp, as well as the quality and parameters of rotifer cultures (Vieira *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Therefore, the present study presents the characteristics of *B. firmus* C101 as a growth promoter and possible probiotic candidate for postlarvae of white shrimp (*L. vannamei*), and in the culture of rotifers (*B. plicatilis* s.s.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de cepas bacterianas y mantenimiento en medios de cultivo

C101 fue aislado de branquias de larvas sanas de Cobia (*Rachycentron canadum*). Para los ensayos, C101 fue cultivado en agar y caldo Trypticase Soya (TSA y TSB, Becton Dickinson™) con NaCl 1 % y en agar Marino (Zobell™). *Vibrio alginolyticus*, se obtuvo de un episodio de mortalidad de Jurel (*Caranx hippos*) de un acuario local y *V. harveyi* BB120 (Bassler *et al.*, 1997), ambos se cultivaron en agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (Becton Dickinson™), agar Sangre-Cordero (Becton Dickinson™) y agar Nutritivo (Sigma-Aldrich). *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* y *Streptococcus agalactiae* se aislaron de mortalidades de Tilapia (*Oreochromis* spp.) y fueron obtenidos de la colección de microorganismos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia y cultivados en medios TSA, TSB y Sangre-Cordero. Para la preservación a largo plazo, las bacterias se cultivaron en caldo TSB y fueron almacenadas a -80 °C con 20 % de glicerol (Murillo y Villamil, 2011).

Caracterización de C101

La morfología se describió a través de microscopía óptica (Olympus CX22) y el carácter Gram a través de tinción (Claus, 1992). Se realizaron las pruebas catalasa y oxidasa (tetrametil-para-fenilendiamina) y se obtuvo el perfil enzimático con el kit API-ZYM® (Biomérieux). El crecimiento de C101 se evaluó a diferentes temperaturas (4, 28, 36 y 40°C), salinidades (0, 1, y 6,5 % de NaCl), pH (2, 4, 6, 7 y 8), y sales biliares (0,5, 1, 3 y 5 %). La identidad se determinó a partir de la secuenciación parcial del gen 16S ARNr con los primers 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). Las lecturas se analizaron con el algoritmo BLASTn, y para la asignación de especie se tuvo en cuenta un mínimo de 98,65 % de similitud (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

El crecimiento se evaluó según Villamil y Esguerra (2017). En placas de 96 pocillos se mezclaron por triplicado 50 µl del cultivo fresco (10⁶ UFC mL⁻¹) y 50 µl del medio líquido, y se incubaron a 28 °C. El crecimiento fue monitoreado por 72 h y la densidad óptica (DO) (Absorbancia o Abs a 600 nm) fue leída en el espectrofotómetro Modulus Microplate Reader. También, se estimó la viabilidad y supervivencia en agua de mar re-suspendiendo 10⁶ UFC mL⁻¹, incubando por 24 h a 28 °C, y realizando un recuento en placa (UFC mL⁻¹).

MATERIALS AND METHODS

Obtaining bacterial strains and maintenance in culture media

C101 was isolated from the gills of healthy Cobia larvae (*Rachycentron canadum*). For the assays, C101 was grown on trypticase soy broth and agar (TSA and TSB, Becton Dickinson™) with 1 % NaCl and on a marine agar (Zobell™). *Vibrio alginolyticus* was obtained from a mortality episode of Horse mackerel (*Caranx hippos*) from a local aquarium and *V. harveyi* BB120 (Bassler *et al.*, 1997), both were grown on thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar (Becton Dickinson™), blood-lamb agar (Becton Dickinson™) and nutrient agar (Sigma-Aldrich). *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, and *Streptococcus agalactiae* were isolated from mortalities of Tilapia (*Oreochromis* spp.) and were obtained from the collection of microorganisms of the Veterinary Faculty of the National University of Colombia and cultured in TSA, TSB, and sheep-blood media. For long-term preservation, the bacteria were cultivated in TSB broth and stored at -80 °C with 20 % glycerol (Murillo and Villamil, 2011).

C101 Characterization

Morphology was described through light microscopy (Olympus CX22) and the Gram character through staining (Claus, 1992). Catalase and oxidase (tetramethyl-para-phenylenediamine) tests were performed and the enzyme profile was obtained with the API-ZYM® kit (Biomérieux). C101 growth was evaluated at different temperatures (4, 28, 36, and 40 °C), salinities (0, 1, and 6.5 % NaCl), pH (2, 4, 6, 7, and 8), and bile salts (0.5, 1, 3 and 5 %). Identity was determined from partial sequencing of the 16S rRNA gene with primers 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC^{-3'}) and 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC^{-3'}). The readings were analyzed with the BLASTn algorithm, and a minimum of 98.65 % similarity was taken into account for the species assignment (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

Growth was evaluated according to Villamil and Esguerra (2017). In 50-well plates. 50 µl of the fresh culture (10⁶ CFU mL⁻¹) and 50 µl of the liquid medium were mixed in triplicate and incubated at 28 °C. Growth was monitored for 72 h and the optical density (OD) (absorbance or Abs at 600 nm) was read on the Modulus Microplate Reader spectrophotometer. Also, the viability and survival in seawater were estimated by re-suspending 10⁶ CFU mL⁻¹, incubating for 24 h at 28 °C, and performing a plate count (CFU mL⁻¹).

Ensayo de actividad antimicrobiana

Los productos extracelulares (ECPs) de C101 fueron extraídos siguiendo la metodología descrita por Cabo *et al.* (1999) y Villamil *et al.* (2010) con ligeras modificaciones. Para ello, C101 se cultivó en caldo por 24 h, el cultivo se centrifugó en tres ciclos de 3000 rpm x 15 minutos, y el sobrenadante (que contenía los ECPs) fue recuperado y luego filtrado a 0,2 μm . Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se adicionaron por triplicado 50 μl del filtrado y 50 μl del cultivo fresco del patógeno (10^6 UFC mL^{-1}). La placa se incubó a 28 °C por 24 h y se realizó la lectura de la DO. Se incluyó como control 50 μl del medio de cultivo con los ECPs. El cambio en la DO de los cultivos de las cepas patógenas se expresó como porcentaje de inhibición del crecimiento.

Obtención y mantenimiento de camarones y rotíferos

Las poslarvas (PLs) de camarón blanco (*L. vannamei*) en estadio PL-21, y los rotíferos (*B. plicatilis* s.s.) fueron provistos por Ceniagua (Cartagena, Colombia), transportados hasta las instalaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Santa Marta, Colombia), y aclimatados en estanques con aeración continua. Las poslarvas se dispusieron en un acuario de vidrio con 32 L de agua de mar filtrada (35 de salinidad y 28 °C), a una densidad de 16 PLs L^{-1} , y se alimentaron con concentrado Nicovita molido (tamaño 500 μm y donado por Ceniagua) en tres raciones diarias (10 % del peso corporal) (Membreño *et al.*, 2014). Las condiciones se mantuvieron estables, con aeración continua, recambios de agua del 80 % día^{-1} y foto-período de 12 h luz y 12 h oscuridad. El cultivo masivo de rotíferos (*B. plicatilis* s.s.) se mantuvo en agua de mar filtrada y estéril (35 de salinidad y 28 °C), con condiciones estables de aeración, iluminación continua, y recambios de agua del 100 % día^{-1} , tamizándolos por 100 y 60 μm , y alimentándolos dos veces al día con *Nanochloropsis* sp. (10^6 microalgas mL^{-1}).

Evaluación de *B. firmus* C101 como probiótico para camarones y rotíferos

C101 se cultivó en caldo TSB por 24 h a 28 °C. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm por 15 min a 4 °C, el pellet fue lavado tres veces con solución salina estéril (0,9 % NaCl), y se resuspendió en 15 ml de Buffer Fosfatos (PBS 1 X) estéril. Se estimó la concentración inicial de la suspensión líquida por espectrofotometría (Abs a 600 nm), y se verificó por recuento directo en placa y se reportó como número de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (UFC mL^{-1}).

Antimicrobial activity assay

The C101 extracellular products (ECPs) were extracted following the methodology described by Cabo *et al.* (1999) and Villamil *et al.* (2010) with slight modifications. For this, C101 was cultivated in broth for 24 h, the culture was centrifuged in three cycles of 3000 rpm x 15 minutes, and the supernatant (containing the ECPs) was recovered and then filtered at 0.2 μm . Subsequently, in a 96-well plate, 50 μl of the filtrate and 50 μl of the fresh pathogen culture (10^6 CFU mL^{-1}) were added in triplicate. The plate was incubated at 28 °C for 24 h and the OD reading was performed. 50 μl of the culture medium was included as control with the ECPs. The change in the OD of the cultures of the pathogenic strains was expressed as a percentage of growth inhibition.

Obtaining and maintaining shrimp and rotifers

The postlarvae (PLs) of white shrimp (*L. vannamei*) in stage PL-21, and the rotifers (*B. plicatilis* s.s.) were provided by CENIACUA (Cartagena, Colombia), transported to the facilities of the Jorge Tadeo Lozano University (Santa Marta, Colombia), and acclimatized in ponds with continuous aeration. The postlarvae were placed in a glass aquarium with 32 L of filtered seawater (35 salinity and 28 °C), at a density of 16 PLs L^{-1} , and were fed with ground Nicovita concentrate (size 500 μm and donated by CENIACUA) in three daily rations (10 % of body weight) (Membreño *et al.*, 2014). The conditions were stable, with continuous aeration, 80 % water changes day^{-1} , and photo-period of 12 h light and 12 h darkness. The massive culture of rotifers (*B. plicatilis* s.s.) was kept in filtered and sterile seawater (35 salinity and 28 °C), with stable conditions of aeration, continuous lighting, and 100 % water changes day^{-1} , sieving them per 100 and 60 μm , and feeding them twice a day with *Nanochloropsis* sp. (10^6 microalgae mL^{-1}).

