



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD SINALOA**



**Crecimiento, supervivencia y respuesta inmune
de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*)
tratada con productos naturales y retada con
*Vibrio parahaemolyticus***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

GABRIELA BERENICE MENDOZA MALDONADO

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO; DICIEMBRE DE 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 28 del mes noviembre del año 2019, el (la) que suscribe Gabriela Berenice Mendoza Maldonado alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A160865, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Antonio Luna González y Dr. Genaro Diarte Plata y cede los derechos del trabajo intitulado Crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratada con productos naturales y retada con *Vibrio parahaemolyticus*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: gabriela_bmm@hotmail.com, aluna@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in blue ink is positioned above a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Gabriela B. Maldonado'.

Gabriela Berenice Mendoza Maldonado



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 26 de nov del 2019

El Colegio de Profesores de Posgrado de CIIDIR Sinaloa en su Sesión
(Unidad Académica)

ordinaria No. celebrada el día 17 del mes octubre de 2019 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	MENDOZA	Apellido Materno:	MALDONADO	Nombre (s):	GABRIELA BERENICE
-------------------	---------	-------------------	-----------	-------------	-------------------

Número de registro: A 1 6 0 8 6 5

del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratada con productos naturales y retada con *Vibrio parahaemolyticus*

Objetivo general del trabajo de tesis:

Evaluar el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de *A. ventricosus* cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Antonio Luna González 2° Director: Genaro Diarte Plata
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

CIIDIR-Sinaloa

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dr. Antonio Luna González
Aspirante

M. en C. Gabriela Berenice
Mendoza Maldonado

2° Director de Tesis

Dr. Genaro Diarte Plata
Presidente del Colegio

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal
CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 11 horas del día 17 del mes de octubre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA para examinar la tesis titulada:

Crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratada con productos naturales y retada con *Vibrio parahaemolyticus*.

Presentada por la alumna:

Mendoza	Maldonado	Gabriela Berenice							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
	Con registro:	<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20px; text-align: center;">A</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">1</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">6</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">0</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">8</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">6</td> <td style="width: 20px; text-align: center;">5</td> </tr> </table>	A	1	6	0	8	6	5
A	1	6	0	8	6	5			

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Antonio Luna González

Dr. Genaro Diarte Plata

Dr. Píndaro Álvarez Ruíz

Dr. Jesús Méndez Lozano

Dr. Carlos Ligne Calderón
Vázquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



CIIDIR-IPN
DIRECCIÓN

DEDICATORIA

A mis padres, Gabriela Maldonado Gutiérrez y César Mendoza Becerra

A mis hermanos, Lucero Mendoza Maldonado y César Mendoza Maldonado

A mi esposo, Conan Vargas Arana

A mis abuelitos que me cuidan desde el cielo, María Gutiérrez Amador y Javier Maldonado Cedillo

A mi abuelita Francisca Becerra Félix

A esas dos personitas que venían en camino y no pude conocer

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios y a la Vida por permitirme concluir con esta etapa y por darme la dicha de tener salud.

A mi mamá, por que tuve momentos en los que estuve a punto de renunciar pero ella me enseñó que siempre debo terminar todo lo que empiezo. A mi papi pues el siempre me ha impulsado a ser mejor, por el me fijo retos, para que esté orgulloso de mi. Finalmente soy lo que soy gracias a ustedes que siempre me han apoyado y han hecho todo por mí y por mis hermanos.

A mi director, el Dr. Antonio Luna González por haberme aceptado como su estudiante, por la confianza que me ha dado, por los consejos de vida y académicos brindados, por sus bromas y regaños, pero sobretodo porque es un ejemplo a seguir y tiene todo mi respeto y admiración.

Al Dr. Genaro Diarte Plata, por ser mi amigo y director de tesis, ha estado presente desde mi titulación de licenciatura, de maestría y ahora en mi doctorado. Gracias por la confianza y echarme siempre porras.

Al Dr. Píndaro Álvarez Ruiz, por ser parte de mi comité, por siempre estar disponible para aclarar mis dudas, por su gran ayuda en la parte molecular de este proyecto, por las historias chistosas contadas y esa manera tan peculiar de explicar todo. Por prestarme la hielera para las placas de qPCR, en fin, su ayuda fue esencial para que pudiera realizar la parte que más se me dificultó de este trabajo.

Al Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez por aceptar formar parte de mi comité, desde el principio estuvo dispuesto a orientarme con lo que respecta a los trámites iniciales del doctorado.

Al Dr. Jesús Méndez Lozano por sus consejos y observaciones muy pertinentes que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la Dra. Ruth Escamilla Montes por su ayuda en la parte de microbiología y cuando se tenían que montar bioensayos.

Al Dr. Arturo Fierro Coronado por su ayuda en las pruebas bioquímicas y por siempre estar dispuesto a explicarme.

A lo largo de este camino me tocó conocer, darle la bienvenida y despedir a muchos que al principio eran conocidos pero después se convirtieron en mis amigos de viaje.

Vladimir, Arturo “el Toro”, Nubia y Cecy, fueron los primeros que conocí al entrar en este laboratorio, me ayudaron en ocasiones a cargar cubetas para llenar tinas, luego

llegó la otra Gaby, Gaby López, quien me echó mucho la mano, me enseñó con tanta paciencia, desde la extracción del RNA, la construcción del cDNA, a hacer PCR, a

correr geles, muchas gracias otra Gaby por todo lo que me enseñaste. Luego llegaron Montse, Irma y Edén, nos hicimos muy amigos todos, nos tocaron regaños

juntos, fiestas juntos también, me acompañaron en momentos difíciles, los extraño y agradezco por estar siempre conmigo. Ana Isabel, que fue alumna de residencia, a

ella si le tocó la parte más fuerte de los bioensayos, también aprender junto conmigo las cosas importantes en cuestiones moleculares. Olga que también le tocó aprender

conmigo a hacer qPCR. Al final llegaron Ana Sofía, Roberto y Michey, ya en ese momento no tenía experimentos que hacer, les tocó la parte relax de este largo

camino de 4 años, en donde festejamos los cumpleaños de todos, salíamos a comer seguido y bueno también han ido y venido varios alumnos como Tania, Andrés,

Bryan, Marlen, Dario, espero no se me pase ninguno. A todos ustedes les agradezco

el simple hecho de regalarme una sonrisa, de escucharme, el darme un consejo, el tomarme en cuenta, el acompañarme en esta historia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mi doctorado.

Al Instituto Politécnico Nacional por haberme aceptado como alumna.

ÍNDICE

RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
ANTECEDENTES	29
JUSTIFICACIÓN	41
HIPÓTESIS	41
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS PARTICULARES	42
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Diseño experimental	43
Objetivo 1	45
Objetivo 2	47
Objetivo 3	48
Objetivo 4	49
Objetivo 5	53
Análisis estadístico	60
RESULTADOS	60
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	107
LITERATURA CITADA	108
ANEXOS	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de capturas de almejas en Baja California Sur, México, durante el periodo 1966-2001. Tomado de la Carta Nacional Pesquera (Anónimo, 2002).....	19
Figura 2. Producción por cultivo de almeja Catarina <i>A. ventricosus</i> en México (1980-2005).....	20
Figura 3. Volumen de producción de almeja Catarina de 2005-2011 en bahía Magdalena-Almejas en BCS (SAGARPA, 2012).....	21
Figura 4. Imagen satelital del estero la Pitahaya, Guasave, Sinaloa.....	43
Figura 5. Bioensayo para la determinación de la concentración letal media (CL_{50}) de <i>V. parahaemolyticus</i> en <i>A. ventricosus</i>	45
Figura 6. Mortalidad de semillas de <i>A. ventricosus</i> retada con diferentes concentraciones de <i>V. parahaemolyticus</i>	61
Figura 7. Mortalidad de <i>A. ventricosus</i> retada con diferentes concentraciones de <i>V. parahaemolyticus</i>	61
Figura 8. Tejidos de <i>A. ventricosus</i> retada con <i>V. parahaemolyticus</i>	62
Figura 9. Peso de <i>A. ventricosus</i>	63
Figura 10. Longitud de <i>A. ventricosus</i>	64
Figura 11. Alto de <i>A. ventricosus</i>	65
Figura 12. Ancho de <i>A. ventricosus</i>	65
Figura 13. Tasa de crecimiento específico de <i>A. ventricosus</i>	66
Figura 14. Supervivencia de <i>A. ventricosus</i> retada con <i>V. parahaemolyticus</i> y tratada con productos naturales.....	67

Figura 15. Conteo total de hemocitos en hemolinfa de <i>A. ventricosus</i> retada con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h.....	68
Figura 16. Área de hemocitos en hemolinfa de <i>A. ventricosus</i> desafiada con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h.....	69
Figura 17. Actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa de <i>A. ventricosus</i> infectada con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h	70
Figura 18. Actividad de la lisozima en hemolinfa de <i>A. ventricosus</i> infectada con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h.....	72
Figura 19. Concentración de proteína en la hemolinfa de <i>A. ventricosus</i> infectada con <i>V. parahaemolyticus</i> en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h.....	73
Figura 20. Número total y longitud de los contigs obtenidos en el ensamblaje del transcriptoma de <i>A. ventricosus</i> , usando FuntionAnnotator.	75
Figura 21. Distribución taxonómica de los contigs anotados contra la base de datos de taxonomía del NCBI. La mayoría de las secuencias se anotaron con el ostión japonés <i>C. gigas</i>	76
Figura 22. Análisis de ontología génica del transcriptoma de <i>A. ventricosus</i> en el nivel 2 correspondiente a funciones moleculares. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.....	77
Figura 23. Análisis de ontología génica del transcriptoma de <i>A. ventricosus</i> en el nivel 2 correspondiente a componentes celulares. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.....	77

Figura 24. Análisis de ontología génica del transcriptoma de <i>A. ventricosus</i> en el nivel 2 correspondiente a procesos biológicos. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.....	78
Figura 25. Anotación de unigenes de <i>A. ventricosus</i> con la base de datos KEGG.....	80
Figura 26. A) B-actina, B) Hsp70, C) Lisozima G, D) Hsp40, E) Glutation peroxidasa y F) Toll 13.....	86
Figura 27. Hemocitos, gónada, hepatopáncreas, branquias, manto y músculo.....	86
Figura 28. Prueba de primers en hemocitos de almeja catarina adulta sin infectar.....	88
Figura 29. Expresión relativa de los genes relacionados con el sistema inmune HSP70, PEL y qPUP a las 0 y 48 h en <i>A. ventricosus</i> tratada con la mezcla de bacilos (1×10^6 UFC/L).....	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volumen y valor de la producción del año 2000-2011.	21
Tabla 2. Bacilos usados como probióticos en el cultivo de la almeja Catarina (<i>A. ventricosus</i>).....	59
Tabla 3. Actividad enzimática usando el kit API ZYM.....	71
Tabla 4. Resumen estadístico del ensamblaje del transcriptome de <i>A. ventricosus</i>	74
Tabla 5. Unigenes potenciales relacionados con el sistema inmune encontrados en <i>A. ventricosus</i> con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).....	81
Tabla 6. Unigenes potenciales relacionados con el sistema inmune encontrados en <i>A. ventricosus</i> con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).....	81
Tabla 7. Unigenes potenciales del sistema inmune encontrados en <i>A. ventricosus</i> con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).....	82
Tabla 8. Unigenes potenciales relacionados con el sistema inmune encontrados en <i>A. ventricosus</i> con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).....	83
Tabla 9. Primers utilizados en el estudio de la expresión de genes de referencia y genes relacionados con el sistema inmune en <i>A. ventricosus</i>	84
Tabla 10. Resultados de las pruebas de primers en tejidos de <i>A. ventricosus</i>	88

RESUMEN

La almeja Catarina *Argopecten ventricosus* constituye un importante recurso pesquero en México, principalmente en el Golfo de California, pero debido a la sobrepesca se colapsaron las poblaciones naturales de esta especie, además se sabe que la incidencia de enfermedades provoca mortalidades masivas en los cultivos. Debido a esto, se han realizado esfuerzos para desarrollar el cultivo con fines comerciales y de repoblamiento. Por lo tanto se determinó la supervivencia, crecimiento y respuesta inmune de semillas y adultos de *Argopecten ventricosus* tratados con aditivos naturales y retados con *Vibrio parahaemolyticus*. La susceptibilidad y la concentración letal media de *V. parahaemolyticus* se evaluaron en semillas y adultos desafiados por inmersión, es decir, se inoculó la bacteria patógena en el agua de cultivo. El análisis histológico se realizó en adultos desafiados por inmersión. El crecimiento fue evaluado en semillas de *A. ventricosus*, adicionando en el agua una mezcla de probióticos aislados de almeja catarina (MPAC), inulina y ácido fúlvico. Organismos adultos se inyectaron en el músculo aductor con *Vibrio parahaemolyticus* inactivado por calor para analizar la respuesta inmune a nivel bioquímico (conteo de hemocitos, fenoloxidasa y enzimas lisosomales) y molecular (transcriptoma). Se secuenció una librería de ADNc obtenida de un pool de ARN de gónada, músculo, hepatopáncreas, branquias y hemocitos en la plataforma Illumina NextSeq 2 x 75 ciclos de organismos infectados. Las semillas y adultos fueron susceptibles a *V. parahaemolyticus* mostrando una CL₅₀ de 623 UFC/mL y 62,853 UFC/mL, respectivamente. Las toxinas de *V. parahaemolyticus* causaron daños en las glándulas digestivas de los adultos. Se observaron variaciones significativas en el número y área de hemocitos, actividad de

la fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas lisosomales, principalmente a las 8 y 24 h después de la infección. Los aditivos naturales mejoran el crecimiento de *A. ventricosus* y le confieren mayor resistencia ante infecciones causadas por *V. parahaemolyticus*. Los aditivos mejoraron significativamente el crecimiento en peso, longitud, altura y ancho de las semillas y la supervivencia ante el reto con el *vibrio*. Las semillas son más susceptibles a la infección por el *Vibrio* que los adultos. La respuesta inmune de *A. ventricosus*, a nivel bioquímico, fue modulada por *V. parahaemolyticus*. Se ensamblaron 82,468 contigs, 31,120 se anotaron contra la base de datos de proteínas del NCBI-nr. Se obtuvieron 491 genes relacionados con el sistema inmune. Se encontraron transcritos de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRPMs), rutas de señalización inmune, efectores inmunes y de apoptosis. La mezcla de bacilos en el agua de cultivo de *A. ventricosus* aumentó significativamente la expresión de los genes HSP70, PEL y qPUP.

A. ventricosus es muy susceptible a *V. parahaemolyticus* pero los aditivos naturales mejoran el crecimiento y su resistencia ante la infección. El *V. parahaemolyticus* modula la respuesta inmune a nivel bioquímico. A nivel genético, este es el primer reporte sobre transcritos de genes involucrados en la respuesta inmune de *A. ventricosus* que permiten dilucidar la complejidad de su sistema inmune innato, el cual le permite adaptarse a la vida en un ambiente acuático rico en patógenos potenciales.

Palabras clave: *Argopecten ventricosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, inmunología, AHPND, probióticos, crecimiento.

ABSTRACT

The clam catarina *Argopecten ventricosus* constitutes an important fishing resource in Mexico, mainly in the Gulf of California, but due to overfishing the natural populations of this species collapsed, it is also known that the incidence of diseases causes massive mortalities in the crops. Because of this, efforts have been made to develop the crop for commercial and repopulation purposes. Therefore, the survival, growth and immune response of seeds and adults of *Argopecten ventricosus* treated with natural additives and challenged with *Vibrio parahaemolyticus* was determined. Susceptibility and mean lethal concentration of *V. parahaemolyticus* were evaluated in seeds and adults challenged by immersion, that is, the pathogenic bacteria were inoculated in the culture water. Histological analysis was performed in adults challenged by immersion. The growth was evaluated in seeds of *A. ventricosus*, adding in the water a mixture of probiotics isolated from clam catarina (MPAC), inulin and fulvic acid. Adult organisms were injected into the adductor muscle with *Vibrio parahaemolyticus* heat-inactivated to analyze the immune response at the biochemical level (hemocyte count, phenoxidase and lysosomal enzymes) and molecular (transcriptome). A cDNA library obtained from a pool of gonad, muscle, hepatopancreas, gills and hemocyte RNAs was sequenced on the Illumina NextSeq platform 2 x 75 cycles of infected organisms. Seeds and adults were susceptible to *V. parahaemolyticus* showing an LC₅₀ of 623 CFU/mL and 62,853 CFU/mL, respectively. The toxins of *V. parahaemolyticus* caused damage to the digestive glands of adults. Significant variations were observed in the number and area of hemocytes, phenoxidase activity and lysosomal hydrolytic enzymes, mainly at 8 and 24 h after infection. Natural additives improve the growth of *A. ventricosus* and give it greater

resistance to infections caused by *V. parahaemolyticus*. The additives significantly improved the growth in weight, length, height and width of the seeds and the survival before the challenge with vibrio. Seeds are more susceptible to infection by *Vibrio* than adults. The immune response of *A. ventricosus*, at the biochemical level, was modulated by *V. parahaemolyticus*. 82,468 contigs were assembled, 31,120 were scored against the NCBI-nr protein database. 491 genes related to the immune system were obtained. Transcripts of molecular pattern recognition receptors (RRPMs), immune signaling pathways, immune effectors and apoptosis were found. The mixture of bacilli in the culture water of *A. ventricosus* significantly increased the expression of HSP70, PEL and qPUP genes.

A. ventricosus is very susceptible to *V. parahaemolyticus* but natural additives improve growth and its resistance to infection. *V. parahaemolyticus* modulates the immune response at the biochemical level. At the genetic level, this is the first report on gene transcripts involved in the *A. ventricosus* immune response that allows to elucidate the complexity of its innate immune system, which allows it to adapt to life in an aquatic environment rich in potential pathogens.

Key words: *Argopecten ventricosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, immunology, AHPND, probiotics, growth.

INTRODUCCIÓN

En Sinaloa, hay varias especies de bivalvos sujetas a la pesca para el mercado local, que constituyen la única fuente de ingresos para muchas familias de los campos pesqueros ubicados en los márgenes de las bahías. Dentro de los bivalvos explotados, destacan *Anadara* spp. (Arcidae), *Dosinia* spp. (Veneridae), *Chione* spp. (Veneridae), *Megapitaria* spp. (Veneridae) y *Argopecten* spp. (Pectinidae). (SAGARPA, 2001). Sin embargo, las poblaciones naturales han disminuido paulatinamente como consecuencia de la extracción inmoderada, aunado al poco interés que se le ha dado al conocimiento de su biología y ecología, que indudablemente son las bases para su explotación y cultivo sustentable (Contreras-Espinosa, 1993; Santoyo-Reyes, 1994). Un ejemplo de esto es la almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, la cual constituyó un importante recurso pesquero en México, principalmente en Baja California Sur (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2016) hasta 1993, cuando la sobre pesca colapsó las poblaciones naturales (Santamaría *et al.*, 1999). Debido a esto, se han realizado esfuerzos para desarrollar la maricultura de esta especie con el propósito final de recuperar poblaciones en áreas de pesca (Medina *et al.*, 2007).

El cultivo de moluscos bivalvos contribuye significativamente a la producción mundial y nacional de mariscos. La producción mundial de moluscos fue de 15.6 millones de toneladas métricas en 2014 (FAO, 2014). En México existen más de 54 especies nativas de moluscos (Baqueiro, 1984); sin embargo, la acuicultura de moluscos bivalvos se basa principalmente en el cultivo del ostión, de tal manera que en 2013, la producción total del país fue de 38,699 t. México ocupa el cuarto lugar en

América Latina en el cultivo de moluscos bivalvos y las almejas ocupan el segundo lugar a nivel nacional (SAGARPA, 2013).

Existen datos que reportan que la almeja más capturada desde 1966 hasta el 2001 fue la almeja Catarina (Fig. 1).

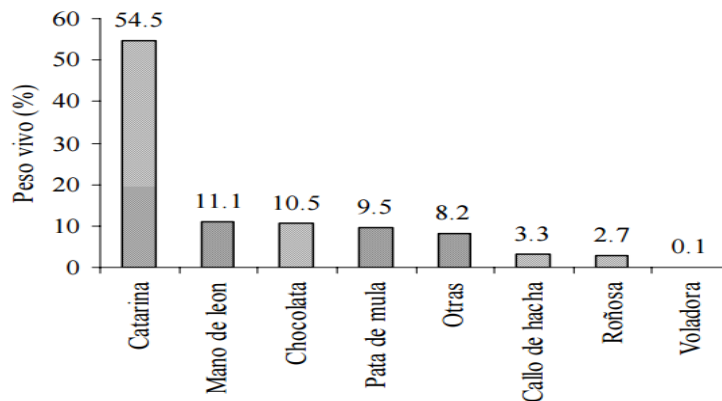
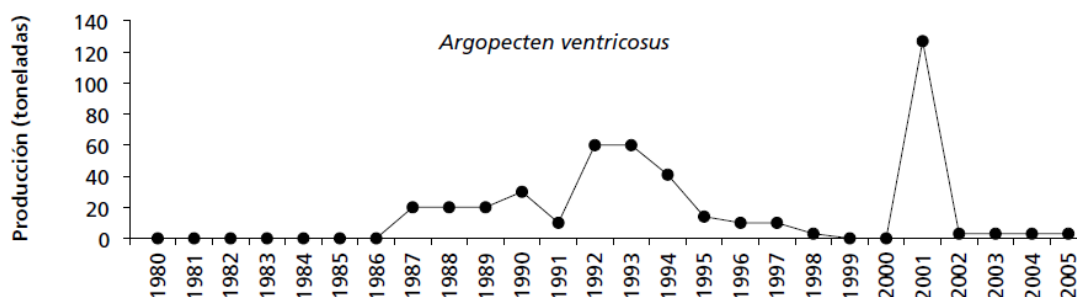


Figura 1. Porcentaje de capturas de almejas en Baja California Sur, México, durante el periodo 1966-2001. Tomado de la Carta Nacional Pesquera (Anónimo, 2002).

La abundancia de la almeja catarina ha disminuido en las costas del Pacífico Mexicano. Debido a su sabor y tamaño de su músculo aductor unido a su alta tasa de crecimiento, en la actualidad varias instituciones de investigación y empresas privadas están tratando de desarrollar una tecnología de cultivo adecuado (Koch *et al.*, 2005).

El cultivo comercial de la almeja Catarina, *A. ventricosus*, inició en 1987 en el estado de Baja California Sur y en la actualidad es técnicamente viable. En ese año (1987) se reportó por primera vez una producción de 20 toneladas la cual se mantuvo a ese nivel hasta 1991 (Maeda-Martinez *et al.*, 2000). En 1992, la empresa Cultemar S.A. de C.V. llegó a cosechar 5 millones de adultos en el estero Rancho

Bueno al sur de Bahía Magdalena en la costa occidental de la Península de Baja California, empleando una tecnología de cultivo en fondo (Maeda-Martinez *et al.*, 2000). Los registros de FAO reportan en ese año y en los dos siguientes alrededor de 60 t de músculo aductor. Después de 1995, la producción ha sido escasa. El colapso en la producción de almeja catarina se atribuyó a la baja rentabilidad del cultivo y al desplome del precio de \$EE.UU. 8/kg a \$EE.UU. 4/kg y a la oferta de un producto idéntico proveniente del cultivo de *A. irradians* en China (Maeda-Martinez *et al.*, 2000) (Fig. 2).



Fuente: FAO.

Figura 2. Producción por cultivo de almeja Catarina *A. ventricosus* en México (1980-2005).

Los datos de la SAGARPA en el 2001, registraron una baja producción de almeja por pesquerías a finales de la década de los noventa y el primer año de la década siguiente. En los siguientes años, la producción se mantuvo estable con pequeños altibajos, no obstante, en el año 2009 (Fig. 3), la producción cayó considerablemente representando un duro golpe a la economía de la zona del complejo lagunar bahía Magdalena-Almejas en BCS (Tabla 1).

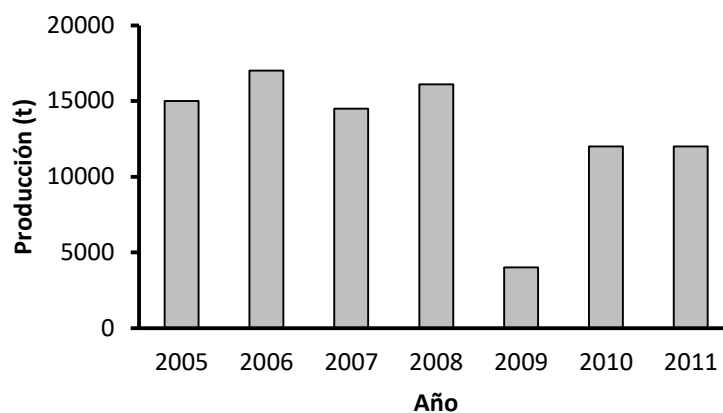


Figura 3. Volumen de producción de almeja Catarina de 2005-2011 en Bahía Magdalena-Almejas en Baja California Sur (SAGARPA, 2012).

Tabla 1. Volumen y valor de la producción del año 2000-2011.

Año	Volumen (kg)	Valor (\$)
2000	180	N/D
2001	1067131	N/D
2002	3832640	N/D
2003	6034592	N/D
2004	12334382	N/D
2005	15243627	76,964,502
2006	17336910	88,693,000
2007	14678638	73,696,872
2008	16426998	83,196,063
2009	4101183.96	21,868,823
2010	11972726.5	60,956,598
2011	12068938.5	66,187,601

A pesar del dominio sobre el cultivo de la almeja Catarina, al igual que en otros bivalvos, las enfermedades, son un importante cuello de botella causando importantes pérdidas en la producción (Romero *et al.*, 2012). Lo anterior se debe a que al cultivar los moluscos en los tanques de cultivo, se crea un ambiente artificial que favorece la proliferación de bacterias oportunistas como los vibrios, las cuales

frecuentemente son patógenas (Sindermann, 1990). La severidad de su ataque está relacionada con las condiciones subóptimas del cultivo (alta densidad, microalgas contaminadas, gametos residuales, altas temperaturas), lo cual aumenta la proliferación bacteriana y compromete la respuesta inmune de los organismos infectadas (Elston, 1984). En el caso de los crustáceos, *Litopenaeus vannamei* se ve gravemente afectado por *Vibrio parahaemolyticus*, causando una enfermedad aguda de necrosis hepatopancreática (AHPND). Esta bacteria se vuelve virulenta adquiriendo un plásmido que expresa toxinas (PirA y PirB), que inducen la muerte celular por formación de poros de la membrana (Lee *et al.*, 2015). Además, *V. parahaemolyticus* tiene sistemas de secreción de tipo III (T3SS1) y VI (T6SS1 y T6SS2) que son importantes factores de virulencia (Cascales, 2008; Kongrueng *et al.*, 2014). Hoy en día, no hay reportes sobre la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en moluscos bivalvos.

La incidencia del género *Vibrio*, que causa mortalidades masivas en moluscos bivalvos, es considerada un problema sanitario que afecta larvas, juveniles y adultos (Gómez-León *et al.*, 2005, 2008; Garnier *et al.*, 2007; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). En comparación con las larvas, las enfermedades provocadas por bacterias en juveniles y adultos existen pero son menos frecuentes (Sinderman, 1990; Lane y Birkbeck, 2000; Braby y Somero, 2006; Carstensen *et al.*, 2010), lo cual indica que ocurre un proceso de maduración del sistema inmune durante la ontogenia de estos organismos (Bachère *et al.*, 1991).

Los moluscos, como todos los invertebrados, poseen un sistema de defensa llamado inmunidad innata o natural que los protege contra patógenos. Por su parte, los vertebrados cuentan, además de la inmunidad innata, con un sistema inmune

adquirido (también llamado adaptativo), el cual se caracteriza por su alta especificidad y memoria inmunológica. La especificidad se debe a la capacidad de producir una variedad de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos contra un epítotope (sitio antigénico) específico. Sin embargo, la memoria inmunológica se observa cuando, después del primer contacto con el antígeno, las clonas específicas quedan sensibilizadas y, en contactos posteriores, se expanden (expansión clonal) rápidamente, ofreciendo una respuesta eficiente (Vargas y Barracco, 2001).