Evaluation of *B. firmus* C101 as a probiotic for shrimp and rotifers

C101 was grown in TSB broth for 24 hr at 28 °C. The culture was centrifuged at 6000 rpm for 15 min at 4 °C, the pellet was washed three times with sterile saline solution (0.9 % NaCl), and resuspended in 15 ml of sterile Phosphate Buffer (1X PBS). The initial concentration of the liquid suspension was estimated by spectrophotometry (Abs at 600 nm), and verified by direct plate count and reported as the number of colony-forming units per unit volume (CFU mL^{-1}).

Evaluación para poslarvas de camarón

Se dispusieron tres contenedores plásticos para el tratamiento con C101 y tres para el control (PBS estéril). En cada contenedor con 2 L de agua de mar ultra-filtrada se sembraron 30 PLs de camarón (para un total de 180 PLs). Todas las condiciones de cultivo y de alimentación se mantuvieron estables realizando recambios de agua del 100 % día⁻¹. La suspensión líquida de C101 fue adicionada diariamente en el agua de los contenedores (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011) a una dosis final de 10⁶ UFC mL⁻¹ * día (Zhou *et al.*, 2009). Como control se adicionó PBS, sin presencia de C101. El experimento tuvo una duración de tres semanas.

Al inicio del experimento se tomaron datos del peso seco (muestras incubadas a 65 °C por 48 h) y la longitud en fresco de las PLs de camarón (n = 10). Al terminar el experimento se tomaron estos mismos datos tanto de los controles (n = 30, es decir, 10 de cada réplica) como de las poslarvas tratadas con C101 (n = 30). La longitud en fresco se determinó por estereoscopia, mientras que el peso seco se midió en una balanza digital (Sartorius, Cubis®). Adicionalmente, al final del experimento también se determinó el número de PLs vivas antes de tomar las muestras para los análisis. Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes índices: Ganancia en peso (GP) (%) = (Wf - Wi)/Wi * 100, Ganancia en talla (GT) (%) = (Lf - Li)/Li * 100, Tasa Específica de Crecimiento (TEC) (% día⁻¹) = (LnWf - LnWi)/t * 100, Promedio de Incremento de Peso por Día (ADG) (mg día⁻¹) = (Wf - Wi)/t, y la Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) = R/(Wf - Wi); en donde *W* es peso promedio, *L* es la longitud promedio, *t* es el tiempo de duración (en días) del experimento, y *R* es la ración diaria del alimento concentrado (Abd El-Rhman *et al.*, 2009; Nimrat *et al.*, 2013). La tasa de supervivencia de los organismos se calculó así: Supervivencia (%) = (nf/ni) * 100, en donde *ni* es el número total de individuos en cada contenedor al inicio del experimento y *nf* al final (Nimrat *et al.*, 2012).

Evaluación para rotíferos

Los rotíferos fueron dispuestos en erlenmeyers con 80 ml de agua de mar ultra-filtrada y estéril, a una densidad inicial de 65 ± 4,2 rotíferos mL⁻¹. La adición de *B. firmus* C101 se llevó a cabo por dos días (una adición diaria, es decir, cada 24 h), a una concentración final de 10⁶ UFC mL⁻¹ * día. Tanto el tratamiento con C101, como el control (medio de cultivo estéril) se realizaron por triplicado. También, todas las condiciones de cultivo y de alimentación fueron constantes con recambios de agua del 100 % día⁻¹.

Evaluation for shrimp postlarvae

Three plastic containers were placed for the treatment with C101 and three for the control (sterile PBS). In each container with 2 L of ultra-filtered seawater, 30 PLs of shrimp were sown (for a total of 180 PLs). All the culture and feeding conditions were kept stable, making 100 % water changes day⁻¹. The C101 liquid suspension was added daily in the container water (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011) at a final dose of 10⁶ CFU mL⁻¹ * day (Zhou *et al.*, 2009). PBS was added as a control, without the presence of C101. The experiment lasted three weeks.

At the beginning of the experiment, data on dry weight (samples incubated at 65 °C for 48 h) and fresh length of shrimp PLs (n = 10) were taken. At the end of the experiment, these same data were taken from both the controls (n = 30, that is, 10 from each replica) and the postlarvae treated with C101 (n = 30). The fresh length was determined by stereoscopy, while dry weight was measured on a digital scale (Sartorius, Cubis®). Additionally, at the end of the experiment, the number of live PLs was also determined before taking samples for analysis. The following indices were calculated with the obtained data: Weight gain (GP) (%) = (Wf - Wi)/Wi * 100, Height gain (GT) (%) = (Lf - Li)/Li * 100, Specific Growth Rate (TEC) (% day⁻¹) = (LnWf - LnWi)/t * 100, Average Weight Increase per Day (ADG) (mg day⁻¹) = (Wf - Wi)/t, and the Food Conversion Rate (TCA) = R/(Wf - Wi); where *W* is average weight, *L* is the average length, *t* is the duration time (in days) of the experiment, and *R* is the daily ration of the concentrated food (Abd El-Rhman *et al.*, 2009; Nimrat *et al.*, 2013). The survival rate of the organisms was calculated as follows: Survival (%) = (nf/ni) * 100, where *ni* is the total number of individuals in each container at the beginning of the experiment and *nf* at the end (Nimrat *et al.*, 2012).

Evaluation for rotifers

The rotifers were placed in Erlenmeyer with 80 ml of ultra-filtered and sterile seawater, at an initial density of 65 ± 4.2 mL⁻¹ rotifers. The addition of *B. firmus* C101 was carried out for two days (one added daily, that is, every 24 h), to a final concentration of 10⁶ CFU mL⁻¹ * day. Both the C101 treatment and the control (sterile culture medium) were performed in triplicate. Also, all the culture and feeding conditions were constant with 100 % day⁻¹ water replacements.

El efecto de la administración de C101 en los rotíferos se determinó mediante el crecimiento poblacional, medido por el cambio en la densidad de individuos, hembras, machos y huevos. Para ello, se tomó como unidad de muestreo 1,0 ml de cada cultivo y se realizó un conteo por microscopía óptica mediante el método de Edmonson (conteo/volumen) en placa de Sedgewick Rafterm (Biologik®), y se tomaron tres alícuotas por tratamiento para tener en cuenta la variabilidad de las alícuotas. Todas las mediciones se efectuaron por triplicado, y con ello se calcularon los siguientes índices: Tasa de crecimiento poblacional (TC) (% día⁻¹) = $(\ln N_t - \ln N_0 / t * 100)$, Fecundidad (F) (huevos indiv.⁻¹) = (# Huevos/# Hembras) y Productividad (R) (indiv. mL⁻¹ * día) = $(N_t - N_0 / t * 100)$; en donde N_t es la densidad de rotíferos en el tiempo t , N_0 es la densidad inicial y t es el tiempo de suministro en el cultivo (Cisneros, 2011, 2012).

Evaluación del número de bacterias totales cultivables asociadas a camarones y rotíferos

Tras la adición de C101, se realizó un recuento de bacterias totales heterótrofas (BT) a partir de los tejidos de las poslarvas de camarón y de los rotíferos. Para ello, se tomó un individuo (1,0 ml en el caso de los rotíferos) de cada réplica tanto del tratamiento como del control. Las muestras fueron lavadas con abundante agua de mar estéril, y fueron maceradas bajo condiciones de esterilidad. Este macerado fue resuspendido en 0,5 ml de PBS 1X y luego diluido en serie hasta 10⁻⁶ según Villamil *et al.* (2010) y Murillo y Villamil (2011). Después, 0,1 ml de las diluciones 10⁻³ a 10⁻⁶ fueron sembrados por triplicado en agar Marino (Zobell™). Las placas se incubaron a 28 °C por 24 h, y al final se determinó el número de unidades formadoras de colonias por miligramo de tejido (UFC mg⁻¹) y por rotífero (UFC rotífero⁻¹). Todos los recuentos se llevaron a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedios ± error estándar (ES). Se probaron los supuestos de normalidad con el test de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) con una prueba de Levene's. Se realizaron análisis de varianza a una vía (ANOVA) para probar las diferencias estadísticas ($p < 0,05$). Además, se usó un test de múltiples rangos de Duncan para comparar las medias cuando las diferencias eran detectadas con el ANOVA. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en SPSS 15,0 y Statgraphics Centurión XV para Windows (California, USA).

The effect of C101 administration on rotifers was determined by population growth, as measured by the change in the density of individuals, females, males, and eggs. For this, 1.0 ml of each culture was taken as a sampling unit and a count was made by light microscopy using the Edmonson method (count/volume) on a Sedgewick Rafter plate (Biologik®). Also three aliquots were taken per treatment to take into account the variability of the aliquots. All measurements were made in triplicate, and the following indices were calculated: Population growth rate (TC) (% day⁻¹) = $(\ln N_t - \ln N_0 / t * 100)$, Fertility (F) (individual eggs.⁻¹) = (# Eggs/# Females) and Productivity (R) (indiv. mL⁻¹ * day) = $(N_t - N_0 / t * 100)$; where N_t is the density of rotifers at time t , N_0 is the initial density and t is the supply time in the crop (Cisneros, 2011, 2012).

Evaluation of the number of total cultivable bacteria associated with shrimp and rotifers

After the addition of C101, a count of total heterotrophic bacteria (BT) was performed from the tissues of the post-larvae of shrimp and rotifers. For this, an individual (1.0 ml in the case of rotifers) was taken from each replicate of both the treatment and the control. The samples were washed with abundant sterile seawater and were macerated under sterile conditions. This macerate was resuspended in 0.5 ml of 1X PBS and then serially diluted to 10⁻⁶ according to Villamil *et al.* (2010) and Murillo and Villamil (2011). Then 0.1 ml of dilutions 10⁻³ to 10⁻⁶ were plated in triplicate on marine agar (Zobell™). The plates were incubated at 28 °C for 24 h, and at the end, the number of colonies forming units per milligram of tissue (CFU mg⁻¹) and rotifer (CFU rotifer⁻¹) was determined. All counts were carried out in triplicate.

Statistic analysis

Data were expressed as average ± standard error (ES). Assumptions of normality were tested with the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances (homoscedasticity) with Levene's test. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test statistical differences ($p < 0.05$). Also, a Duncan multi-range test was used to compare the means when the differences were detected with the ANOVA. All statistical analyzes were carried out in SPSS 15.0 and Statgraphics Centurion XV for Windows (California, USA).