El sistema inmune de los moluscos está representado principalmente por hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral (Vargas y Barracco, 2001). Debido a que los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto compuesto por senos, la hemolinfa baña todos los tejidos y permite que los hemocitos y los componentes humorales se distribuyan uniformemente, favoreciendo el encuentro con las partículas (bióticas y abióticas) (Allam y Paillard, 1998). Uno de los procesos de defensa interna de los hemocitos para eliminar el agente invasor es la fagocitosis. La fagocitosis conlleva una serie de pasos comenzando por la quimiotaxis, mediante la cual, el hemocito “persigue” el rastro químico del agente invasor. Al entrar en contacto con el agente invasor tiene lugar el reconocimiento por medio de moléculas presentes en la membrana de los hemocitos y en la del agente invasor, además de la secreción de moléculas denominadas “opsoninas”. Los receptores y el mecanismo de reconocimiento son fundamentales en la activación de la respuesta inmune. Finalmente, se internaliza el agente invasor dentro del “fagosoma” el cual forma el “fagolisosoma” al fusionarse con un lisosoma. De esta manera se liberan una serie de enzimas lisosomales que actuarán ya sea intracelular

o extracelularmente para destruir al agente o partícula invasora (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Las primeras barreras que deben de atravesar los patógenos para acceder al interior de un organismo, son las físico-químicas. En el caso de los moluscos bivalvos estas barreras se encuentran formadas por la concha y por el mucus que posee enzimas con actividad bactericida (Ratcliffe *et al.*, 1985; Glinski y Jarros, 1997). Una vez superadas las barreras físico-químicas, son los componentes celulares y humorales los que participan en la eliminación del agente exógeno. Los hemocitos juegan un papel protagonista en la reparación tisular que se lleva a cabo, según algunos autores, siguiendo seis etapas (Des Voigne y Sparks, 1968; 1969; Ruddell, 1971). La primera de ellas consiste en una migración de los hemocitos hasta el lugar de la herida (Lauckner, 1983; Fisher, 1986). En la segunda se lleva a cabo la formación de un tapón tras la agregación hemocitaria; en la tercera de las etapas se reemplaza el tejido dañado mediante el traslado de los hemocitos desde el interior de la lesión hacia el sitio de la herida; en cuarto lugar se produce una deposición de colágeno por parte de los fibroblastos (Ruddell, 1971), en quinto lugar se eliminan los restos celulares mediante la acción fagocítica de los granulocitos y ya finalmente, en una sexta etapa se reestructura la arquitectura tisular (Ratcliffe *et al.*, 1985; Fisher, 1986; Sparks y Morado, 1988). Otro mecanismo de defensa es la nodulación, aquí los agentes extraños son aprisionados por varias capas de hemocitos, formando pequeñas capsulas desde las cuales ciertos hemocitos se desprenden y se infiltran en la masa bacteriana intentando fagocitarla. El resultado final de la formación de nódulos es que los microorganismos son atrapados por varios hemocitos, y normalmente el nódulo es fuertemente melanizado por una fuerte actividad fenoloxidasa (Söderhäll y Cerenius, 1992). Por otro lado, la encapsulación es un tipo

de respuesta multicelular para eliminar partículas extrañas que no pueden ser destruidas por los mecanismos humorales (Vázquez *et al.*, 1998). Cuando una partícula es demasiado grande para ser fagocitada, muchos hemocitos cubren a la partícula formando capas alrededor de ella. Las cápsulas son fuertemente melanizadas (Söderhäll y Cerenius, 1992).

La generación de radicales libres es un proceso asociado a la fagocitosis por su alto potencial microbicida. Durante lo que se conoce como “estallido respiratorio” se producen especies reactivas de oxígeno (EROs) tales como O_2^- , H_2O_2 y OH^- , las cuales, una vez que cumplieron su objetivo, deben ser eliminadas rápidamente del sistema pues también pueden ocasionar daño celular al organismo. Para la eliminación de las EROs los organismos cuentan con una maquinaria enzimática especializada, integrada por enzimas antioxidantes como la súperoxido dismutasa (SOD), encargada de la eliminación del O_2^- , y la catalasa, que elimina el H_2O_2 . La generación de óxido nítrico es otro sistema microbicida de alta efectividad (Destoumieux *et al.*, 2000). De igual manera existen importantes elementos de defensa en moluscos bivalvos adultos, como las enzimas hidrolíticas que participan en la degradación y muerte de microorganismos que se encuentran fuera o dentro de los hemocitos o modificando la conformación de la superficie molecular de los organismos patógenos para así facilitar la fagocitosis (Luna-González *et al.*, 2003). Existe además el sistema pro-fenoloxidasa que también participa en los mecanismos de defensa, sin embargo, hay pocos informes sobre la presencia y localización de este en moluscos. La actividad de la fenoloxidasa se ha encontrado en varias especies de moluscos bivalvos. La presencia de fenoloxidasa en la hemolinfa de moluscos confirma que esta enzima juega un papel importante en los mecanismos

de defensa internos. La mayoría de los estudios inmunológicos se han hecho en moluscos adultos, probablemente debido a que no es posible obtener muestras de hemolinfa en larvas y juveniles pequeños para permitir el estudio de los hemocitos responsables de la defensa interna (Luna-González *et al.*, 2002).

El sistema inmune de las especies cultivadas puede ser estimulado por diversos productos naturales, entre ellos, los probióticos, los cuales, además del beneficio anterior, mejoran la calidad del agua, producen compuestos antimicrobianos, aumentan la nutrición del huésped y compiten con las bacterias patógenas (Kesarodi-Watson *et al.*, 2008; Romalde y Barja, 2010).

Las bacterias forman parte de la flora autóctona de los organismos marinos y de su ecosistema, y llegan a representar hasta un 60 % de la población de microorganismos totales en algunas lagunas costeras (Simudu y Tsukamoto, 1985). En el medio marino, las bacterias son importantes actores en los procesos ecológicos ya que realizan distintas funciones vitales para el buen funcionamiento de los ecosistemas, pero también tienen un importante rol metabólico como simbioses que conforman la microbiota residente y transitoria en el tracto digestivo (TD) de moluscos y otras especies de invertebrados. De manera general, la microbiota contribuye a la degradación del alimento, participa en procesos oxidativos y proporciona diversos beneficios al hospedero, que le permiten desarrollarse en diferentes ambientes, por ejemplo, de alta salinidad o de baja concentración de oxígeno (Harris, 1993).

Los beneficios (crecimiento, fisiología y resistencia a patógenos) que tiene la aplicación de una o de varias cepas bacterianas en el alimento o el agua de cultivo de especies de interés comercial, ha llevado a la introducción del concepto de

“probiótico” (Parker, 1974), cuya definición aún se encuentra en debate (Fuller, 1989; Gismondo *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Se ha distinguido el término de “probiótico” para separar a los microorganismos que actuarán en el TD del hospedero, de aquellos empleados en la investigación enfocada hacia la biorremediación de agua y suelos en las estanquerías de cultivo mediante el uso de clusters o consorcios microbianos que incluyen cepas bacterianas con capacidad para remover nitrógeno amoniacal. Debido a lo anterior, Gatesoupe (1999) propone catalogar el uso de las preparaciones microbianas en acuicultura reservando el término “probiótico” a bacterias transitorias o residentes en el tracto digestivo (Tannock, 1997), el término “biocontrol” para las cepas antagónicas a patógenos (Maeda *et al.*, 1997) y “biorremediación” para los microorganismos empleados para eliminar residuos contaminantes en el agua de cultivo.

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de la ONU (FAO, 2006) se considera probióticos a aquellos “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero”. Debido a sus potenciales beneficios, el uso de probióticos se ha extendido a diversas especies de cultivo tanto en ambiente marino como dulceacuícola.

Otra estrategia que ha cobrado gran importancia para mantener la salud de los organismos acuáticos es el uso de prebióticos, los cuáles son polisacáridos no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando el crecimiento selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias promotoras de la salud en el tracto intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Algunos ejemplos de

prebióticos son la lactosa y la inulina y sus derivados (Teitelbaum y Walker, 2002). La inulina es un extracto natural de la raíz de algunas plantas y forma parte del grupo de los oligosacáridos con la composición de un hidrato de carbono de cadena larga. Forma parte de la fibra alimentaria y su incorporación a la dieta diaria es de gran importancia pues llega al intestino casi sin digerir por lo que aumenta el desarrollo de las bacterias. La inulina tiene diversas propiedades, entre ellas están la estimulación del crecimiento de la flora bacteriana y su actividad prebiótica pues promueve el crecimiento de microorganismos beneficiosos para la salud (Madrigal y Sangronis, 2007).

El ácido fúlvico es otro compuesto que puede ser incorporado al agua de cultivo y se forma a partir de materia orgánica en descomposición. El ácido fúlvico (AF) son fracciones de humus. Particularmente, el AF tiene un bajo peso molecular (alrededor de 2000 Da) con gran actividad biológica porque contiene muchos grupos funcionales reactivos beneficiosos para la salud, incluidos hidroxilos, carboxilos, fenoles, carbonilos, quinonas y semiquinonas (Aiken *et al.*, 1985; Islam *et al.*, 2005). Estos grupos químicos reactivos significan que el AF tiene propiedades biológicas tales como quelante de metales, antioxidante, antimicrobiano y actividades inmunoestimuladoras (Van Rensburg *et al.*, 2000; Plaza *et al.*, 2005; Kunavue y Lien, 2012; Chang *et al.*, 2014). Varios informes indican que el AF forma una película sobre el epitelio mucoso del tracto gastrointestinal, protegiéndolo contra infecciones o toxinas y, al mismo tiempo, mejorando la utilización de nutrientes de la alimentación animal (Islam *et al.*, 2005; Trckova *et al.*, 2005; Kunavue y Lien, 2012). Por ejemplo, el AF añadido al sistema de cultivo puede mejorar el crecimiento y la respuesta

inmune de los peces y promover la eliminación de metales nocivos y sustancias químicas del agua (Meinelt *et al.*, 2004)

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*.

ANTECEDENTES

La almeja Catarina, *A. ventricosus*, es un molusco bivalvo de la familia Pectinidae y de acuerdo a Keen (1971), mencionado por Baqueiro (1982), habita generalmente en aguas someras de lagunas y bahías protegidas sobre fondos lodosos o lodosos-arenosos en asociación con macro-algas o pastos marinos, distribuyéndose geográficamente desde la Isla de Cedros, B.C. hasta el Perú, incluyendo el Golfo de California. Este bivalvo posee dos pequeñas prolongaciones calcáreas a nivel del umbo llamadas comúnmente “orejas”, las valvas son convexas y presentan surcos o radios ubicados concéntricamente que parten de la región umbal. Su coloración varía desde naranja con café, púrpura con blanco; café y blanco y gris con blanco. Como una particularidad muy especial, este organismo se desplaza con el movimiento de abrir y cerrar sus valvas. Se alimenta principalmente de fitoplancton (CONAPESCA, 1998). La talla comercial es de 6 – 10 cm (SAGARPA, 2013).

Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Phyllum: Mollusca

Clase: Pelecypoda

Subclase: Pteriomorpha

Orden: Pteriodea

Familia: Pectinidae

Género: *Argopecten* (Monterosato, 1889)

Especie: *ventricosus* (Sowerby, 1835)

Nombre científico: *Argopecten ventricosus*

Nombre común: Almeja catarina

Crecimiento

Félix-Pico (1993) en su estudio biológico de almeja catarina en Bahía Magdalena B.C.S., México, encontró que la variación de la abundancia poblacional durante 1989 y 1990 presentó densidades máximas de 26 organismos/m², reduciéndose, en abril de 1990, hasta cuatro organismos/m², durante el final de la explotación. Las fluctuaciones del peso estándar (relación del peso húmedo de la carne estimado para una talla fija), se asociaron con los principales cambios fisiológicos de la almeja en un ciclo anual, siendo notable la baja de dicho peso durante la temporada de reproducción. El índice del rendimiento muscular (IRM) más alto se registró en invierno de 1989. Durante 1990, los valores máximos de IRM fueron en verano e invierno.

Villalejo y Ceballos (1995) realizaron un estudio de variación del índice de condición general y de rendimiento muscular en *A. circularis* en una población silvestre, obteniendo que el índice de condición fue mayor en otoño, con valores cercanos al 40 % durante el invierno y disminuye en primavera, hasta un valor de 25 % en verano. El rendimiento del músculo abductor presentó los valores más bajos, cercanos al 3 % durante el invierno. La recuperación se inició al final del invierno y principios de primavera; al final de esta estación y al inicio del verano se

registraron los valores mayores cercanos al 50 % y disminuyeron al final del verano y durante el otoño.

Sicard *et al.* (1999) determinaron la temperatura óptima para el crecimiento de juveniles de *A. ventricosus-circularis* en el laboratorio, mediante la estimación del potencial para actividad y tasas de ingestión, aclaramiento y crecimiento dentro de un amplio rango de temperatura (12 y 28 °C). Sus resultados indicaron que la temperatura óptima para el crecimiento de este pectínido ocurrió entre 19 y 22 °C. Diferentes resultados han sido descritos por Kirby-Smith (1970), donde la tasa de aclaramiento de *Argopecten irradians* permaneció independiente entre 10 y 26 °C y con una marcada reducción a 5 °C. Según MacDonald y Thompson (1986), *Placopecten magellanicus* del este de Canadá presenta tasas de aclaramiento significativamente correlacionadas con la temperatura ambiental, tanto en poblaciones de aguas someras como aquellas provenientes de aguas más profundas, aunque según estos mismos autores estos resultados podrán estar también relacionados con la disponibilidad de alimento en esos ambientes. Estos resultados sugieren que las especies de pectínidos poseen diferente capacidad de aclimatación a la temperatura dependiendo de las condiciones ambientales que experimentan sus poblaciones en sus respectivos hábitats.

Vibriosis

Hidalgo *et al.* (2012) mencionan que algunas especies del género *Vibrio* son patógenos que afectan al cultivo de moluscos bivalvos. Las patologías causadas por vibrios en moluscos se conocen desde los años 60; sin embargo, son escasos los estudios sistemáticos y en profundidad en especies de bivalvos distintos de la ostra plana (*Ostrea edulis*) o americana (*Crassostrea virginica*). Debido a los sucesivos

episodios de altas mortalidades en poblaciones de almeja cultivada registrados en los últimos años en Galicia se hace necesario el estudio de la microbiota asociada con el fin de detectar posibles nuevos patógenos limitantes para el cultivo de este molusco bivalvo. Los muestreos realizados a lo largo de 18 meses en cuatro zonas geográficas distintas de Galicia, España, demostraron una variación estacional en la carga bacteriana de las poblaciones de almeja cultivada (*Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*). Como era de esperar se observó un claro incremento en los niveles de bacterias totales y de vibrios en los meses más cálidos. Se aislaron un total de 768 vibrios. La caracterización bioquímica y fisiológica permitió una identificación preliminar de los aislados, agrupados en diversos fenones según sus perfiles. Los datos fenotípicos revelaron una gran diversidad de especies dentro del género, aunque hubo una clara dominancia de aislados del grupo *V. splendidus* constituyendo el 54 % del total de las cepas. Otras especies abundantes fueron *V. lentus*, *V. alginolyticus*, *V. diazotrophicus* y *V. aestuarianus*. Se seleccionaron 145 aislados representativos de los grupos fenotípicos para obtener una identificación más exacta mediante una caracterización molecular.

Respuesta inmune a nivel bioquímico

Costa (2008) comenta que el término hemocito fue acuñado por Farley (1968) para designar a las células sanguíneas de los moluscos bivalvos. El sistema circulatorio de estos organismos es un sistema abierto por lo que se considera que la hemolinfa debe de tener una composición homogénea donde los hemocitos están repartidos a través de ella. Los hemocitos pueden estar implicados en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como pueden ser los mecanismos de digestión o de excreción (Narain, 1973), de transporte y procesos de reparación de la concha

(Cheng, 1981; 1984; Mount *et al.*, 2004). Sin embargo, la función principal de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Bayne *et al.*, 1980; Feng, 1988; Auffret, 1988; Cajaraville y Pal, 1995).

Las primeras barreras que deben de atravesar los patógenos para acceder al interior de un organismo, son las físico-químicas. En el caso de los moluscos bivalvos estas barreras se encuentran formadas por la concha y por el mucus que posee enzimas con actividad bactericida (Glinski y Jarros, 1997; Ratcliffe *et al.*, 1985). Una vez superadas las barreras físico-químicas, son los componentes celulares y humorales los que participan en la eliminación del agente exógeno. Los hemocitos juegan un papel protagonista en la reparación tisular que se lleva a cabo, según algunos autores, siguiendo seis etapas (Des Voigne y Sparks, 1968; 1969; Ruddell, 1971). La primera de ellas consiste en una migración de los hemocitos hasta el lugar de la herida (Lauckner, 1983; Fisher, 1986). En la segunda se lleva a cabo la formación de un tapón tras la agregación hemocitaria; en la tercera de las etapas se reemplaza el tejido dañado mediante el traslado de los hemocitos desde el interior de la lesión hacia el sitio de la herida; en cuarto lugar se produce una deposición de colágeno por parte de los fibroblastos (Ruddell, 1971), en quinto lugar se eliminan los restos celulares mediante la acción fagocítica de los granulocitos y ya finalmente, en una sexta etapa se reestructura la arquitectura tisular (Ratcliffe *et al.*, 1985; Fisher, 1986; Sparks y Morado, 1988).

Luna-González *et al.* (2002) estudiaron la actividad fenoloxidasa en homogeneizados de larvas y juveniles y en el plasma y los hemocitos de adultos *C. gigas*, *A. ventricosus*, *N. subnososus* y *A. Maura*. Las muestras se utilizaron para determinar la presencia de actividad de fenoloxidasa por incubación con el sustrato

dihidroxifenilalanina usando tripsina y dodecil sulfato de sodio para obtener la activación de sistema profenoloxidasas. La actividad de la fenoloxidasa no se detectó en el homogeneizado de larvas. En el homogeneizado de juveniles, se encontró actividad de fenoloxidasa sólo en *C. gigas* y *N. subnodosus*. La actividad de la fenoloxidasa estuvo presente en las muestras de adultos y se ve reforzada por elicitores en el plasma de todas las especies estudiadas, pero en el sobrenadante lisado de hemocitos tan sólo estuvo presente en *N. subnodosus*.

Luna-González *et al.* (2003) mencionan que todas las enzimas hidrolíticas incluidas en el kit API ZYM (fosfatasas, esterases, lipasas, proteasas, glicosidasas) tuvieron actividad en muestras de *C. gigas*. Las enzimas con mayor actividad (esterasa, leucina arilamidasa y naftol fosfohidrolasa) se encontraron en el sobrenadante lisado de hemocitos.

Luna-González *et al.* (2008) evaluaron el impacto de los parámetros ambientales y el seston, material diminuto que flota y nada en el interior de las masas de agua (plancton y tripton), en la fisiología y sistema inmune de *Crassostrea gigas* cultivado en canastas tipo Nestier. El seston mostró patrones diferentes durante todo el ciclo. El índice de condición mostró una correlación positiva con el contenido de proteína en el SLH. El contenido de proteínas y la temperatura mostraron una correlación negativa. Se detectaron once enzimas hidrolíticas en las muestras y una mayor actividad enzimática de la leucina arilamidasa y esterasa. La leucina arilamidasa y la actividad de la lisozima mostró una correlación positiva con la temperatura. Los ostiones mostraron valores bajos en el contenido de proteína de la hemolinfa en verano-otoño, cuando se observó la mayor mortalidad en el sistema de

cultivo. Este hallazgo sugiere que estos ostiones estresados no tienen energía suficiente para invertir en su sistema inmunológico.

Ramírez-Castillo *et al.* (2011) evaluaron la respuesta inmune de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, retada con *Vibrio alginolyticus* cepa APSA2, mediante la caracterización de la actividad de enzimas lisosomales y el número y tamaño de los hemocitos. Las muestras se obtuvieron en forma de sobrenadante lisado de hemocitos (SLH) y el plasma, después de 6 y 24 horas, y 3, 6, y 10 días después del reto. Entre tiempos de muestreo, se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática determinada mediante la técnica colorimétrica. La actividad enzimática fue significativamente mayor en SLH que en el plasma. Además, se detectaron más enzimas en SLH en comparación con plasma. Las enzimas con mayor actividad fueron leucina arilamidasa y esterasa, tanto en SLH y plasma. La actividad de la lisozima no mostró diferencias significativas entre los tiempos de muestreo. Sin embargo, en plasma la actividad de la lisozima fue significativamente mayor que en SLH, lo que sugiere que la lisozima fue liberada de hemocitos en el plasma como una primera respuesta al reto. Se encontró una correlación significativa negativa entre la concentración de proteínas en el plasma y en SLH. Los resultados confirman que los hemocitos y enzimas lisosomales son dos de los mecanismos que esta especie tiene para luchar contra los ataques bacterianos.

Song *et al.* (2006) en su trabajo con *A. irradians* encontró que HSP70 podría desempeñar un papel importante en la mediación del estrés ambiental y la respuesta inmune en pectínidos.

Probióticos, prebióticos y ácido fúlvico

Las bacterias benéficas o antagonistas de patógenos bacterianos pueden cumplir una función importante como probióticos en cultivos de moluscos al ejercer una actividad inhibidora de patógenos y/o mejorar la condición nutricional de las especies en cultivo (Riquelme *et al.*, 1997; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2011). En Chile, se ha desarrollado un gran número de estudios con el objetivo de aislar y caracterizar cepas bacterianas que presenten propiedades inhibitorias y que puedan constituirse en buenos candidatos como agentes probióticos para ser utilizados en cultivos de moluscos. La mayoría de las investigaciones sobre el uso de agentes probióticos en cultivos de moluscos en Chile se ha circunscrito al cultivo de *A. purpuratus* (Jorquera *et al.*, 1999; Riquelme *et al.*, 1996a, 2000; Leyton y Riquelme, 2008b). Estos estudios han sugerido el reemplazo de la administración de terapias antimicrobianas por el uso de bacterias probióticas para el control de patógenos bacterianos en el cultivo del ostión del norte, no obstante, éstos sólo se han ensayado en cultivos experimentales a pequeña escala (Riquelme *et al.*, 1997; Avendaño y Riquelme, 1999).

Aguilar-Macías *et al.* (2010) probaron el uso de una cepa de *Lactobacillus* sp., *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura marina *Yarrowia lipolytica* en el cultivo de juveniles de *Pinctada mazatlanica*. Los autores encontraron que, al administrar los microorganismos, se presentó una mayor supervivencia y crecimiento a diferencia del grupo control no tratado con ningún aditivo probiótico, de un grupo tratado con antibiótico y uno más tratado con un probiótico comercial. El mayor crecimiento y supervivencia lo encontraron al administrar la cepa de *Lactobacillus* sp.

Campa-Córdova *et al.* (2011) probaron el potencial probiótico de una bacteria ácido láctica y una mezcla de bacilos en la supervivencia y crecimiento larvario de *C. corteziensis*, encontrando mayor supervivencia con la mezcla de bacilos que con la bacteria ácido láctica, y que ambos tratamientos fueron mejores que los obtenidos en el grupo control, al cual no se le administró ningún probiótico.

Aguirre-Rodríguez *et al.* (2011) mencionan que el uso de probióticos en los últimos años se debe a su aplicación como medicina preventiva y en el ámbito agrícola y acuático se ha buscado reducir el uso de antibióticos promotores de crecimiento (APCs), mejorar la alimentación de los animales y evitar las enfermedades causadas por patógenos entéricos. Se identificaron un total de 60 microorganismos mediante pruebas bioquímicas usando baterías API (Biomerieux) obteniendo bacterias acidolácticas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. paracasei* ssp. *paracasei* y *L. brevis*) y bacilos esporulados (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*). Además, se identificaron levaduras sin reportes bibliográficos en cuanto a probiosis como *Geotrichum* sp., *Kloeckera* sp., *Cryptococcus terreus* y varias especies de *Candida*.

Aguirre-Guzmán *et al.* (2012) mencionan que la producción de organismos acuáticos para consumo humano ha disminuido mientras que la demanda ha incrementado. La disminución de los productos pesqueros procedentes de la pesca ha sido compensada en parte por la industria de la acuicultura. La necesidad de una mayor resistencia a enfermedades, la eficiencia de alimentación, el crecimiento y reducir los costos de producción de los organismos cultivados es sustancial para los diversos sectores de esta industria. Diferentes productos se han utilizado en cierta

medida para prevenir enfermedades y como promotores del crecimiento; sin embargo, su aplicación inadecuada puede crear trastornos adversos, los desequilibrios ambientales y aumentar la predisposición a la enfermedad. En la búsqueda de nuevas opciones de control y prevención de enfermedades, se han llevado a cabo varios estudios para poner a prueba algunos aditivos funcionales (probióticos). Se ha demostrado que los probióticos mejoran el gasto de energía derivada de fuentes tales como carbohidratos y aumentan la incorporación de proteínas para el crecimiento, aumentan la inmunidad y la resistencia a las enfermedades del huésped. El uso de probióticos en la acuicultura tiene un alto potencial; sin embargo se han mal caracterizado y estudiado.

Sánchez-Ortiz *et al.* (2015) aislaron, caracterizaron y evaluaron *in vitro* e *in vivo* bacterias obtenidas del tracto digestivo de la almeja Pata de Mula *Anadara tuberculosa*, a fin de determinar su potencial probiótico. Se evaluaron *in vitro* 151 cepas, determinando actividad hemolítica, hidrofobicidad, tolerancia a nitrógeno amoniacal, salinidad y pH, cinética de crecimiento, actividad enzimática extracelular, autoagregación y coagregación. Las cepas GAtB1, MAt32 y MAt42 se evaluaron en ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea*. Se registró un mayor crecimiento en los grupos adicionados con bacterias y menor mortalidad ante un reto con *V. parahaemolyticus*. Se comprobó la adhesión de dichas cepas al epitelio de *C. sikamea*, mediante microscopía de fluorescencia. Las bacterias aisladas de *A. tuberculosa* tuvieron un efecto benéfico sobre el crecimiento y respuesta inmune de *C. sikamea*, lo que sugiere que tienen potencial probiótico para su aplicación en la acuicultura de organismos marinos.

Gutiérrez-Dagnino *et al.* (2015) estudió el efecto del prebiótico inulina y ácido fúlvico, adicionados en el alimento, sobre el crecimiento, supervivencia, prevalencia de WSSV y sistema inmune de *L. vannamei*, encontrando que los aditivos no afectan negativamente el crecimiento y protegen al camarón contra WSSV en organismos infectados con una carga viral relativamente alta. No se observó efecto de los aditivos en los efectores del sistema inmune estudiados a nivel bioquímico pero si modularon la expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmune en *L. vannamei*.

Luna-González *et al.* (2012) determinaron el efecto de la inulina (a concentraciones de 0, 1.25, 2.5, 5.0 y 10 g/kg de alimento) en el crecimiento, supervivencia, las bacterias ácido lácticas (BAL) en el intestino, la prevalencia del WSSV y la respuesta inmune de *L. vannamei*, cultivado en condiciones de laboratorio. El alimento suplementado con inulina *no* mejoró el crecimiento, la supervivencia ni se observó un efecto en las BAL en *L. vannamei*. Sin embargo, la inulina a concentraciones de 2.5 y 5 g/kg en alimento disminuyó la prevalencia del WSSV (16.6 y 16 %, respectivamente) en camarones infectados con baja carga viral, en comparación con el grupo control (58 %). Además, la inulina incrementó significativamente la actividad de fenoloxidasa en hemocitos (profenoloxidasa) y plasma, lo que indica que tuvo un efecto inmunoestimulante en *L. vannamei*.

Expresión génica

Schutz y Adema (2017) realizaron un trabajo sobre comparación inmunogenética en moluscos y mencionan que este tipo de estudios proporcionó las primeras descripciones de la fagocitosis como mecanismo general inmunitario.

Mencionan que NGS es una herramienta poderosa para la inmunología comparativa, especialmente para aumentar la cobertura de la extensa diversidad de moluscos. Hasta la fecha, la inmunogenética reveló nuevos niveles de complejidad de la defensa de moluscos al indicar la heterogeneidad de secuencias en caracoles y bivalvos, y los miembros de familias de genes inmunes expandidos que se expresan de manera diferencial para generar respuestas de defensa específicas de patógenos. Esfuerzos genómicos a gran escala, destinados a obtener una alta cobertura genómica y estricto ensamblaje del genoma computacional con disponibilidad de datos transcriptómicos para la validación de los modelos genéticos predichos ha llevado a la caracterización de los genomas completos de: un bivalvo (*Crassostrea gigas*) un cefalópodo (*Octopus bimaculoides*) y tres gasterópodos (*Biomphalaria glabrata*, *Aplysia californica* y *Lottia gigantea*).