RESULTADOS

Caracterización de C101

La caracterización morfológica y fisiológica de C101 se describe en la Tabla 1. Este aislado fue identificado como *Bacillus firmus* (98,8 % de identidad), mostró crecimiento a diferentes temperaturas (entre 4 y 40°C), concentraciones de sal (entre 0 y 6,5 % de NaCl), y concentraciones de sales biliares (entre 0,5 y 5 %), pero no se evidenció crecimiento a pH extremos (< 6 y > 8), ni por debajo de 4°C. El crecimiento ideal de C101 se observó a 28°C, 1 % de NaCl y pH 7,4, condiciones que fueron utilizadas en todos los ensayos posteriores para su cultivo. En cuanto al crecimiento, se observó que continúa creciendo después de las 24 h y hasta las 72 h de incubación a una tasa de $0,0191 \pm 0,003$ abs h⁻¹, y además, es capaz sobrevivir en agua de mar (28°C y 35 de salinidad) con recuentos de $4,2 \pm 1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ de agua tras 24 h de incubación.

Tabla 1. Características morfológicas y fisiológicas (crecimiento) de *Bacillus firmus* C101.

Característica/Characteristic	Observación*/Observation*	Característica/Characteristic	Observación*/Observation*
Morfología/Gram Morphology/Gram	Bacilos largos/positivo Long/positive bacilli	Temperatura/temperature 4-40 °C	+
Salinidad/salinity < 6.5 % NaCl	+	pH < 6	-
Salinidad/salinity ≥ 6.5 % NaCl	+	6 ≤ pH ≤ 8	+
Temperatura/temperature ≤ 4°C	-	Sales biliares/Bile Salts 0.5 – 5 %	+

* Hubo crecimiento: +. No hubo crecimiento: -

RESULTS

C101 characterization

The morphological and physiological characterization of C101 is described in Table 1. This isolate was identified as *Bacillus firmus* (98.8 % identity), and showed growth at different temperatures (between 4 and 40 °C), salt concentrations (between 0 and 6.5 % NaCl), and concentrations of bile salts (between 0.5 and 5 %), but no growth was observed at extreme pH (< 6 and > 8), or below 4 °C. The ideal growth of C101 was observed at 28 °C, 1 % NaCl and pH 7.4, conditions that were used in all subsequent tests for its cultivation. Regarding growth, it was observed that it continues to grow after 24 h and up to 72 h of incubation at a rate of 0.0191 ± 0.003 abs h⁻¹, and also, it can survive in seawater (28 °C and 35 of salinity) with counts of $4.2 \pm 1.4 \times 10^6$ CFU mL⁻¹ of water after 24 h incubation.

Table 1. Morphological and physiological characteristics (growth) of *Bacillus firmus* C101.

Actividad enzimática y antimicrobiana de C101

La actividad enzimática de *B. firmus* C101 se muestra en la Tabla 2. En resumen, *B. firmus* C101 es catalasa positiva, oxidasa negativa, presentó intensa actividad fosfatasa ácida y alcalina, moderada actividad lipasa/esterasa (C4 – C8) y tripsina/ α -quimotripsina y no muestra actividad en la hidrólisis de disacáridos. Adicionalmente, los ECPs de *B. firmus* C101 mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de diferentes patógenos, resultando ser más activos contra *V. alginolyticus* (49,7 %), *A. hydrophila* (47,9 %) y *S. agalactie* (46,8 %) y en menor medida frente a *E. tarda* (39,6 %) y *V. harveyi* BB120 (12,3 % de inhibición).

Enzymatic and antimicrobial activity of C101

The enzymatic activity of *B. firmus* C101 is shown in Table 2. In summary, *B. firmus* C101 is catalase positive, oxidase negative, showed intense acid and alkaline phosphatase activity, moderate lipase/esterase (C4 – C8) and trypsin/ α -chymotrypsin, and shows no activity in the hydrolysis of disaccharides. Additionally, the ECPs of *B. firmus* C101 showed growth inhibitory activity of different pathogens, turning out to be more active against *V. alginolyticus* (49.7 %), *A. hydrophila* (47.9 %) and *S. agalactie* (46.8 %) and to a lesser extent vs. *E. tarda* (39.6 %) and *V. harveyi* BB120 (12.3 % inhibition).

Tabla 2. Actividad enzimática de *Bacillus firmus* C101.

Enzima/Enzyme	Actividad*/Activity*
Catalasa/Catalase	+
Oxidasa (Citb)/Oxidase (Citb)	-
2-fosfatasa alcalina/2-alkaline phosphatase	+++
Esterasa (C4)/Esterase (C4)	+
Esterasa/Lipasa (C8)/Esterase/Lipase (C8)	+
Lipasa (C14)/Lipase (C14)	W
L-leucina 2-arilamidasa/L-leucina 2-arylamidase	+
L-cistina 2-arilamidasa/L-cystine 2-arylamidase	W

* No hubo actividad: -. Actividad débil: W. Actividad moderada: +. Actividad intensa: ++. Actividad muy intensa: +++.

Table 2. *Bacillus firmus* C101 enzymatic activity.

Enzima/Enzyme	Actividad*/Activity*
L-valina 2-arilamidasa/L-valine 2-arylamidase	-
Tripsina/Trypsin	W
α -quimotripsina/ α -chymotrypsin	+
2-fosfatasa ácida/2-acid phosphatase	+++
α -galactosidasa (Melibiasa)/ α -galactosidase (Melibiase)	-
β -galactosidasa (Lactasa)/ β -galactosidase (Lactase)	-
α -glucosidasa (Maltasa)/ α -glucosidase (Maltase)	-
N-acetil- β -glucosaminidasa/N-acetyl- β -glucosaminidase	W

* There was no activity: -. Weak activity: W. Moderate activity: +. Intense activity: ++. Very intense activity: +++.

Evaluación de *B. Firmus* C101 como probiótico para camarones y rotíferos

Evaluación para poslarvas de camarón

La longitud y peso promedio iniciales de las poslarvas (PL-21) de camarón blanco (*L. vannamei*) fueron de $70,2 \pm 2,1$ mm y $12,3 \pm 0,02$ mg respectivamente. Luego de la administración de *B. firmus* C101 (Figura 1), se evidenció un aumento significativo ($p < 0,05$) para todos los indicadores de crecimiento en relación con el tratamiento control (Tabla 3).

Evaluation of *B. firmus* C101 as a probiotic for shrimp and rotifers

Evaluation for shrimp postlarvae

The initial length and average weight of the postlarvae (PL-21) of white shrimp (*L. vannamei*) were 70.2 ± 2.1 mm and 12.3 ± 0.02 mg respectively. After the administration of *B. firmus* C101 (Figure 1), a significant increase ($p < 0.05$) was evident for all growth indicators concerning the control treatment (Table 3).

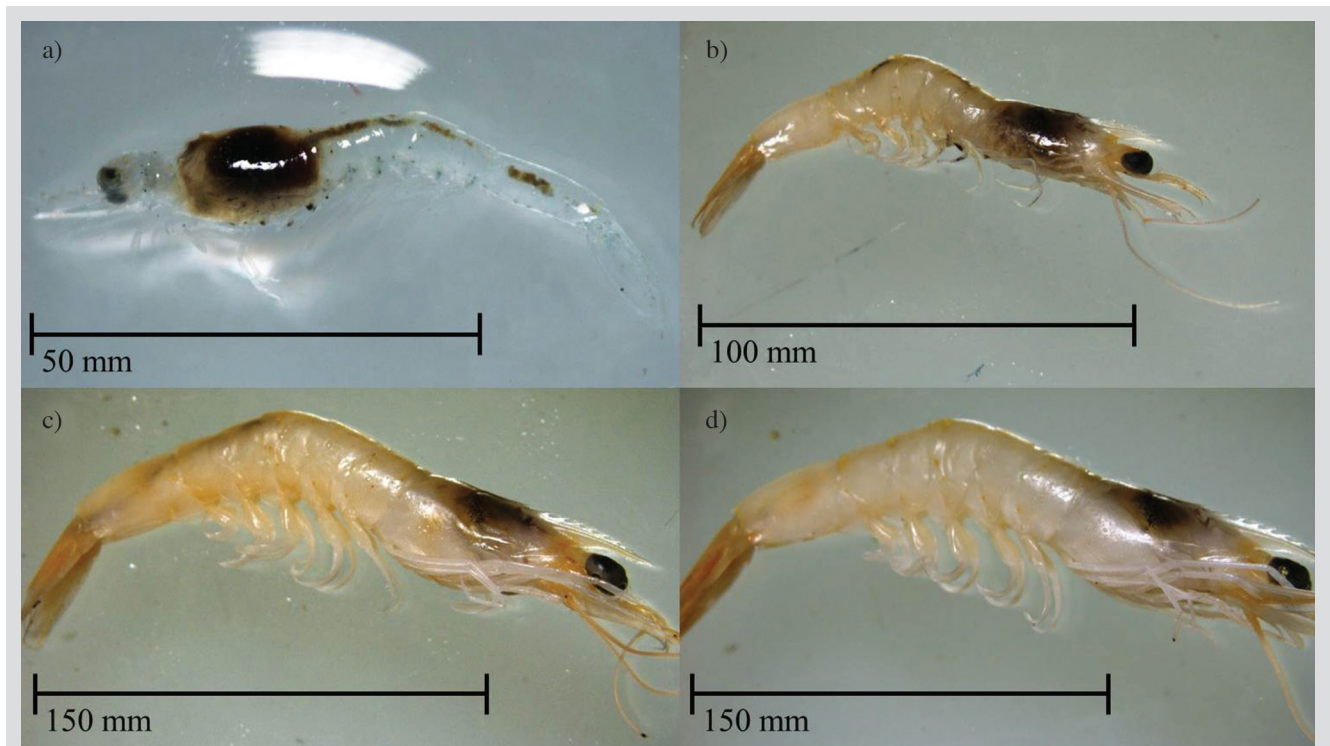


Figura 1. Poslarvas (PLs) de camarón *Litopenaeus vannamei* administradas con *Bacillus firmus* C101. a) PLs antes de la adición, b) PLs del control (sin adición), c) y d). PLs administradas con *B. firmus* C101 (Réplica 1 y 2).

Figure 1. Postlarvae (PLs) of shrimp *Litopenaeus vannamei* administered with *Bacillus firmus* C101. a) PLs before addition, b) PLs from control (no addition), c) y d). PLs administered with *B. firmus* C101 (Replica 1 and 2).

**Tabla 3.** Indicadores de crecimiento y supervivencia de las postlarvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) administrados con *Bacillus firmus* C101.

Tratamiento/ Treatment	Long. final (mm)	GT (%)	TEC (% día ⁻¹)	Peso final/Final weight (mg)	GP (%)	ADG (mg día ⁻¹)	TCA (%)	S (%)
Control	103.4 ± 5.7	48.3 ± 8.8	1.9 ± 0.3	18.9 ± 1.0	53.6 ± 7.9	0.3 ± 0.1	7.2 ± 1.0	91.1 ± 2.9
<i>B. firmus</i> C101	160.4 ± 12.3 ^a	130.7 ± 33.5 ^a	3.8 ± 0.7 ^a	42.1 ± 2.6 ^a	242.2 ± 21.2 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	92.2 ± 2.9 ^b

Los datos se expresaron como promedio ± ES. a) Hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en los promedios del tratamiento con C101 con respecto al control. b) No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control. Long.: longitud, GT: ganancia en talla, TEC: tasa específica de crecimiento, GP: ganancia en peso, ADG: promedio de incremento en peso diario, TCA: tasa de conversión alimenticia, S: supervivencia.

Table 3. Growth and survival indicators of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae administered with *Bacillus firmus* C101.

Data were expressed as average ± ES. a) There were significant differences ($p < 0.05$) in the averages of the treatment with C101 for the control. b) There were no significant differences ($p > 0.05$) for the control. Length: length, GT: height gain, TEC: specific growth rate, GP: weight gain, ADG: average daily weight increase, TCA: feed conversion rate, S: survival.

En general, se observó un incremento en la longitud y peso de las postlarvas con el tratamiento de *B. firmus* C101, respecto a las del control. Hubo un efecto marcado sobre la tasa específica del crecimiento (TEC = 3.8 ± 0.7 % día⁻¹), el incremento en peso diario (ADG = 1.5 ± 0.1 mg día⁻¹) y la tasa de conversión alimenticia (TCA = 1.5 ± 0.1 %), que fue significativamente menor ($p = 0.0011$) en relación con el control. Además, no se observaron efectos negativos en la tasa de supervivencia ($S > 90$ %) de las postlarvas tras la adición de *B. firmus* C101, ni diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$; $p = 0.3793$).

Evaluación para rotíferos

Las densidades iniciales en los cultivos fueron de 65.0 ± 4.2 indiv. mL⁻¹, 44.7 ± 3.8 hembras mL⁻¹, 20.3 ± 2.3 machos mL⁻¹ y 25.0 ± 3.2 huevos mL⁻¹, y los indicadores del crecimiento poblacional se describen en la Tabla 4. Se observó que para el número de individuos totales y de hembras no hubo diferencias ($p > 0.05$) entre el tiempo inicial y el tiempo final en el control. No obstante, en el tratamiento con *B. firmus* C101 sí se encontraron diferencias ($p < 0.05$). También se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) del número de huevos en el control en el tiempo final. El número de machos se redujo significativamente al final del experimento en el control y tratamiento. Por otro lado, se observó un incremento significativo en el número de individuos ($p = 0.0101$), hembras ($p = 0.0009$) y huevos ($p = 0.00001$) tras la administración de *B. firmus* C101 con relación al control. Así, se observó que el efecto de *B. firmus* C101 fue más evidente para el número total de rotíferos (97.0 ± 3.4 indiv. mL⁻¹) y para el de hembras (87.7 ± 1.9 hembras mL⁻¹) y en relación con el control. Los índices de crecimiento poblacional (TC), fecundidad (F) y productividad (R) también fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) tras la administración de *B. firmus* C101, y en comparación con lo obtenido para el control.

In general, an increase was observed in the length and weight of the postlarvae with the *B. firmus* C101 treatment, compared to those of the control. There was a marked effect on the specific growth rate (TEC = 3.8 ± 0.7 % day⁻¹), the increase in daily weight (ADG = 1.5 ± 0.1 mg day⁻¹) and the feed conversion rate (TCA = 1.5 ± 0.1 %), which was significantly lower ($p = 0.0011$) in relation to the control. Furthermore, no negative effects were observed in the survival rate ($S > 90$ %) of the postlarvae after the addition of *B. firmus* C101, nor significant differences concerning the control ($p > 0.05$; $p = 0.3793$).

Evaluation for rotifers

The initial densities in the cultures were 65.0 ± 4.2 indiv. mL⁻¹, 44.7 ± 3.8 females mL⁻¹, 20.3 ± 2.3 males mL⁻¹, and 25.0 ± 3.2 eggs mL⁻¹, and the indicators of population growth are described in Table 4. It was observed that for the number of total individuals and of females there were no differences ($p > 0.05$) between the initial time and the final time in the control. However, in the treatment with *B. firmus* C101, differences were found ($p < 0.05$). A significant decrease ($p < 0.05$) in the number of eggs in the control was also observed in the final time. The number of males was significantly reduced at the end of the experiment in control and treatment. On the other hand, a significant increase was observed in the number of individuals ($p = 0.0101$), females ($p = 0.0009$), and eggs ($p = 0.00001$) after the administration of *B. firmus* C101 concerning the control. Thus, it was observed that the effect of *B. firmus* C101 was more evident for the total number of rotifers (97.0 ± 3.4 indiv. mL⁻¹) and for that of females (87.7 ± 1.9 females mL⁻¹) and concerning the control. Population growth rates (TC), fertility (F), and productivity (R) were also significantly higher ($p < 0.05$) after the administration of *B. firmus* C101, and compared to that obtained for the control.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento poblacional de los cultivos de rotíferos (*Brachionus plicatilis* s.s.), administrados sin probiótico (control) y con *Bacillus firmus* C101, cultivados por 48 h.

Tratamiento/ Treatment	Indiv. mL ⁻¹ final	♀ mL ⁻¹ final	♂ mL ⁻¹ final	Huevos/Eggs mL ⁻¹ final	TC (% día ⁻¹ /day ⁻¹)	F (huevos/eggs indiv. ⁻¹)	R (indiv. mL ⁻¹ * día/day)
Control	50.8 ± 3.1 ^b	48.8 ± 2.9 ^b	2.0 ± 0.2 ^a	4.3 ± 0.6 ^a	0.0 ± 0.0	0.09 ± 0.01	0.0 ± 0.0
<i>B. firmus</i> C101	97.0 ± 3.4 ^{a,c}	87.7 ± 1.9 ^{a,c}	9.3 ± 1.6 ^{a,d}	31.2 ± 1.9 ^{b,c}	20.2 ± 1.5 ^c	0.4 ± 0.03 ^c	16.0 ± 0.7 ^c

Los datos se expresaron como promedio ± ES. a) Hubo diferencias significativas entre el tiempo inicial y el final (p < 0.05). b) No hubo diferencias significativas entre el tiempo inicial y el final (p > 0.05). c) Hubo diferencias significativas en los promedios de los parámetros/índices con relación al control (p < 0.05). d) No hubo diferencias significativas en el promedio del parámetros con relación al control ♀: hembras, ♂: machos, TC: tasa de crecimiento poblacional, F: fecundidad (egg-ratio) y R: productividad.

Table 4. Population growth parameters of cultures of rotifers (*Brachionus plicatilis* s.s.), administered without probiotic (control) and with *Bacillus firmus* C101, cultivated for 48 h.

Data were expressed as average ± ES. a) There were significant differences between the initial and final time (p < 0.05). b) There were no significant differences between the initial and final time (p > 0.05). c) There were significant differences in the means of the parameters/indices concerning the control (p < 0.05). d) There were no significant differences in the mean of the parameters concerning the control ♀: females, ♂: males, TC: population growth rate, F: fertility (egg-ratio), and R: productivity.

Evaluación del número de bacterias totales cultivables asociadas a camarones y rotíferos

Los valores de los recuentos de bacterias totales (BT) cultivables a partir de los tejidos de las poslarvas de camarón blanco y rotíferos se muestran en la Figura 2. En ambos casos, se observó un aumento significativo (p < 0,05) en el recuento en placa de BT tras la administración de *B. firmus* C101, en relación a los obtenidos para el tratamiento control. En cuanto a las poslarvas de camarón, se obtuvieron recuentos en promedio de 4,9 ± 0,4 x 10⁷ UFC mg⁻¹ de tejido con la adición de *B. firmus* C101. Para los rotíferos, el recuento promedio fue de 2,9 ± 0,3 x 10⁵ UCF rotífero⁻¹ tras el tratamiento con *B. firmus* C101.

Evaluation of the number of total cultivable bacteria associated with shrimp and rotifers

The values of total cultivable bacteria (BT) counts from the tissues of post-larvae of white shrimp and rotifers are shown in Figure 2. In both cases, a significant increase (p < 0.05) was observed in the count in BT plate after administration of *B. firmus* C101, concerning those obtained for the control treatment. Regarding shrimp postlarvae, average counts of 4.9 ± 0.4 x 10⁷ CFU mg⁻¹ tissue were obtained with the addition of *B. firmus* C101. For rotifers, the average count was 2.9 ± 0.3 x 10⁵ UCF rotifer⁻¹ after treatment with *B. firmus* C101.