Meng *et al.* (2013) realizaron una extensa base de datos del perfil transcriptómico de la almeja japonesa *Mizuhopecten yessoensis*, tras exposición a cadmio, en la plataforma de secuenciación Illumina. RNA-seq produjo alrededor de 112 millones de lecturas de secuenciación de los tejidos de la almeja japonesa adulta. Estas lecturas se ensamblaron en 194,839 secuencias no redundantes con marco de lectura abierto (ORF), de las cuales 14,240 aminoácidos putativos correspondieron a secuencias de función biológica y se anotaron con ontología genética con los términos de grupos ortólogos en eucariotas. Además, identificaron 720 genes involucrados en la respuesta a estímulos y 302 genes involucrados en respuesta inmune.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de moluscos marinos en México representa una alternativa para suplir la demanda de productos que se obtienen por la actividad pesquera. En México existen 54 especies de moluscos con potencial para ser cultivados. La almeja Catarina *A. ventricosus* es aprovechada en la explotación comercial mediante actividades pesqueras y acuícolas a cargo de cooperativistas y permisionarios de Sinaloa y otros estados, es una especie sobreexplotada y se sabe que su principal problema es la incidencia de enfermedades en laboratorios de larvas. Por otro lado, se ha reportado que las condiciones ambientales que imperan en cada sistema lagunar y en los cultivos, en campo y laboratorio, pueden tener influencia sobre el crecimiento, la supervivencia y respuesta inmune de las poblaciones de almeja Catarina. Por lo tanto, se pretende estudiar la variación en el crecimiento, condición fisiológica y respuesta inmune de *A. ventricosus* en cultivos en el laboratorio, donde serán alimentados adicionando productos naturales y retados con *V. parahaemolyticus*. Lo anterior tiene como finalidad fortalecer la investigación sobre el cultivo de la especie para su explotación con fines comerciales y de repoblamiento.

HIPÓTESIS

Las condiciones ambientales del cultivo en el laboratorio, la adición de productos naturales en el agua (probióticos, inulina y ácido fúlvico) y la infección con *V. parahaemolyticus* influyen en el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de *A. ventricosus*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune de *A. ventricosus* cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la susceptibilidad de *A. ventricosus* a *V. parahaemolyticus*.
- 2) Analizar el crecimiento de *A. ventricosus*, tratada con productos naturales, en un cultivo en el laboratorio.
- 3) Determinar la supervivencia de *A. ventricosus*, cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*.
- 4) Evaluar la respuesta inmune, a nivel bioquímico, de *A. ventricosus* inyectada con *V. parahaemolyticus* en un cultivo en el laboratorio.
- 5) Evaluar la respuesta inmune, a nivel genético, de *A. ventricosus* tratada con bacilos en un cultivo en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de cultivo en el medio natural

El área de cultivo de almeja catarina (que sirvió de stock para los trabajos en el laboratorio) se localiza en el estero La Pitahaya, Laguna Macapule (Fig. 4). La laguna tiene una extensión aproximada de 48 km², es somera y en su cuerpo interior se encuentran tres islas (Escobedo-Urias *et al.*, 2003).

El clima de acuerdo a la clasificación de Koppen (1900) modificada por García (1973), es de tipo semi-seco muy cálido y seco muy cálido. El promedio de

precipitación anual es de 365 a 450 mm. La temperatura ambiental promedio es de 18 °C (García, 1973).

La laguna cuenta con apreciable riqueza en cuanto a recursos pesqueros, destacándose el camarón *L. vannamei*, *L. stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *P. brevisrostris*. También se captura jaiba (*Callinectes* spp.), almeja pata de mula (*Anadara* sp.), pez sierra (*Scomberomorus sierra*), lisa (*Mugil* spp.), botete (*Sphoeroides annulatus*) y pargo (*Lutjanus* spp.) (Instituto Nacional de Pesca, 2000).

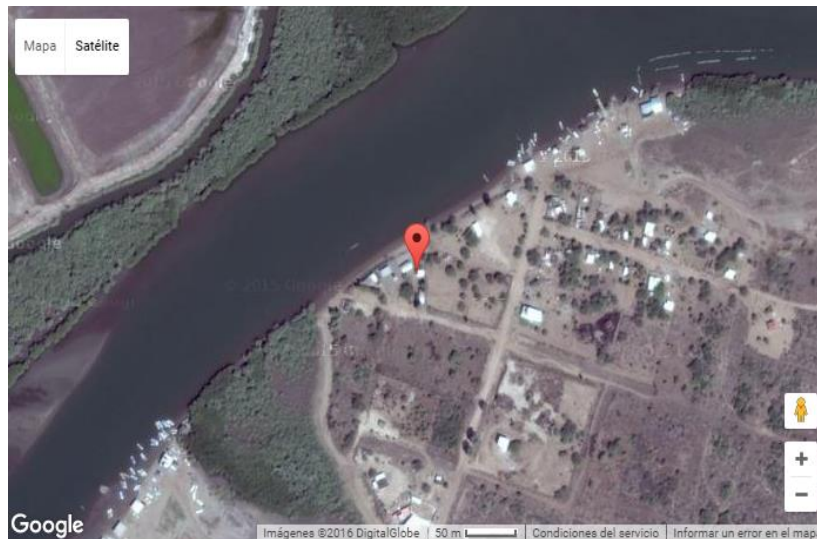


Figura 4. Imagen satelital del estero la Pitahaya, Guasave, Sinaloa.

Diseño experimental

Se obtuvieron 2400 semillas de *A. ventricosus* de 0.5 cm de largo, producidas en el Laboratorio Acuicultura Robles S. A de C. V. (La Paz, B.C.S.), las cuales se sembraron en el estero La Pitahaya. Los organismos se colocaron en un Rotoplast® de 250 L con 100 L de agua del sitio de cultivo y se colocó aireación

periódicamente para después ser transportados al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del Departamento de Acuicultura en CIIDIR- IPN, Sinaloa. Aunque los organismos tenían un certificado de libre de patógenos, se aclimataron y depuraron por 10 días colocándolos en tinas de plástico (1000 L) previamente montadas con agua filtrada a 30 ups y aireación constante. Las almejas adultas se recolectaron por buceo en El Caracol (Guasave, Sinaloa, México) (108 ° 74'W 25 ° 49'N) y se transportaron en tanques de plástico de 250 L que contenían agua de mar y aireación constante a las instalaciones del laboratorio. En el laboratorio, los organismos se aclimataron durante 3 días colocándolos en 2 tinas de plástico (1000 L) con agua de mar filtrada (20 µm) a 30 ups y bajo aeración constante. Las almejas se alimentaron con un concentrado de microalgas Shellfish Diet 1800[®] (Reed Mariculture Inc., Campbell, CA, USA) compuesto por *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*. Se hizo limpieza y recambios de agua. En los bioensayos se empleó agua de mar (30 ups). Posteriormente se puso aeración con piedras difusoras por 24 h para eliminar el cloro presente por volatilización. El agua se preparó en un tinaco con agua hipersalina filtrada con una malla de algodón de 20 µm y se ajustó la salinidad con agua dulce libre de cloro. Para los cultivos se utilizaron tinas de plástico (120 L de capacidad) con 80 L de agua a 30 ups. Se colocaron mangueras y piedras difusoras previamente lavadas en una solución diluida de ácido muriático. Durante los bioensayos se registraron las variables fisicoquímicas del agua: temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto. Además, los organismos estuvieron sujetos a fotoperiodo natural.

Objetivo 1. Determinar la susceptibilidad de *A. ventricosus* a *V. parahaemolyticus* y su concentración letal media

Concentración letal media

Se realizaron dos bioensayos, uno para semillas (altura: 5.3 ± 1.1 mm) y el otro para almejas adultas (altura: 4.3 ± 0.57 cm), tuvieron una duración de 5 y 12 d respectivamente, usando peceras de vidrio (4 L) para las semillas y tinas de plástico (60 L) para adultas, con agua de mar filtrada ($20 \mu\text{m}$) a 30 ups y aeración constante. Se colocaron 10 organismos (semillas o adultos) por tanque y se alimentaron con el concentrado de microalgas, Shellfish Diet 1800[®]. Las almejas se retaron con *V. parahaemolyticus* (en solución salina al 3 % de NaCl) a diferentes concentraciones, inoculándolas en el agua de las peceras. Tratamientos: I) Control, sin vibrio; II) *V. parahaemolyticus* (1×10^2 UFC/mL); III) *V. parahaemolyticus* (1×10^3 UFC/mL); IV) *V. parahaemolyticus* (1×10^4 UFC/mL); V) *V. parahaemolyticus* (1×10^5 UFC/mL). Durante cada bioensayo se registró la mortalidad y al final del mismo, la supervivencia (Fig. 5).



Figura 5. Bioensayo para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de *V. parahaemolyticus* en *A. ventricosus*.

Determinación de la CL₅₀

A partir de los resultados de los bioensayos anteriores se determinó la concentración de *V. parahaemolyticus* a la cual el 50 % de los organismos bajo reto mueren (CL₅₀) y con la que se trabajó en la segunda parte con los aditivos y la alimentación en retos experimentales.

El cálculo de la CL₅₀ se realizó mediante el análisis Probit (Finney, 1952), el cual es un tipo de regresión utilizada para variables con respuestas binomiales, siendo su principal uso la determinación de la CL₅₀. Para determinar la CL₅₀, se utilizó el paquete estadístico StatPlus Pro 5.9.8.

Análisis histológico

Se utilizaron dos grupos de almejas, uno del control (4 almejas) y otro de las que se retaron (4 almejas) con *V. parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL) por inmersión. Todas las almejas retadas estaban moribundas a las 24 h y se retiraron para análisis histológico. Las muestras de tejido (glándula digestiva, gónada, manto y músculo) se fijaron previamente en formaldehído al 10 %, neutralizado con fosfato sódico dibásico (2 g/L) y fosfato sódico monobásico (4 g/L) y procesadas de acuerdo a las técnicas histológicas de Howard y Smith (1983). Los tejidos se deshidrataron en alcoholes de concentración ascendente (50 a 100 %) y parafina (Paraplast-TX[®]) incrustados. Las muestras se seccionaron a 4 µm en un microtomo rotatorio (Leica RM 2155). Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina y eosina (Humason, 1979). Las láminas se observaron con un microscopio compuesto (Olympus BX50) y los campos visuales (ampliaciones 10 x, 20 x y 40 x) se digitalizaron con una cámara digital

(Nikon DS-Ri1) y las imágenes se procesaron con Image Pro Premier® (Versión 9.0, Media Cybernetics, USA).

Objetivo 2. Analizar el crecimiento de *A. ventricosus*, tratada con productos naturales, en un cultivo en el laboratorio

El bioensayo tuvo una duración de 20 d y se utilizaron semillas de 0.4-0.8 cm de largo. En cada tina se colocaron 35 semillas. Se evaluó el efecto de los aditivos naturales y una mezcla de probióticos de almeja catarina (MPAC, 1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). El bioensayo consistió de cuatro tratamientos, cada uno por triplicado: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). Las semillas se alimentaron todos los días con un concentrado de microalgas (*Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*). Los probióticos consistieron de *Bacillus licheniformis* BCR4-3 (3.3×10^5 UFC/L), *Bacillus licheniformis* IPNGS5 (3.3×10^5 UFC/L) y *Bacillus pumilis* IPNGS4 (3.3×10^5 UFC/L). Se determinó la tasa de crecimiento específico la cual es un cálculo matemático que se obtiene de la diferencia entre dos valores en el tiempo tomando como referencia el porcentaje del primer valor. La limpieza de heces se realizó diariamente mediante sifoneo. Los probióticos se inocularon en el agua cada tres días, después de la limpieza y recambio de agua (50 %). La inulina y ácido fúlvico se inocularon en el agua de igual manera, cada tres días. Se registró semanalmente la talla (altura, longitud, grosor de las valvas) y peso total del organismo. Además, se realizó un análisis microbiológico del organismo completo al inicio y al final del bioensayo. Se realizó un conteo de bacterias totales (medio

tripticosa de soya), bacilos totales (medio tripticasa de soya) y vibrios totales (medio TCBS). También se realizó análisis del agua al inicio y al final del bioensayo, al inicio para verificar que esté libre de vibrios totales y al final para comprobar que los probióticos estén en el agua.

La muestra de 3 almejas por tina (9 por tratamiento) se maceró en 500 μ L de solución salina (NaCl 3 %) con un pistilo de plástico estéril. Para el conteo de los bacilos se calentó la muestra a 80 °C durante 10 min. El homogenizado se sembró (50 μ L) en placas de Petri con el medio respectivo. El conteo se hizo por el método de diluciones seriadas decimales, sembrando por estría cruzada dos placas por cada dilución.

Objetivo 3. Determinar la supervivencia de A. ventricosus, cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con V. parahaemolyticus

Las almejas (0.4-1 cm) se obtuvieron del sistema de cultivo en el estero La Pitahaya. El bioensayo duró 19 d y se evaluó el efecto de AN (**AN** = *B. licheniformis* (7×10^5 UFC/L), *Leuconostoc mesenteroides* (1.5×10^5 UFC/L), *Pediococcus pentosaceus* Lta2 (1.5×10^5 UFC/L), inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) en el agua para el tratamiento de la infección producida por *Vibrio*. Los probióticos crecieron en su respectivo medio por 24 h. Las peceras se limpiaron cada 3 días por sifoneo y se recambió el 50 % del agua de cada pecera, por lo tanto, los probióticos se aplicaron después del proceso mencionado. En cada pecera se colocaron 10 organismos. Durante los primeros 12 días los animales se alimentaron con el concentrado de microalgas, cada tres días se inoculó en el agua la mezcla de probióticos y en el día 13 se retaron inoculando *Vibrio* en el agua con la CL_{50}

obtenida previamente. Los tratamientos, por triplicado, quedaron de la siguiente manera: I) control 1, microalgas; II) control 2, microalgas + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀= 623 UFC/mL); III) microalgas + AN c/3 días + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀= 623 UFC/mL).