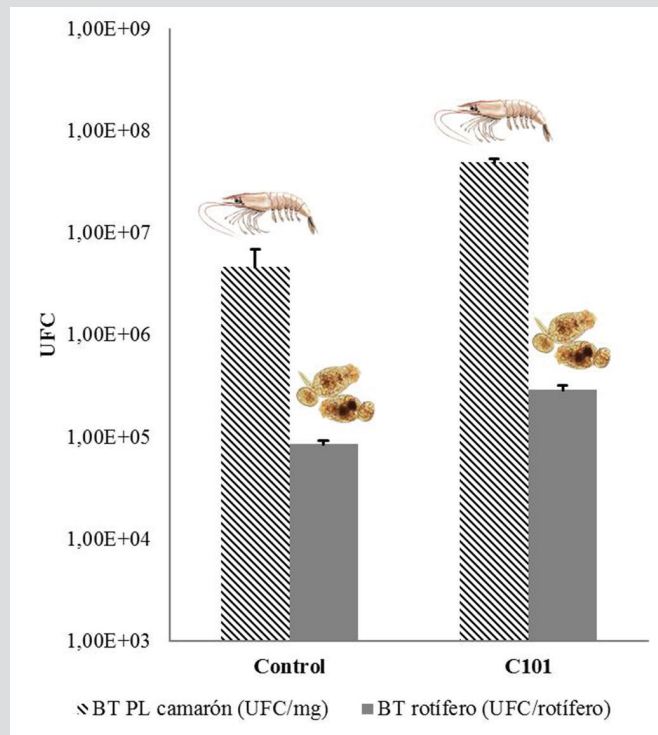


Figura 2. Recuento de bacterias totales (BT) en los tejidos de las PLs de camarón y de los rotíferos. Se muestra el promedio + ES.

Figure 2. Total bacterial count (BT) in the tissues of shrimp and rotifers PLs. Average + ES is displayed.

DISCUSIÓN

Evaluación de *B. firmus* C101 como probiótico para poslarvas de camarón

Las bacterias del género *Bacillus* han tenido éxito como aditivos en la dieta de organismos acuáticos de cultivo (Kumar *et al.*, 2016; Ringø y Song, 2016), mejorando la calidad del agua (Zokaeifar *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016) y evidenciando un potencial efecto sobre el crecimiento y supervivencia en estadios larvarios de diferentes especies marinas de interés comercial (Vieira *et al.*, 2016; Zorriehzaha *et al.*, 2016). En el cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se ha demostrado el efecto positivo de distintas especies de este género (*i.e.* *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. coagulans* y *B. licheniformis*) cuando se han administrado a diferentes dosis, y en alimentos liofilizados (10^8 UFC g⁻¹) (Wang, 2007), micro-encapsulados (10^9 UFC g⁻¹) (Nimrat *et al.*, 2012), pellets (10^{10} UFC g⁻¹) (Zokaeifar *et al.*, 2012; Sadat Hoseini Madani *et al.*, 2018), suspensiones líquidas (10^6 UFC mL⁻¹ directamente en el agua) (Wang *et al.*, 2016), bio-flóculos (10^9 UFC mL⁻¹) (Ferreira *et al.*, 2015; Pacheco-Vega *et al.*, 2018) y en mezcla con otras bacterias (10^7 y 10^9 UFC g⁻¹) (Bernal *et al.*, 2017; Bachruddin *et al.*, 2018).

Además, previamente se ha demostrado el efecto de cepas de *B. firmus* sobre el crecimiento y resistencia en camarón tigre (*Penaeus monodon*) (Raghu *et al.*, 2016; Kolanchina *et al.*, 2017) y en *L. vannamei* (Yuniarti *et al.*, 2013; Barman *et al.*, 2017). En este estudio se reporta que a una dosis de 10^6 UFC mL⁻¹ de *B. firmus* C101, administrado directamente en el agua y sin mezclar con otras cepas, se obtiene un incremento significativo en el crecimiento y rendimiento de las PLs de camarón blanco (*L. vannamei*).

En comparación con otros estudios llevados a cabo en diferentes estadios de *L. vannamei* (de nauplio a juveniles), la adición de cepas de *Bacillus* sp. tiene un efecto marcado en la tasa de conversión alimenticia (TCA %), evidenciando valores por debajo de 1,8 % e incluso algunos iguales o menores a 1,5 % (Tabla 4). Estos bajos valores indican un crecimiento rápido y buen aprovechamiento del alimento (Membreño *et al.*, 2014), lo cual a su vez corresponde a la ganancia de talla y peso obtenidos en este estudio. No obstante, para las comparaciones directas sobre el efecto de los probióticos, se debe tener en cuenta la forma de adición (individual o en mezcla), la dosis, la vía y la duración de la administración. Así, con la adición de *B. firmus* C101 directamente en el agua de cultivo de las poslarvas de camarón, y con una

DISCUSSION

Evaluation of *B. firmus* C101 as a probiotic for shrimp postlarvae

Bacillus genus bacteria have been successful as additives in the diet of cultured aquatic organisms (Kumar *et al.*, 2016; Ringø and Song, 2016), improving water quality (Zokaeifar *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016) and evidencing a potential effect on the growth and survival in larval stages of different marine species of commercial interest (Vieira *et al.*, 2016; Zorriehzaha *et al.*, 2016). In white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture, the positive effect of different species of this genus (*ie* *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. coagulans* and *B. licheniformis*) has been demonstrated when administered at different doses, and in freeze-dried food (10^8 CFU g⁻¹) (Wang, 2007), micro-encapsulated (10^9 CFU g⁻¹) (Nimrat *et al.*, 2012), pellets (10^{10} CFU g⁻¹) (Zokaeifar *et al.*, 2012; Sadat Hoseini Madani *et al.*, 2018), liquid suspensions (10^6 CFU mL⁻¹ directly in water) (Wang *et al.*, 2016), bio-flocs (10^9 CFU mL⁻¹) (Ferreira *et al.*, 2015; Pacheco-Vega *et al.*, 2018) and in mixture with other bacteria (10^7 and 10^9 CFU g⁻¹) (Bernal *et al.*, 2017; Bachruddin *et al.*, 2018).

Furthermore, the effect of *B. firmus* strains on growth and resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (Raghu *et al.*, 2016; Kolanchina *et al.*, 2017) and in *L. vannamei* (Yuniarti *et al.*, 2013; Barman *et al.*, 2017) has been previously demonstrated. In this study, it is reported that at a dose of 10^6 CFU mL⁻¹ of *B. firmus* C101, administered directly in the water and without mixing with other strains, a significant increase in the growth and yield of the PLs of white shrimp is obtained (*L. vannamei*).

Compared to other studies carried out in different stages of *L. vannamei* (from nauplius to juveniles), the addition of *Bacillus* sp. strains has a marked effect on the feed conversion rate (TCA %), showing values below 1.8 % and even some equal to or less than 1.5 % (Table 4). These low values indicate rapid growth and good use of food (Membreño *et al.*, 2014), which in turn corresponds to the height and weight gain obtained in this study. However, for direct comparisons of the effect of probiotics, the form of addition (individual or in a mixture), dose, route, and duration of administration should be considered. Thus, with the addition of *B. firmus* C101 directly in the culture water of the shrimp postlarvae, and with a duration of three weeks, the effect on specific growth rates, daily weight increase, and feed conversion is highly promising if it is

duración de tres semanas, el efecto sobre las tasas específicas de crecimiento, incremento de peso diario y conversión alimenticia, es altamente promisorio si se compara con lo obtenido en otros estudios según el tipo de probiótico (simple o en mezcla), la dosis, la vía de administración y la duración de la misma (Tabla 5).

compared with that obtained in other studies according to the type of probiotic (simple or mixed), the dose, the route of administration, and its duration (Table 5).

Tabla 5. Algunos estudios del efecto de la administración de bacterias del género *Bacillus* sp. en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de diferentes estadios

Table 5. Some studies of the effect of the administration of bacteria of the genus *Bacillus* sp. in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of different stages

Referencia/ Reference	Probiótico dosis/Probiotic dose	Vía de administración/duración Administration route/duration	Estadio/Stage	TEC (% día ⁻¹ / % day ⁻¹)	ADG (mg día ⁻¹ / mg day ⁻¹)	TCA (%)
Wang (2007)	Mix <i>Bacillus coagulans</i> + <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (10 ⁸ y 10 ⁹ UFC g ⁻¹)	Liofilizado/cuatro semanas Lyophilized/four weeks	No especifica/ Does not specify	1.6 ± 0.1	0.04 ± 0.0	–
Zokaifar <i>et al.</i> (2012)	<i>B. subtilis</i> (10 ⁵ y 10 ⁸ UFC g ⁻¹)	Liofilizado/ocho semanas Lyophilized/eight weeks	Juvenil/ Juvenile	2.3 ± 0.1	–	1.7 ± 0.0
Nimrat <i>et al.</i> (2012)	Mix <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>B. polymyxa</i> (10 ⁹ UFC mL ⁻¹)	Microencapsulados/tres semanas Microencapsulated/three weeks	Nauplio/ Nafplio	19.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	–
Zokaifar <i>et al.</i> (2014)	<i>B. subtilis</i> (10 ⁸ UFC g ⁻¹)	Líquida directamente en el agua/ocho semanas Liquid directly in water/eight weeks	Juvenil/ Juvenile	3.2 ± 0.0	–	1.7 ± 0.0
Barman <i>et al.</i> (2017)	Mix <i>B. subtilis</i> y <i>B. firmus</i> + <i>Rhodospseudomonas</i> <i>palustris</i> (10 ⁹ UFC mL ⁻¹)	Líquida directamente en el agua/cinco semanas Liquid directly in water/five weeks	PL-12	–	–	1.5 ± 0.5
Bachruddin <i>et al.</i> (2018)	Mix <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> y <i>B. licheniformis</i> + <i>Lactobacillus</i> sps. y <i>Nitrobacter</i> sp. (10 ⁸ UFC mL ⁻¹)	Líquida directamente en el agua/ocho semanas Liquid directly in water/eight weeks	PL-12	–	–	1.5 ± 0.0
Presente estudio/ This study (2019)	<i>B. firmus</i> C101 (10 ⁶ UFC mL ⁻¹)	Líquida directamente en el agua/tres semanas Liquid directly in water/three weeks	PL-21	3.8 ± 0.7	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1

Los datos se expresan como promedio ± DE (desviación estándar). TEC = tasa específica de crecimiento, ADG = promedio de incremento de peso diario y TCA = tasa de conversión alimenticia.

Data are expressed as mean ± SD (standard deviation). TEC = specific growth rate, ADG = average daily weight gain, and TCA = feed conversion rate.

El crecimiento, la resistencia a cambios de temperatura, salinidad, y las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal (TGI) de los organismos, el cual es ligeramente alcalino (pH ~ 8,0) y con una alta concentración de sales biliares (Heisterkamp *et al.*, 2016), son características que debe cumplir un buen candidato a probiótico (Balcázar *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2018). De acuerdo con lo anterior, el perfil fisiológico de *B. firmus* C101 y el hecho de que algunas cepas de *B. firmus* pueden adherirse y formar biopelículas en el tracto intestinal de organismos acuáticos (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) sugieren que existe una alta probabilidad de colonización del TGI de las poslarvas de camarón blanco y una alta probabilidad de supervivencia bajo estas condiciones, por lo que en futuras investigaciones sería pertinente efectuar un análisis de la diversidad microbiana intestinal con técnicas independientes de cultivo.

Growth, resistance to changes in temperature, salinity, and the physiological conditions of the gastrointestinal tract (TGI) of organisms, which is slightly alkaline (pH ~ 8.0) and with a high concentration of bile salts (Heisterkamp *et al.*, 2016), are characteristics that a good probiotic candidate must meet (Balcázar *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2018). Following the above, the physiological profile of *B. firmus* C101 and the fact that some strains of *B. firmus* can adhere and form biofilms in the intestinal tract of aquatic organisms (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) suggest that there is a high probability of TGI colonization of white shrimp postlarvae and a high probability of survival under these conditions, therefore it would be pertinent in future researches to carry out analyzes of intestinal microbial diversity with independent culture techniques.

Adicionalmente, el perfil bioquímico de *B. firmus* C101 sugiere una alta actividad enzimática de hidrolasas como las lipasas/esterasas, quimotripsinas y fosfatasa, las

Additionally, the biochemical profile of *B. firmus* C101 suggests a high enzymatic activity of hydrolases such as lipases/esterases, chymotrypsins and phosphatases, which may be beneficial for the host, since several studies

cuales pueden ser benéficas para el hospedero, dado que varios estudios sugieren que una vez estas bacterias se establecen en el TGI pueden secretar estas enzimas, y de esta manera contribuir a la degradación y absorción de los nutrientes esenciales que mejoran la digestión y el aprovechamiento del alimento (Castex *et al.*, 2008; Angelakis, 2017; Gobi *et al.*, 2018). Otras investigaciones indican que la producción de fosfatasa por parte de probióticos como *B. subtilis* aumenta la absorción de elementos como calcio, hierro y fósforo inorgánico en especies de peces como *Epinephelus coioides* y *Silurus soldatovi* (Liu *et al.*, 2010) y facilita la eliminación de ésteres de fosfatos y la detoxificación intestinal, lo que evita problemas de inflamación e infecciones en el TGI que pueden conllevar al estrés y muerte del hospedero (Lallès and Suescún, 2014).

Por otro lado, se sabe que algunas cepas de *Bacillus* sp. muestran una importante actividad antagónica frente a potenciales patógenos como *A. hydrophila* (Yi *et al.*, 2018), *Edwardsiella tarda* (Ran *et al.*, 2012), *V. harveyi* (Zokaefar *et al.*, 2012), *V. parahaemolyticus* (Bernal *et al.*, 2017) y *Streptococcus* sp. (Liu *et al.*, 2012), que afecta la larvicultura de animales acuáticos (López León *et al.*, 2016). Este estudio resalta la actividad inhibitoria de los ECPs de *B. firmus* C101 frente a algunos de estos potenciales patógenos. No obstante, posteriores estudios sobre este modo de acción son requeridos, pues algunos autores sugieren que dicha actividad puede deberse a la secreción de compuestos como antibióticos, sideróforos, bacteriocinas, proteasas, formas reactivas del oxígeno (*i.e.* H₂O₂) y lisozimas (Khochamit *et al.*, 2015; Newaj-Fyzul and Austin, 2015; Wang *et al.*, 2015), que podrían estar presentes en los ECPs de este candidato.

Con base en todo lo anterior, se propone a *B. firmus* C101 como un potencial candidato probiótico y promotor del crecimiento en la larvicultura del camarón blanco (*L. vannamei*), especialmente en estadios post-larvarios y en sistemas de cultivo cerrado. No obstante, se requieren estudios sobre los posibles mecanismos de acción de este candidato, la habilidad para adherirse al TGI y el efecto en la calidad del agua de los cultivos.

Evaluación de *B. firmus* C101 como probiótico para rotíferos

En las últimas décadas, varios estudios han señalado que las bacterias ácido-lácticas (*i.e.*: *Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*) y del género *Bacillus* (*i.e.*: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*) tienen un efecto positivo sobre los rendimientos

suggest that once these bacteria establish themselves in the TGI can secrete these enzymes, and in this way contribute to the degradation and absorption of essential nutrients that improve digestion and the use of food (Castex *et al.*, 2008; Angelakis, 2017; Gobi *et al.*, 2018). Other research indicates that the production of phosphatases by probiotics such as *B. subtilis* increases the absorption of elements such as calcium, iron, and inorganic phosphorus in fish species such as *Epinephelus coioides* and *Silurus soldatovi* (Liu *et al.*, 2010), and facilitates the elimination of phosphate esters and intestinal detoxification, which avoids inflammation problems and infections in the TGI that can lead to stress and death of the host (Lallès and Suescún, 2014).

On the other hand, it is known that some strains of *Bacillus* sp. show significant antagonistic activity against potential pathogens such as *A. hydrophila* (Yi *et al.*, 2018), *Edwardsiella tarda* (Ran *et al.*, 2012), *V. harveyi* (Zokaefar *et al.*, 2012), *V. parahaemolyticus* (Bernal *et al.*, 2017) and *Streptococcus* sp. (Liu *et al.*, 2012), which affect the larviculture of aquatic animals (López León *et al.*, 2016). This study highlights the inhibitory activity of the *B. firmus* C101 ECPs against some of these potential pathogens. However, subsequent studies on this mode of action are required as some authors suggest that this activity may be due to the secretion of compounds such as antibiotics, siderophores, bacteriocins, proteases, reactive forms of oxygen (*i.e.* H₂O₂) and lysozymes (Khochamit *et al.*, 2015; Newaj-Fyzul and Austin, 2015; Wang *et al.*, 2015), which could be present in the ECPs of this candidate.

Based on all of the above, *B. firmus* C101 is proposed as a potential probiotic candidate and growth promoter in the larviculture of white shrimp (*L. vannamei*), especially in post-larval stages and in closed culture systems. However, studies are required on the possible mechanisms of action of this candidate, the ability to adhere to TGI, and the effect on crop water quality.

Evaluation of *B. firmus* C101 as a probiotic for rotifers

In recent decades, several studies have indicated that lactic acid bacteria (*i.e.*: *LactoBacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*) and of the genus *Bacillus* (*i.e.*: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*) have a positive effect on the yields of rotifer crops. Therefore, it has been observed that mixed cultures of these bacteria increase their density (rotifers mL⁻¹), beneficial bacterial load (CFU rotifer⁻¹), and nutritional composition (Hirata *et al.*, 1998; Douillet, 2000; Najmi *et*

de los cultivos de rotíferos. Por tanto, se ha observado que cultivos mixtos de estas bacterias aumentan su densidad (rotíferos mL⁻¹), carga bacteriana benéfica (UFC rotífero⁻¹) y composición nutricional (Hirata *et al.*, 1998; Douillet, 2000; Najmi *et al.*, 2018). En una publicación previa (Murillo y Villamil, 2011), se registró un efecto notable sobre el crecimiento y regulación de la microbiota de *B. plicatilis* tratado con *B. subtilis* CCBM-64 (10⁷ UFC mL⁻¹). Otro estudio mostró que mezclas de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. laterosporus* (10⁸ UFC L⁻¹ c/u) tienen un efecto directo sobre la fecundidad de los rotíferos (egg-ratios de 0,30 a las 48 h de tratamiento) (Zink *et al.*, 2013). En concordancia, los datos del presente estudio sugieren un notable efecto de *Bacillus firmus* C101 sobre el crecimiento poblacional, fecundidad y productividad de *B. plicatilis* s.s., cuando se administra a una dosis de 10⁶ UCF mL⁻¹, después de 48 h. No obstante, comparaciones directas de la dinámica poblacional entre estudios de rotíferos puede ser complicado debido a la utilización de diferentes cepas, mezclas, mecanismos de suministro y/o condiciones previas o durante el cultivo como el tipo, y cantidad de microalgas suministradas como alimento primario (Snell *et al.*, 1983; Abd Rahman *et al.*, 2018).

Entre los beneficios del enriquecimiento de los cultivos de rotíferos con este tipo de probióticos, se encuentra la modulación de la microbiota endógena del tracto digestivo, que incluye el aumento de la carga de bacterias benéficas, la disminución de la carga de bacterias patógenas (Makridis *et al.*, 2000; Planas *et al.*, 2004) y la secreción de metabolitos y nutrientes esenciales como vitaminas (biotina y VitB12), aminoácidos y factores de crecimiento (Yoshimatsu y Hossain, 2014). Esto contribuye al mejoramiento de la composición nutricional (Rollo *et al.*, 2006), tasa de reproducción (Qi *et al.*, 2009), y tasa de crecimiento (Rombaut *et al.*, 1999) de los rotíferos. En el presente estudio se observó que la administración de *B. firmus* C101 en los cultivos resultó en un aumento de las densidades poblacionales, lo cual evidencia a su vez un efecto positivo de este candidato probiótico. No obstante, se requieren investigaciones futuras sobre su perfil nutricional y un análisis de la comunidad bacteriana que a su vez permita determinar si el aumento en el número de bacterias totales se debe a la incorporación de este candidato en la microbiota nativa, y no a un aumento de la carga bacteriana de posibles patógenos (*i.e.* especies del género *Vibrio*) en los tejidos de los rotíferos.