Objetivo 4. Evaluar la respuesta inmune, a nivel bioquímico, de A. ventricosus inyectada con V. parahaemolyticus en un cultivo en el laboratorio

Se realizó un bioensayo de 72 h en el cual se evaluó el efecto de la inyección de *V. parahaemolyticus* inactivada. El sistema de cultivo constó de una tina de 130 L con 120 L de agua de mar filtrada (20 µm) y aeración constante. La alimentación se hizo como en el bioensayo 1. En la tina se colocaron 28 organismos (altura: 4.4 ± 0.51 cm). Los animales se retaron inyectando 100 µL en el músculo aductor con una concentración de 1.5 × 10⁶ células bacterianas muertas en solución salina (NaCl al 2.5 %). Las bacterias se inactivaron por calor a 60 °C por 10 min. La limpieza se hizo diario por sifoneo y el agua desechada se recuperó inmediatamente. Durante el bioensayo se registraron las variables fisicoquímicas del agua: temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto. Además, los organismos estuvieron sujetos a fotoperiodo natural. Se extrajo la hemolinfa de 4 almejas vivas por tiempo (0, 8, 24, 48 y 72 h) para el análisis del sistema inmune. El tiempo cero consistió de muestras de hemolinfa de almejas antes del reto con el vibrio. Se contaron y midieron los hemocitos y se determinó la actividad de la fenoloxidasa y enzimas hidrolíticas lisosomales. Por último, se determinó la proteína total con el método de Bradford (1976), usando albumina del suero de bovino para la curva estándar.

Para el análisis transcriptómico de la almeja Catarina, con énfasis en el sistema inmune, se tomaron cuatro almejas a las 24 h para su envío a secuenciación masiva (RNA-SEQ).

Respuesta inmune a nivel bioquímico

Extracción de hemolinfa

Se colectó 1 mL de hemolinfa de almejas, utilizando una jeringa de plástico de 1 ml (27 G x 13 mm), del músculo aductor. Las muestras de hemolinfa se almacenaron individualmente en tubos Eppendorf pre-enfriados en hielo para ser usados inmediatamente.

Cuantificación y medición de hemocitos

La muestra de hemolinfa se diluyó 1:3 (50 μ L:150 μ L) en una solución de formalina al 6 % (Luna-González *et al.*, 2004) para prevenir la aglutinación de hemocitos. Los hemocitos se contaron en una cámara de Neubauer y se midieron a partir de fotografías digitales. Cincuenta hemocitos de cada muestra se midieron utilizando el software Sigma Scan Pro (V 5.0). El contorno de cada hemocito se extrajo manualmente y se midieron las longitudes de los ejes mayor y menor. El diámetro de los hemocitos se calculó como la longitud media de ambos ejes (Ramírez-Castillo *et al.*, 2011), luego se midió el diámetro para calcular el área de hemocitos.

Muestras de hemolinfa

Las muestras de hemolinfa retiradas se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación. El lisado de hemolinfa (LH) se obtuvo por centrifugación de las muestras en una centrífuga refrigerada a 15,000 g durante 30

min. El sedimento de desechos celulares se descartó y después se colocó el LH en tubos Eppendorf previamente enfriados para ser usados inmediatamente.

Determinación de la actividad de la fenoloxidasa

La medición de la actividad de la FO (fenoloxidasa) se realizó con la técnica descrita por Hernández-López *et al.* (1996), modificada por Huang *et al.* (2010). La actividad de la FO presente en la hemolinfa se cuantificó espectrofotométricamente por la formación de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). A 50 μ L de muestra, se le adicionaron 50 μ L de búfer Tris-HCl y 50 μ L de L-DOPA (5 mM) y se incubó durante 70 min a 35 °C y posteriormente se determinó la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro lector de microplacas. La actividad de la FO total en la muestra se calculó a partir de las absorbancias obtenidas

Determinación de las enzimas hidrolíticas lisosomales

La actividad de 19 enzimas hidrolíticas lisosomales en LH se determinó con el kit API ZYM (Biomerieux), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un pool por hora tiempo de muestreo a partir de la hemolinfa de cinco almejas. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 4 h (Carballal *et al.*, 1997; López *et al.*, 1997; Luna-González *et al.*, 2002, 2004). Se añadieron 65 μ L de la muestra a cada pocillo (incluyendo el pocillo de control) seguido de incubación a 35 °C durante 4 h. Después, y una vez que las tiras alcanzaron la temperatura ambiente, se añadieron los reactivos del kit A y B y se tomaron lecturas después de 5-10 min bajo iluminación natural. La intensidad de la reacción se evaluó basándose en la escala de color proporcionada por el fabricante y se transformó en nanomoles de sustrato hidrolizado. La actividad enzimática se expresó en unidades que representaban la

cantidad de sustrato hidrolizado en nanomoles por miligramo (nM/mg) de proteína en la muestra.

Detección de la actividad de la lisozima

Se usaron placas de agarosa para detectar la actividad de lisozima en LH. Se preparó una suspensión bacteriana con 4 mg/mL de liofilizado de *Micrococcus luteus* (Sigma). Se preparó una solución de agarosa al 1 % con buffer Tris-HCl (50 mM, pH 5.2) y se enfrió a 40 °C. Se mezcló un mililitro de la suspensión bacteriana con 14 ml de agarosa y se vertió en placas de Petri (90 mm de diámetro, 15 mm de profundidad). Una vez que la agarosa se había solidificado, se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro en el sustrato. Se usó saliva humana, diluida a 1: 9 en una solución de NaCl al 0.1 %, como control positivo. Como control negativo se usó buffer. Los pocillos se llenaron con 30 µL de LH y controles (positivos y negativos). Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente, se midió el diámetro de la zona clara alrededor de los pocillos. El diámetro de cada zona clara se obtuvo midiendo el diámetro total menos el diámetro del pocillo (6 mm). Los resultados se expresaron en unidades (0.1 mm = 1 U) por miligramo de proteína (U mg/ proteína) (Canicatti, 1990; Luna-González *et al.*, 2004).

Determinación de la concentración de proteína en hemolinfa

La concentración de proteína en las muestras de LH se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) con seroalbúmina bovina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) para la curva estándar.

Objetivo 5. Evaluar la respuesta inmune, a nivel genético, de *A. ventricosus*, tratada con bacilos en un cultivo en el laboratorio

Secuenciación, análisis transcriptómico y expresión de genes

Para el análisis transcriptómico de la almeja Catarina, con énfasis en el sistema inmune, se tomaron cuatro almejas a las 24 h para su envío a secuenciación masiva (RNA-SEQ). Las 4 almejas inyectadas, del bioensayo de sistema inmune a nivel bioquímico, se disectaron para obtener la gonada, músculo, hepatopancreas, branquias. Los hemocitos se extrajeron con una jeringa de tuberculina y se separaron del plasma por centrifugación a 800 g por 10 min. Se hizo un pool de cada tejido con pequeños fragmentos y pellet de hemocitos de cada organismo, los cuales se colocaron en 500 µL de RNALater[®] (SIGMA) para la extracción de RNA en el Instituto de Biotecnología Genómica de la UNAM (IBT UNAM, Cuernavaca, Morelos).

En el IBT UNAM, se preparó una librería normalizada con un pool de ARN de los 5 tejidos (20 % de ARN de cada tejido) para la secuenciación del ARN con el kit Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo Research). La preparación de la biblioteca fue hecha con el kit TruSeq Stranded mRNA Sample Prep de Illumina y la secuenciación fue hecha utilizando el kit NextSeq 500/550 v2 de alto rendimiento en un equipo NextSeq 500. El primer control de calidad de las lecturas crudas arrojadas por el secuenciador se realizó con la herramienta FastQC, version 0.11.8 (parámetros predeterminados), en la plataforma Galaxy (Andrews, 2010). Las lecturas obtenidas se analizaron con el software Trimmomatic versión 0.36 (Calidad media requerida = 20), en la plataforma Galaxy (Bolger *et al.*, 2014), para eliminar secuencias cortas, bases con baja calidad y adaptadores. Por defecto, se eliminaron las secuencias de

menos de 60 pb, el umbral de longitud mínima para conservar secuencias fue de 60, no se filtraron las secuencias muy grandes, se filtraron las secuencias según el nivel de calidad, se filtraron las secuencias en función de su puntuación media, se filtraron las secuencias basadas en una puntuación media demasiado pequeña (<15), el umbral mínimo de puntuación media para conservar secuencias fue de 15, se filtraron las secuencias en función de su contenido bases (<2 %), secuencias con más del 2 % de bases N se removieron, por defecto, se realizó un recorte en la parte terminal 3' con base en una puntuación de 20, por defecto, no se realizó un recorte en la parte terminal 5', el tipo de cálculo de puntaje de calidad a utilizar fue "el mínimo", la regla a usar para comparar el puntaje de calidad con el valor calculado (menos que) y tamaño de la ventana deslizante utilizada para calcular el nivel de calidad por tipo fue de 1. Las lecturas obtenidos en Trimmomatic se sometieron a otro análisis de calidad con Prinseq versión 1.20.4 en la plataforma Galaxy (Schmieder y Edwards, 2011) para filtrar basándose en la longitud de las secuencias, la puntuación de calidad y el contenido de bases. Prinseq elimina partes de secuencias recortandolas en la parte terminal, en colas (poly-A/T, poly-N) y con base en la puntuación de calidad. Las lecturas obtenidas con Prinseq se ensamblaron *de novo* con el software Trinity versión 2.2.0, en la plataforma Galaxy (Grabherr *et al.*, 2011; Hass *et al.*, 2013), con parámetros predeterminados como normalización in silico de las lecturas, longitud mínima de contigs (200 pb) y conteo mínimo para K-mers a ensamblar = 1.

Las lecturas obtenidas con Prinseq se mapearon (alinearon) contra los contigs obtenidos en el ensamblaje (como genoma de referencia) utilizando Bowtie2 versión 2.3.4.1 en la plataforma Galaxy (Langmead *et al.*, 2009; Langmead *et al.*,

2012). Las lecturas no alineadas fueron aquellas que corresponden a rRNA (contaminación durante el proceso de elaboración de la librería de cDNA). Las lecturas alineadas con Bowtie2 se ensamblaron de nuevo con Trinity para obtener los contigs que derivan de mRNA y se hizo un análisis de calidad de las secuencias ensambladas con Quast v4.1 en la plataforma Galaxy (Gurevich *et al.*, 2016) con las siguientes especificaciones: tipo de ensamblaje (genoma), no se usó genoma de referencia, tipo de organismo (eucariota), umbral inferior para una longitud de contig (500 pb) Quast analiza la longitud de los contigs, el contenido de GC (%), N50, N75, L50, L75 y el número de N's por 100 kpb, entre otros análisis.

Por medio del servidor web FunctionAnnotator, se hizo una búsqueda de similitud de los contigs obtenidos en el ensamblaje contra la base de datos de proteínas del NCBI-nr para identificar secuencias similares, con las cuales se hizo un mapeo contra la base de datos de taxonomía del NCBI (distribución filogenética) y con los términos de ontología de genes (Blast2GO, anotación funcional) (Chen *et al.*, 2017). Se realizó BLAST con las secuencias anotadas como genes del sistema inmune o defensa contra las bases de datos contenidas en nr-aa (GenBank, UniProt, RefSeq and PDBSTR) usando BLASTX (nucleótidos vs bases de datos de proteínas) con un valor E de $1e^{-4}$ (<http://www.genome.jp/tools/blast/>).

Se realizó una anotación con la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) que compara genomas en cuanto a su capacidad para codificar diferentes rutas metabólicas. Con esta anotación se pueden obtener mapas metabólicos e identificar qué enzimas están presuntamente codificadas por un genoma en concreto. También se pueden

identificar clusteres de genes (o grupos de genes consecutivos) conservados entre dos especies (Kanehisa *et al.*, 2010).

Se mandaron a diseñar 21 pares de primers, 6 de genes de referencia y 15 relacionados con el sistema inmune en Sigma-Genosys. Los oligos se probaron en semillas de almeja Catarina y almejas adultas (pool de tejidos) por medio de la PCR de punto final en gradiente para ver si amplificaban el fragmento esperado y obtener la mejor temperatura media de alineamiento (Tabla 9).

Análisis de expresión génica

Se utilizaron los hemocitos guardados y tejidos. El ARN total se extrajo con TRIzol™ de acuerdo al protocolo del fabricante (Invitrogen) y fue guardado a -70 °C hasta su uso en la retrotranscripción. La concentración y pureza del ARN total se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un nanofotómetro (IMPLEN®). Posteriormente se trató el ARN con ADNsa (1 U/μL, Sigma®).

Se utilizó la transcriptasa reversa (Improm II, PROMEGA®) para sintetizar la primera hebra (ADNc) con el primer oligo dT20 a partir de 500 ng de ARN total a 42 °C por 60 min. El ADNc se resuspendió en 80 μL de agua ultrapura y se almacenó a -70 °C para su uso en las reacciones de PCR punto final y en tiempo real. La retrotranscripción se realizó en el equipo Bio-Rad T100™ Thermal Cycler con las siguientes condiciones de temperatura: 5 min a 25°C, 60 min a 42°C y 15 min a 70°C.

Las amplificaciones se realizaron en el equipo CFX96 Touch Real-Time System (Bio-rad®) y se utilizará el software CFX Manager versión 3.0 (Bio-Rad®) para la obtención de los datos.

Se estandarizó la cantidad de primers a utilizar para la cuantificación de la expresión relativa de cada gen. Se realizó un pool tomando 3 μL de cada una de las muestras (una almeja) de ADNc. Posteriormente se realizaron 5 diluciones seriadas (1:5, 100 μL de pool de ADNc/400 μL de agua ultrapura). Se determinó la eficiencia de la reacción construyendo para cada gen de interés una curva estándar a partir de los valores de ciclo umbral (C_q) de las diluciones seriadas (triplicado) y utilizando las condiciones de amplificación que más adelante se detallan. Se realizará un análisis de regresión lineal simple, se determinará el coeficiente de correlación (R^2) y a partir de los valores de la pendiente se calculó la eficiencia de reacción para cada gen de estudio. Para valores de eficiencia menores a 90 % se repitió el procedimiento de estandarización aumentando (de 0.7 a 1.0 μL) la cantidad de primers (10 μM c/u).