La importancia del presente aporte en este estudio radica en que el mejoramiento de los cultivos de rotíferos a

al., 2018). In a previous publication (Murillo and Villamil, 2011), a remarkable effect on the growth and regulation of the *B. plicatilis* microbiota treated with *B. subtilis* CCBM-64 (10⁷ CFU mL⁻¹) was reported. Another study showed that mixtures of *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* and *B. laterosporus* (10⁸ CFU L⁻¹ each) have a direct effect on the fecundity of rotifers (egg-ratios from 0.30 to 48 h of treatment) (Zink *et al.*, 2013). In agreement, the data of the present study suggest a remarkable effect of *Bacillus firmus* C101 on population growth, fertility, and productivity of *B. plicatilis* s.s., when administered at a dose of 10⁶ UCF mL⁻¹, after 48 h. However, direct comparisons of population dynamics between studies of rotifers can be complicated due to the use of different strains, mixtures, delivery mechanisms, and/or preconditions or during cultivation as the type, and quantity of microalgae supplied as a primary food (Snell *et al.*, 1983; Abd Rahman *et al.*, 2018).

Among the benefits of enriching rotifer cultures with this type of probiotics is modulation of the endogenous microbiota of the digestive tract, which includes increasing the load of beneficial bacteria, decreasing the load of pathogenic bacteria (Makridis *et al.*, 2000; Planas *et al.*, 2004); and the secretion of metabolites and essential nutrients such as vitamins (biotin and VitB12), amino acids, and growth factors (Yoshimatsu and Hossain, 2014). This contributes to the improvement of the nutritional composition (Rollo *et al.*, 2006), reproduction rate (Qi *et al.*, 2009), and growth rate (Rombaut *et al.*, 1999) of rotifers. In the present study, it was observed that the administration of *B. firmus* C101 in crops resulted in an increase in population densities, which in turn evidences a positive effect of this probiotic candidate. However, future research on its nutritional profile is required, and an analysis of the bacterial community that in turn allows determining whether the increase in the number of total bacteria is due to the incorporation of this candidate in the native microbiota, and not to an increase in the bacterial load of possible pathogens (*i.e.* species of the genus *Vibrio*) in the tissues of the rotifers.

The importance of the present contribution in this study is that the improvement of rotifer cultures through these strategies has turned out to be an important tool for the transfer of probiotic candidates to culture organisms in larval stages (Jamali *et al.*, 2015). Thus, these organisms can take advantage of the multiple benefits provided by probiotic bacteria, such as the decrease in diseases that affect larvae (Jeeja *et al.*, 2011; Loka *et al.*, 2016). For

través de estas estrategias ha resultado ser una herramienta importante para la transferencia de los candidatos probióticos a los organismos de cultivo en etapas larvarias (Jamali *et al.*, 2015). Así, estos organismos pueden aprovechar los múltiples beneficios que brindan las bacterias probióticas, como por ejemplo, la disminución de las enfermedades que afectan a las larvas (Jeeja *et al.*, 2011; Loka *et al.*, 2016). Por tal razón, estudios futuros son necesarios para probar que los rotíferos enriquecidos pueden servir de vehículo en la transferencia de este candidato probiótico hacia las larvas de organismos de cultivo como el camarón, pues algunos estudios sugieren que una vez estos candidatos probióticos se establecen en los tejidos y el tracto digestivo de los rotíferos (o de cualquier otro tipo de alimento vivo) (Kostopoulou y Centre, 2012), dichos candidatos y sus productos pueden llegar efectivamente hasta el TGI de las larvas, que se alimentan de estas presas vivas enriquecidas (Ringø *et al.*, 2003, 2007).

CONCLUSIONES

Es posible confirmar el importante papel de *Bacillus firmus* C101 como promotor del crecimiento en estadios post-larvarios de camarón blanco (*L. vannamei*) y en el mejoramiento de los parámetros poblacionales de rotíferos (*B. plicatilis* s.s.), pues los resultados aquí presentados indican un efecto positivo de la adición directa de esta cepa en cultivos experimentales. A pesar de que en la actualidad existen numerosos reportes sobre el efecto probiótico de diferentes especies de *Bacillus* sp., el presente estudio puede considerarse como el primer reporte del efecto de la administración individual de *B. firmus* en rotíferos. No obstante, se requieren estudios adicionales sobre los posibles mecanismos de acción de este candidato probiótico, y pruebas a escala piloto y comercial para validar estos resultados y su posible transferencia a las empresas acuícolas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano (sede: Santa Marta, Colombia) por prestar las instalaciones para la ejecución de los experimentos, a Ceniagua (Cartagena, Colombia) por la donación de los organismos experimentales, a Colciencias por la financiación del macroproyecto (código 6507-502-27286), a María Angélica Martínez Silva y Lina María Mejía Quiñones por su aporte en algunos experimentos, y a la Universidad de La Sabana por el apoyo en el material bibliográfico.

this reason, future studies are necessary to prove that the enriched rotifers can serve as a vehicle in the transfer of this probiotic candidate to the larvae of culture organisms such as shrimp, as some studies suggest that once these probiotic candidates establish themselves in the tissues and the digestive tract of rotifers (or any other type of live food) (Kostopoulou and Center, 2012), these candidates and their products can effectively reach the TGI of the larvae, which feed on these enriched live prey (Ringø *et al.*, 2003, 2007).

CONCLUSIONS

It is possible to confirm the important role of *Bacillus firmus* C101 as a growth promoter in post-larval stages of white shrimp (*L. vannamei*) and in the improvement of rotifers population parameters (*B. plicatilis* s.s.), as the results presented here indicate a positive effect of the direct addition of this strain in experimental cultures. Although there are currently numerous reports on the probiotic effect of different *Bacillus* sp., the present study can be considered as the first report of the effect of individual administration of *B. firmus* in rotifers. However, additional studies are required on the possible mechanisms of action of this probiotic candidate, and pilot and commercial-scale tests to validate these results and their possible transfer to aquaculture companies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Jorge Tadeo Lozano University Foundation (headquarters: Santa Marta, Colombia) for providing the facilities for the execution of the experiments, Ceniagua (Cartagena, Colombia) for the donation of the experimental organisms, and Colciencias for financing the macroproject (code 6507-502-27286), to María Angélica Martínez Silva and Lina María Mejía Quiñones for their contribution in some experiments, and the University of La Sabana for their support in bibliographic material.

BIBLIOGRAFÍA/LITERATURE CITED

- Abd El-Rhman, A.M., Y.A.E. Khattab and A.M.E. Shalaby. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol., 27: 175-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020>.
- Abd Rahman, A.R., Z.C. Cob, Z. Jamari, A.M. Mohamed, T. Toda and O.H. Ross. 2018. The effects of microalgae as live food for *Brachionus plicatilis* (Rotifer) in intensive culture system. Trop. Life Sci. Res., 29: 127-138.
- Angelakis, E. 2017. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. Microb. Pathog., 106: 162-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>.
- Bachruddin, M, M. Sholichah, S. Istiqomah and A. Supriyanto. 2018. Effect of probiotic culture water on growth, mortality, and feed conversion ratio of Vanamei shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci., 137.
- Bajagai, Y.S., A.V. Klieve, P.J. Dart and W.L. Bryden. 2016. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. FAO.
- Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Cunningham, D. Vendrell and J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol., 114: 173-186.
- Barman, P., S. Raut, S.K. Sen, U. Shaikh and P. Bandyopadhyay. 2017. Effect of a three-component bacterial consortium in white shrimp farming for growth, survival and water quality management. Acta Biologica Szegediensis, 61(1): 35-44.
- Bassler, B.L., E.P. Greenberg and A.M. Stevens. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. J. Bacteriol., 179: 4043-4045.
- Bernal, M.G., R.M. Marrero, Á.I. Campa-Córdova and J.M. Mazón-Suástegui. 2017. Probiotic effect of *Streptomyces* strains alone or in combination with *Bacillus* and *Lactobacillus* in juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Int., 25: 927-939.
- Bomba, A., R. Nemcová, D. Mudroňová and P. Guba. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. Trends Food Sci. Technol., 13: 121-126.
- Cabo, M.L., M.A. Murado, M.P. González and L. Pastoriza. 1999. A method for bacteriocin quantification. J. Appl. Microbiol., 87: 907-914.
- Castex, M., L. Chim, D. Pham, P. Lemaire, N. Wabete, J.L. Nicolas, P. Schmidely and C. Mariojouis. 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. Aquaculture, 275: 182-193.
- Cisneros, R. 2011. Rendimiento poblacional del rotífero nativo *Brachionus* sp. "Cayman", utilizando diferentes enriquecedores. Ecol. Apl., 10: 99-105.
- Cisneros, R. 2012. Crecimiento poblacional del rotífero nativo *Brachionus* sp. "Cayman", al evaluar diferentes microalgas como alimento. Revista cubana de investigaciones pesqueras, 29(1): 18-23.
- Claus, D. 1992. A standardized Gram staining procedure. World J. Microbiol. Biotechnol., 8: 451-452.
- Dawood, M.A.O., S. Koshio, M.M. Abdel-Daim and H. Van Doan. 2018. Probiotic application for sustainable aquaculture. Rev. Aquac., 11(3): 907-924.
- Douillet, P.A. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. Aquaculture, 182: 241-248.
- Fao, W.H.O. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria. Food Agric. Organ. UN World Heal. Organ. Expert Consult. Rep.
- Ferreira, G.S., N.C. Bolívar, S.A. Pereira, C. Guertler, F. do N. Vieira, J.L.P. Mourinho and W.Q. Seiffert. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 448: 273-279.
- Flores-Miranda, M.C., A. Luna-González, Á.I. Campa Córdova, J.A. Fierro-Coronado, B.O. Partida-Arangure, J. Pintado and H.A. González-Ocampo. 2012. Isolation and characterization of infectious *Vibrio sinaloensis* strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Rev. Biol. Trop., 60: 567-576.
- Gatesoupe, F.J. 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 96: 335-342.
- Gobi, N., B. Vaseeharan, J.C. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam and A. Iswarya. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dabhl improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol., 74: 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.066>.
- Heisterkamp, I.M., A. Schramm, D. de Beer and P. Stief. 2016. Direct nitrous oxide emission from the aquacultured pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). In: Drake H.L. (Ed.). Appl. Environ. Microbiol., 82: 4028 LP-4034.
- Hirata, H., O. Murata, S. Yamada, H. Ishitani and M. Wachi. 1998. Probiotic culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia, 387: 495-498.
- Hoseinifar, S.H., M. Dadar and E. Ringø. 2017. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: The functional feed additives scenario. Aquac. Res., 48: 3987-4000.
- Jamali, H., A. Imani, D. Abdollahi, R. Roozbehfar and A. Isari. 2015. Use of probiotic *Bacillus* spp. in Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia (*Artemia urmiana*) enrichment: effects on growth and survival of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Larvae. Probiotics Antimicrob. Proteins., 7: 118-125.



- Jeeja, P.K., Imelda-Joseph and R. Paul Raj. 2011. Nutritional composition of rotifer (*Brachionus plicatilis* Muller) cultured using selected natural diets. Indian J. Fish., 58: 59-65. <http://he.scribd.com/doc/93625862/Jeeja-et-al-2011>.
- Kazuń, B. and K. Kazuń. 2014. Probiotics in aquaculture. Med. Veter., 70: 25-28.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan and L. Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture, 274: 1-14.
- Khochamit, N., S. Siripornadulsil, P. Sukon and W. Siripornadulsil. 2015. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res., 170: 36-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.004>.
- Kolanchina, P., P.R. Kumari, T.S. Gnanam, G. John and A. Balasundar. 2017. Performance evaluation of two probiotic species, on the growth, body composition and immune expression in *Penaeus monodon*. J. Fish. Aquat. Sci., 12: 157-167. <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jfas.2017.157.167>.
- Kostopoulou, V. and H. Centre. 2012. The rotifer *Brachionus plicatilis*: an emerging bio-tool for numerous applications. J. Biol. Res., 17: 97-112.
- Kumar, V, S. Roy, D.K. Meena and U.K. Sarkar. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. Rev. Fish. Sci. Aquac., 24: 342-368.
- Lallès, J.P. and J.P. Suescún. 2014. Intestinal alkaline phosphatase: an enzyme with anti-inflammatory properties. CES Med. Vet. Zootec., 9: 94-103.
- Li, E., X. Wang, K. Chen, C. Xu, J.G. Qin and L. Chen. 2017. Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. Rev. Aquac., 9: 57-75.
- Liu, C.H., C.H. Chiu, S.W. Wang and W. Cheng. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol., 33: 699-706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.012>.
- Liu, W., X.M. Zhang and L.B. Wang. 2010. Digestive enzyme and alkaline phosphatase activities during the early stages of *Silurus soldatovi* development. Zool. Res., 31: 627-632.
- Loka, J., S.M. Sonali, P. Saha, K. Devaraj and K.K. Philipose. 2016. Use of commercial probiotics for the improvement of water quality and rotifer density in outdoor mass culture tanks. Indian J. Fish., 63: 145-149.
- López León, P., A. Luna González, R. Escamilla Montes, M.C. Flores-Miranda and J.A. Fierro Coronado. 2016. Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Lat. Am. J. Aquat. Res., 44: 470-479.
- Luis-Villaseñor, I.E., M.E. Macías-Rodríguez, B. Gómez-Gil, F. Ascencio-Valle and Á.I. Campa-Córdova. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 321: 136-144.
- Makridis, P., A.J. Fjellheim, J. Skjermo and O. Vadstein. 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. Aquaculture, 185: 207-218.
- Membreño, L., S. Morales and E. Martínez. 2014. Crecimiento de camarones blancos. Rev. Cient. UNAN-León., 5: 103-115.
- Murillo, I. and L.M. Villamil-Díaz. 2011. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. J. Aquac. Res. Dev., 1: 1-5. <https://www.omicsonline.org/bacillus-cereus-and-bacillus-subtilis-used-as-probiotics-in-rotifer-brachionus-plicatilis-cultures-2155-9546.S1007.php?aid=2309>.
- Najmi, N., M. Yahyavi and A. Haghshenas. 2018. Effect of enriched rotifer (*Brachionus plicatilis*) with probiotic lactobacilli on growth, survival and resistance indicators of western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. Iran. J. Fish. Sci., 17: 11-20.
- Newaj-Fyzul, A., A.H. Al-Harbi and B. Austin. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 431: 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>.
- Newaj-Fyzul, A. and B. Austin. 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. J. Fish Dis., 38: 937-955.
- Nimrat, S., P. Tanutpongpalin, K. Sritunyalucksana, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai. 2013. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. Aquac. Int., 21: 655-666.
- Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai and V. Vuthiphandchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Vet. Microbiol., 159: 443-450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>.
- Pacheco-Vega, J.M., M.A. Cadena-Roa, J.A. Leyva-Flores, O.I. Zavala-Leal, E. Pérez-Bravo and J.M.J. Ruiz-Velazco. 2018. Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. Aquac. Reports., 11: 24-30.
- Planas, M., J.A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M.P. González and M. Murado. 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. Aquaculture, 240: 313-329.
- Qi, Z., K. Dierckens, T. Defoirdt, P. Sorgeloos, N. Boon, Z. Bao and P. Bossier. 2009. Effects of feeding regime and probiotics on the diverting microbial communities in rotifer *Brachionus* culture. Aquac. Int., 17: 303-315.
- Raghu, P., M. Rajikkannu, R. Baburajan, A. Deva and R. Nandakumar. 2016. Effect of *Bacillus coagulans* and *B. firmus* incorporated probiotic diet on superoxide dismutase activity and catalase activity in *Penaeus monodon*. World Sci. News., 44: 224-235.

- Ran, C., A. Carrias, M.A. Williams, N. Capps, B.C.T. Dan, J.C. Newton, J.W. Kloepper, E.L. Ooi, C.L. Browdy, J.S. Terhune and M.R. Liles. 2012. Identification of *Bacillus* strains for biological control of catfish pathogens. *PLoS One* 7.
- Reddy, S.J., D. Vineela and B.K. Kumar. 2018. Influence of probiotics on growth and development of aquaculture—a review. *World J. Pharm. Res.*, 7: 291-315.
- Ringø, E. and S.K. Song. 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac. Nutr.*, 22: 4-24.
- Ringø, E., R.E. Olsen, T.M. Mayhew and R. Myklebust. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227: 395-415.
- Ringø, E., R. Myklebust, T.M. Mayhew and R.E. Olsen. 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268: 251-264.
- Rollo, A., R. Sulpizio, M. Nardi, S. Silvi, C. Orpianesi, M. Caggiano, A. Cresci and O. Carnevali. 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiol. Biochem.*, 32: 167-177.
- Rombaut, G., P. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 176: 195-207.
- Sadat Hoseini Madani, N., T.J. Adorian, H. Ghafari Farsani and S.H. Hoseinifar. 2018. 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.*, 49: 1926-1933.
- Snell, T.W., C.J. Bieberich and R. Fuerst. 1983. The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 31: 21-30.
- Tang, J., Y. Dai, Y. Li, J. Qin and Y. Wang. 2016. Can application of commercial microbial products improve fish growth and water quality in freshwater polyculture? *N. Am. J. Aquac.*, 78: 154-160.
- Valenzuela-González, F., R. Casillas-Hernández and E. Villalpando. 2015. The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4): 297-313.
- Vieira, F. do N., A. Jatobá, J.L.P. Mouriño, C.C.B. Neto, J.S. Da Silva, W.Q. Seiffert, M. Soares and L.A. Vinatea. 2016. Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. *Rev. Bras. Zootec.*, 45: 203-207.
- Villamil Díaz, L.M., A. Figueras, M. Planas and B. Novoa. 2010. *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. *Aquaculture*, 307: 83-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.004>.
- Villamil Díaz, L.M. y D. Esguerra Rodríguez. 2017. Enterococcus, Myroides y Exiguobacterium: géneros bacterianos con potencial probiótico para el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Biol. Col.*, 22: 331-339.
- Wang, C., X. Song, X. Zhang, S. Zhang, X. Sun, B. Liu, W. Gao and J. Huang. 2016. Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *J. Fish. Sci. China*, 23: 146-155.
- Wang, Y. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259-264.
- Wang, Y., Y. Sun, X. Zhang, Z. Zhang, J. Song, M. Gui and P. Li. 2015. Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. *Food Control.*, 50: 729-735. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.045>.
- Yi, Y., Z. Zhang, F. Zhao, H. Liu, L. Yu, J. Zha and G. Wang. 2018. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: Antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 78: 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.055>.
- Yoshimatsu, T. and M.A. Hossain. 2014. Recent advances in the high-density rotifer culture in Japan. *Aquac. Int.*, 22:1587-1603.
- Yuniarti, A., D.A. Guntoro and A.M. Hariati. 2013. Response of indigenous *Bacillus megaterium* supplementation on the growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone), a new target species for shrimp culture in East Java of Indonesia. *J. Basic. Appl. Sci. Res.*, 3: 747-754.
- Zhou, X.X., Y.B. Wang and W.F. Li. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 287: 349-353.
- Zink, I.C., P.A. Douillet and D.D. Benetti. 2013. Improvement of rotifer *Brachionus plicatilis* population growth dynamics with inclusion of *Bacillus* spp. probiotics. *Aquac. Res.*, 44: 200-211.
- Zokaeifar, H., J.L. Balcázar, C.R. Saad, M.S. Kamarudin, K. Sijam, A. Arshad and N. Nejat. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 683-689.
- Zokaeifar, H., N. Babaei, C.R. Saad, M.S. Kamarudin, K. Sijam and J.L. Balcázar. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 36: 68-74.
- Zorriehzahra, M.J., S.T. Delshad, M. Adel, R. Tiwari, K. Karthik, K. Dhama and C.C. Lazado. 2016. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: A review. *Vet. Q.*, 36: 228-241.