Para verificar la ausencia de dímeros de primers se realizó un análisis de la curva de disociación (Curva de Melting). Para ello se incrementó la temperatura de 65 a 95 $^{\circ}\text{C}$, con un aumento de 0.5 $^{\circ}\text{C}$ cada 5 s.

Para el análisis de expresión de genes en los tratamientos, las amplificaciones se llevaran a cabo por duplicado en placas de 96 pozos con un volumen de reacción final de 15 μL conteniendo 7.5 μL de PCR Master Mix 2x (3 μL de buffer de reacción 5x; 1.5 μL de MgCl_2 25 mM; 0.3 μL de dNTPs 10 mM; 0.75 μL de EvaGreen 20x, BIOTIUM; 0.15 μL de Go Taq; 1.8 μL de agua ultrapura), 0.7-1.0 μL de primers (sentido y contrasentido, 10 μM c/u, Sigma[®]), 1.5-1.8 μL de agua ultrapura y 5 μL de templado (ADNc).

La PCR punto final se realizó en el equipo BIORAD T100[™] Thermal Cycler, las condiciones fueron las siguientes: 3 min a 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 ciclos (20 s a 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s a

51.8 °C-55 °C, 2 min a 72 °C), 5 min a 72 °C y finalmente baja a 12°C hasta ser guardados los productos -20 °C para posteriormente realizar la electroforesis.

Las condiciones del termociclador para la qPCR fueron: desnaturalización a 95 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 10 s, 57-61°C (dependiendo el primer) por 15 s, 72 °C por 30 s y 79 °C por 5 s. Se incluyó un calibrador por triplicado (Ubiquinona) en cada placa de análisis de genes, como un factor de corrección de los valores de Cq de las muestras debido a pipeteo y variación de lectura de una corrida a otra.

El número de copias del gen diana y los valores de Cq se relacionaron inversamente, por lo que una muestra que contiene un mayor número de copias del gen diana tuvo un menor valor de Cq que el de una muestra con un menor número de copias del mismo gen. La eficiencia de la reacción de PCR fue determinada mediante el cálculo de una pendiente con cinco diluciones seriadas (factor de dilución 5 o 10) de un pool representativo de ADNc [$E = 10(-1/\text{slope})-1$]. La expresión de los genes diana se determinó en relación con algunos genes de referencia. Por lo tanto, se realizó un análisis de estabilidad, para encontrar los mejores genes, con algoritmos GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), utilizando la aplicación RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php>). La expresión de los genes diana se normalizó con ubiquinona.

Para calcular la expresión de los genes de interés, los valores de Cq se transformaron a cantidades relativas usando la ecuación $RQ_{ij} = E[(Cq_{\text{promedio}} - Cq_{(ij)})]$, donde E es la eficiencia específica del gen de interés y $[(Cq_{\text{mean}} - Cq_{(ij)})]$ es la diferencia absoluta entre el Cq de cada muestra y el Cq promedio en el conjunto de datos de cada gen de interés. La expresión relativa fue calculada

con la ecuación RQgen de interés/media geométrica de RQgenes de referencia (Vandesompele *et al.*, 2002; Hellemans *et al.*, 2007).

Se contó con seis aislados de bacterias formadoras de esporas (Tabla 2) obtenidos de semillas de almeja catarina (Escamilla-Montes *et al.*, datos no publicados).

Tabla 2. Bacilos usados como probióticos en el cultivo de la almeja Catarina (*A. ventricosus*).

Aislado	Especie
1	<i>Bacillus horikoshii</i>
2	<i>Bacillus aerius</i>
3	<i>Bacillus licheniformis</i>
4	<i>Bacillus subtilis</i>
5	<i>Bacillus pumillis</i>
6	<i>Bacillus sp.</i>

Efecto de la MPAC en el sistema inmune de *A. ventricosus*

El bioensayo tuvo una duración de 48 h y se usaron adultos de 4.0-5.0 cm de largo. Se colocaron 20 organismos en una tina con agua filtrada (20 µ) y se le aplicó aeración constante. Se evaluó el efecto de la adición única de la MPAC (1 x 10⁶ UFC/L). Las almejas se alimentaron todos los días con un concentrado de microalgas (*Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*). La limpieza de heces se hizo diariamente y se repuso el agua perdida. A las cero horas (antes de la inoculación del bacilo) y a las 48 h se tomaron 6 almejas, 12 en total y se extrajo la hemolinfa del músculo aductor de los organismos con una jeringa de insulina y ésta

se colocó en un tubo Eppendorf enfriado con hielo. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga refrigerada (Sigma) a 800 x g por 10 min y al pellet de hemocitos se le adicionaron 300 µL de RNALater para el análisis de la expresión de genes relacionados con el sistema inmune por medio de la RT-qPCR.

Análisis estadístico

Los resultados de supervivencia se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, previa transformación de los porcentajes de supervivencia por medio de $\sqrt{\%/100}$ para normalizar su distribución (Ostle, 1965).

Para comparar los datos obtenidos en cuanto a la supervivencia, microbiota intestinal, análisis bioquímico y expresión de genes del sistema inmune se llevó a cabo una prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (Bartlett). Posteriormente, se realizó un ANDEVA de una vía para detectar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$) y una prueba de Tukey (Prueba de Diferencia Significativa Honesta, DSH) para identificar la naturaleza de esas diferencias ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Objetivo 1. Determinar la susceptibilidad de *A. ventricosus* a *V. parahaemolyticus*

Los resultados mostraron que las semillas de *A. ventricosus* son susceptibles a la infección con *V. parahaemolyticus* con una concentración letal media de 623 UFC/mL (Fig. 6).

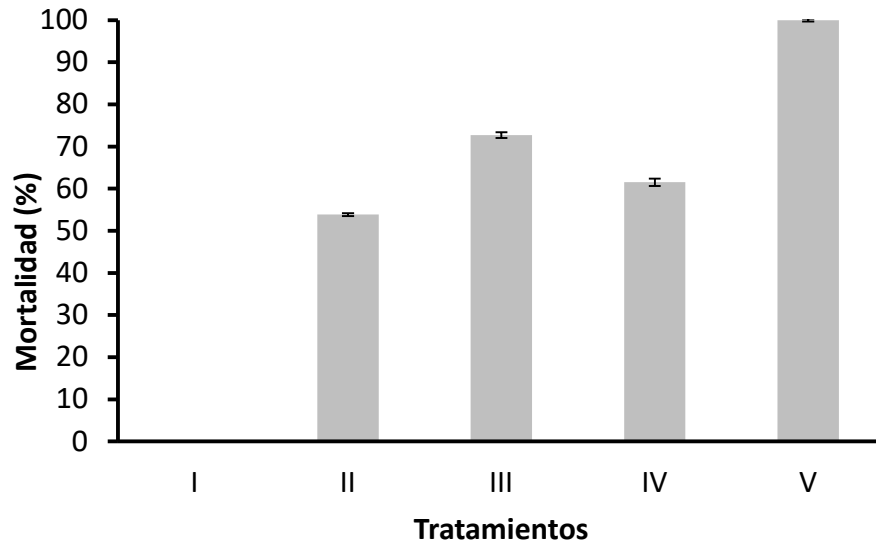


Figura 6. Mortalidad de semillas de *A. ventricosus* retada con diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus*. Tratamientos: I) Control, sin *V. parahaemolyticus*; II) *V. parahaemolyticus* (1×10^2 UFC/mL); III) *V. parahaemolyticus* (1×10^3 UFC/mL); IV) *V. parahaemolyticus* (1×10^4 UFC/mL); V) *V. parahaemolyticus* (1×10^5 UFC/mL). Columnas y barras indican la media \pm EE.

Los resultados mostraron que los adultos de *A. ventricosus* son susceptibles a la infección con *V. parahaemolyticus* con una concentración letal media de 62,853 UFC/mL (Fig. 7).

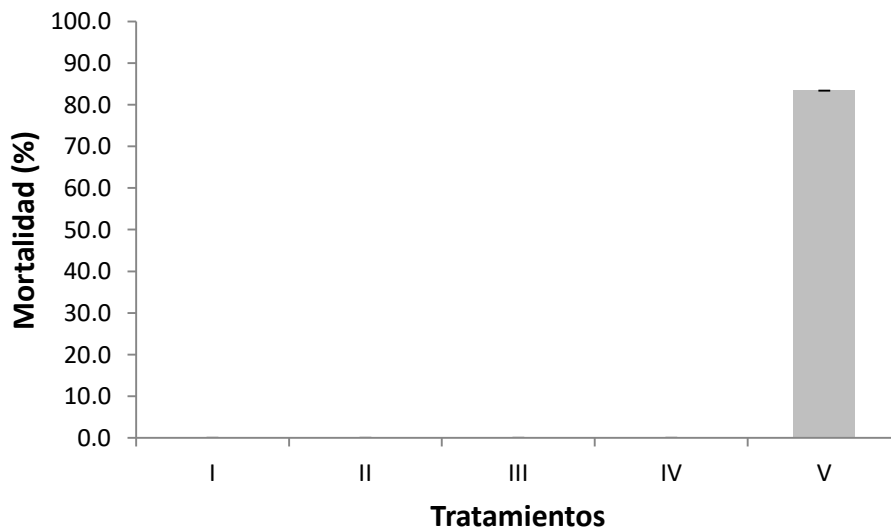


Figura 7. Mortalidad de *A. ventricosus* retada con diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus*. Tratamientos: I) Control, sin *V. parahaemolyticus*; II) *V. parahaemolyticus* (1×10^2 UFC/mL); III) *V. parahaemolyticus* (1×10^3 UFC/mL); IV) *V. parahaemolyticus* (1×10^4 UFC/mL); V) *V. parahaemolyticus* (1×10^5 UFC/mL). Columnas y barras indican la media \pm EE.

Análisis histológico

En la glándula digestiva de las almejas del grupo control, la morfología de los túbulos y conductos y la estructura celular del epitelio no cambió. En hepatopáncreas de las almejas infectadas, se modificó la morfología de los túbulos y conductos y se observó una descamación de las células digestivas de los túbulos y células ciliares de los conductos. Además, se dañó el tejido conectivo y se observó infiltración de hemocitos (Fig. 8).

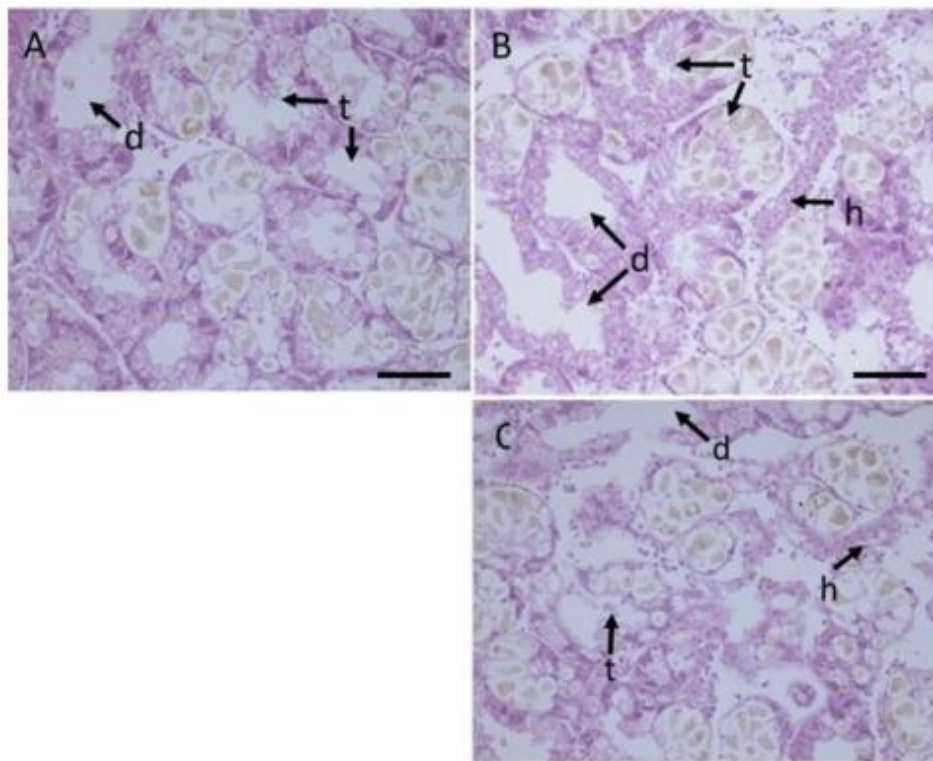


Figura 8. Tejidos de *A. ventricosus* retada con *V. parahaemolyticus*. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina. A) Epitelio de los túbulos y conductos de la glándula digestiva de almejas no retadas. B-C) Epitelio de los túbulos y conductos de la glándula digestiva de almejas retadas: se observa una descamación de las células digestivas de los túbulos y las células ciliares de los conductos. También se observó daño en el tejido conectivo e infiltración de hemocitos. Microfotografías = 40x. Escala de la barra = 25 μ m. d = conducto. t = túbulo. h = hemocitos.

Objetivo 2. Analizar el crecimiento de *A. ventricosus*, tratada con productos naturales, en un cultivo en el laboratorio

En la figura 9 se muestra el promedio del peso durante los 20 d del bioensayo, habiendo diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0.04997$). El tratamiento I (control) fue significativamente diferente al tratamiento II ($p=0.02819$).

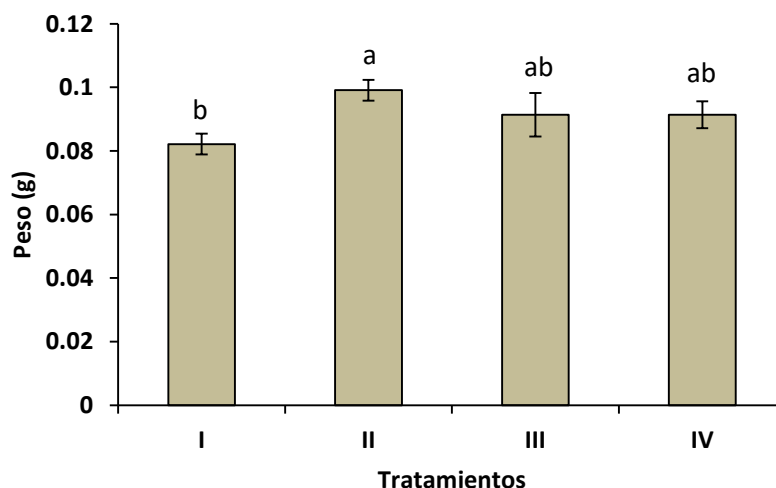


Figura 9. Peso de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina).

Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 10 se muestra el promedio de la longitud durante el bioensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0013$). El tratamiento I mostró diferencias significativas con el tratamiento II ($p = 0.0020$) y con el tratamiento IV ($p = 0.0061$).

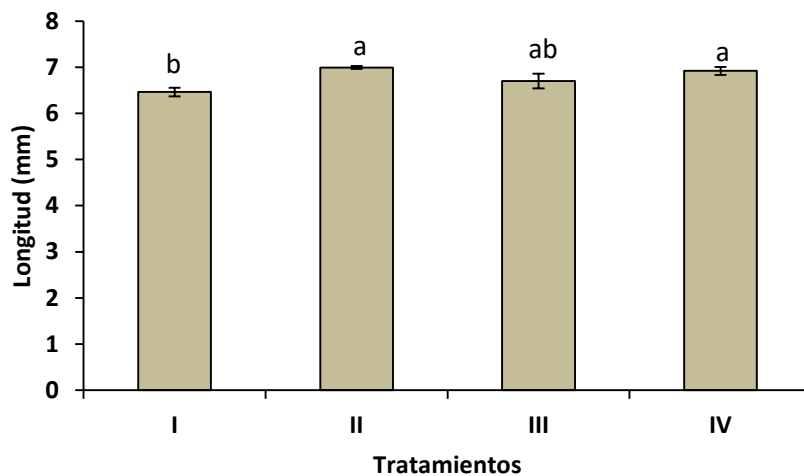


Figura 10. Longitud de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 11 se muestra el promedio en cuanto a la altura de *A. ventricosus* durante el bioensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0233$). El tratamiento I mostro diferencia significativa con el tratamiento II ($p = 0.0109$).

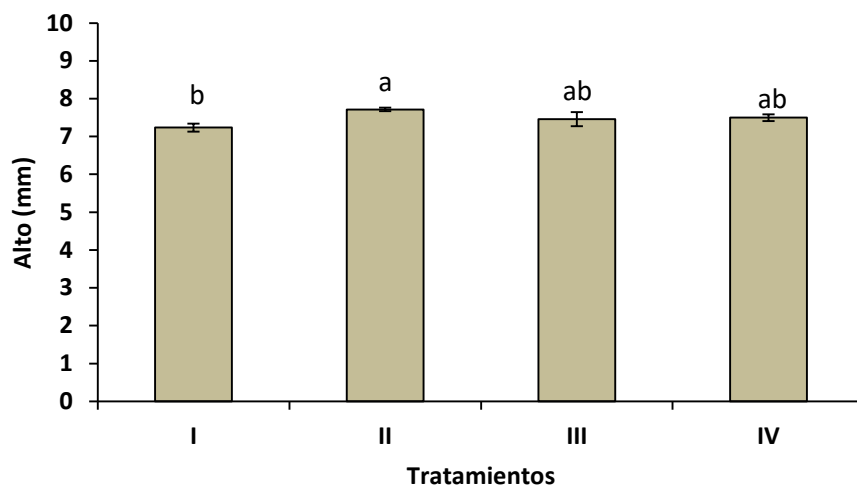


Figura 11. Alto de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 12 se muestra el promedio en cuanto al ancho de *A. ventricosus*. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0132$). El tratamiento I fue significativamente diferente al tratamiento II ($p = 0.0348$) y el tratamiento II fue significativamente diferente al tratamiento III ($p = 0.0239$).

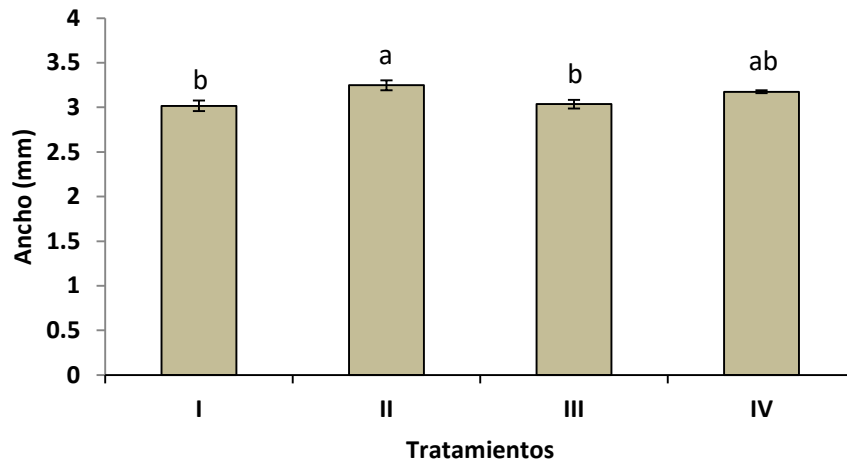


Figura 12. Ancho de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 13 se muestra la tasa de crecimiento específico (TCE) durante los 20 días que duró el bioensayo. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.3389$).

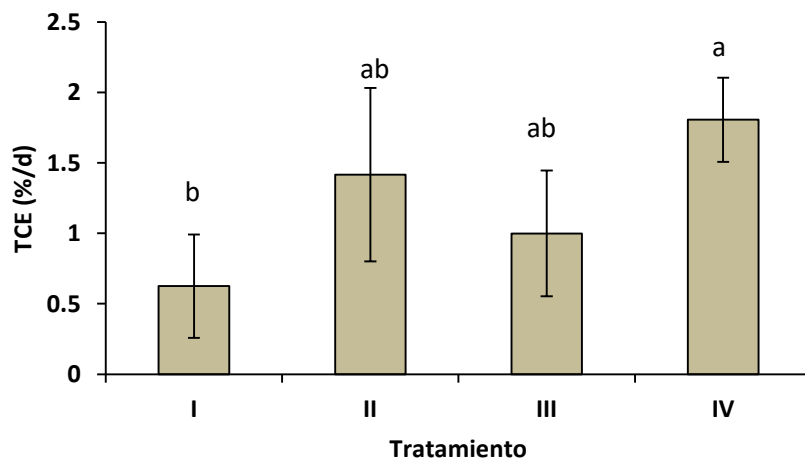


Figura 13. Tasa de crecimiento específico de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Objetivo 3. Determinar la supervivencia de *A. ventricosus*, cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*

Al inocular la CL_{50} de *V. parahaemolyticus* en el agua de los organismos tratados con AN (tratamiento III), se observó una mayor supervivencia que en los organismos que se infectaron pero que no tenían aditivos. La supervivencia en el tratamiento I (control sin AN y *V. parahaemolyticus*), II y III fue del 100 %, 23 % y 58 %, respectivamente. Hubo diferencia significativa entre los tratamientos con una $p = 0.004$ (Fig. 14).

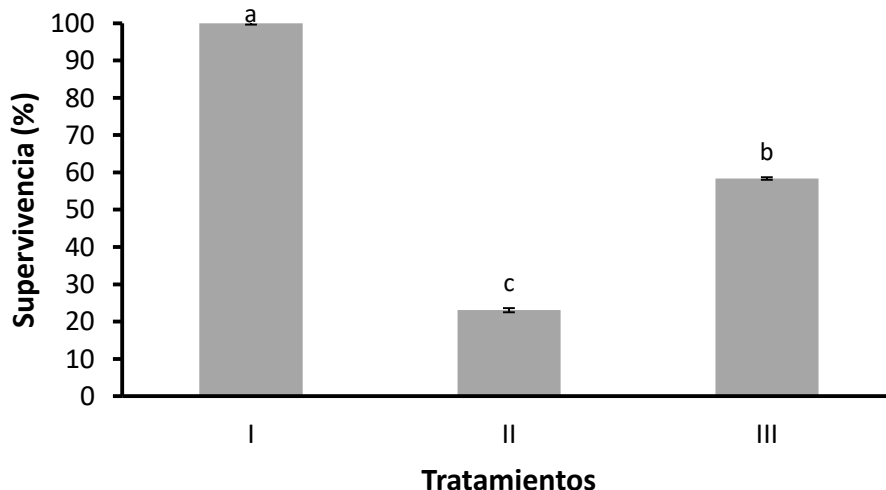


Figura 14. Supervivencia de *A. ventricosus* retada con *V. parahaemolyticus* y tratada con productos naturales. Tratamientos: I) control 1, microalgas; II) control 2, microalgas + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀); III) microalgas + AN + *V. parahaemolyticus* (CL₅₀). Columnas y barras indican la media \pm EE. AN = *B. licheniformis* (7×10^5 UFC/L), *Leuconostoc mesenteroides* (1.5×10^5 UFC/L), *Pediococcus pentosaceus* (1.5×10^5 UFC/L), inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Objetivo 4. Evaluar la respuesta inmune, a nivel bioquímico, de *A. ventricosus* inyectada con *V. parahaemolyticus* en un cultivo en el laboratorio

La figura 15 resume los resultados del conteo total de hemocitos (células/mL $\times 10^6$), donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos. El tiempo 0 h fue significativamente diferente a los tiempos 8 h ($p = 0.03$) y 24 h (0.0001), el tiempo 8 fue diferente a los otros tratamientos, al tiempo 0 h ($p = 0.033$), 24 h ($p = 0.0001$), tiempo 48 h ($p = 0.002$) y 72 h ($p = 0.001$), el tiempo 24 h fue diferente a los otros tratamientos: tiempo 0 h ($p = 0.0001$), 8 h ($p = 0.0001$), 48 h ($p = 0.0001$) y 72 h ($p = 0.0002$), el tratamiento 48 h fue significativamente diferente a los tiempos 8 h ($p = 0.002$) y 24 h ($p = 0.001$) y por último el tiempo 72 h fue diferente a los tiempos 8 h ($p = 0.001$) y 24 h ($p = 0.0002$).

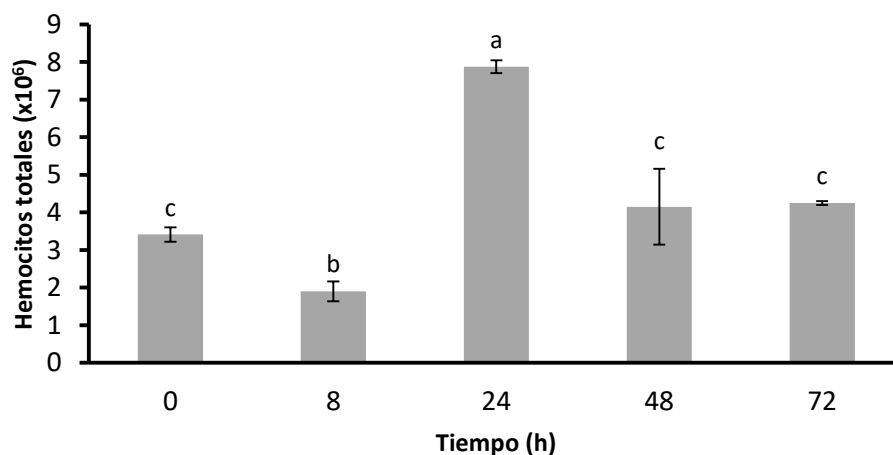


Figura 15. Conteo total de hemocitos en hemolinfa de *A. ventricosus* retada con *V. parahaemolyticus* en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h. Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.0$).

La figura 16 resume los resultados del área de hemocitos en las almejas retadas con *V. parahaemolyticus* donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos. El tiempo 0 h fue significativamente diferente del tiempo 24 h ($p = 0.003$) y 48 h ($p = 0.0001$). El tiempo 8 h fue significativamente diferente del tiempo 24 h ($p = 0.002$) y 48 h ($p = 0.0001$). El tiempo 24 h fue significativamente diferente del tiempo 0 h ($p = 0.003$), 8 h ($p = 0.002$) y 72 h ($p = 0.0002$). El tiempo 48 h fue significativamente diferente del tiempo 0 h ($p = 0.0001$), 8 h ($p = 0.0001$) y 72 h ($p = 0.00002$). Finalmente, el tiempo 72 h fue significativamente diferente del tiempo 24 h ($p = 0.0002$) y 48 h ($p = 0.00002$).

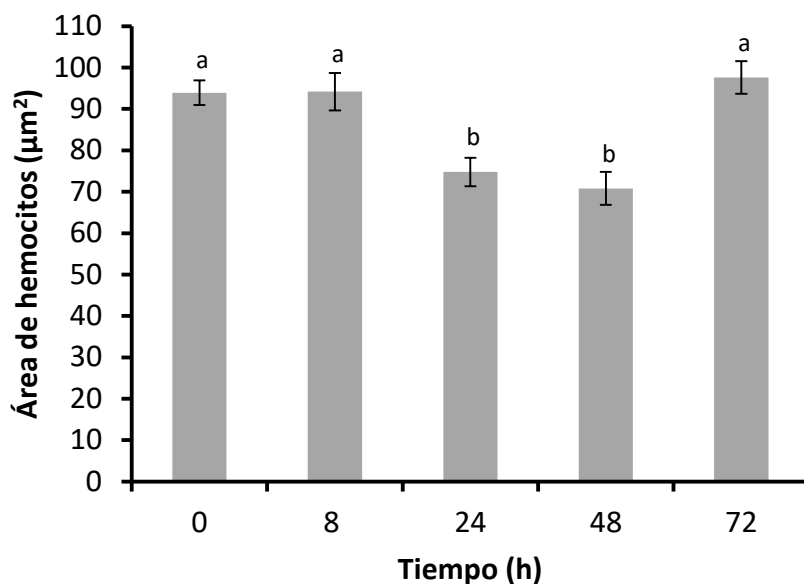


Figura 16. Área de hemocitos en hemolinfa de *A. ventricosus* desafiada con *V. parahaemolyticus* en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h. Las columnas y las barras son la media \pm EE.

En la figura 17 se resumen los resultados de la actividad de la fenoloxidasa (Absorbancia a 492 nm), donde se encontraron diferencias significativas ($p < 0.00$) entre los tiempos. El tiempo 0 h fue significativamente diferente al tiempo 8 h ($p = 0.022$), el tiempo 8 h fue significativamente diferente a los tiempos 0 h ($p = 0.022$) y 24 h ($p = 0.019$) y el tiempo 24 fue diferente al tiempo 8 h ($p = 0.019$).

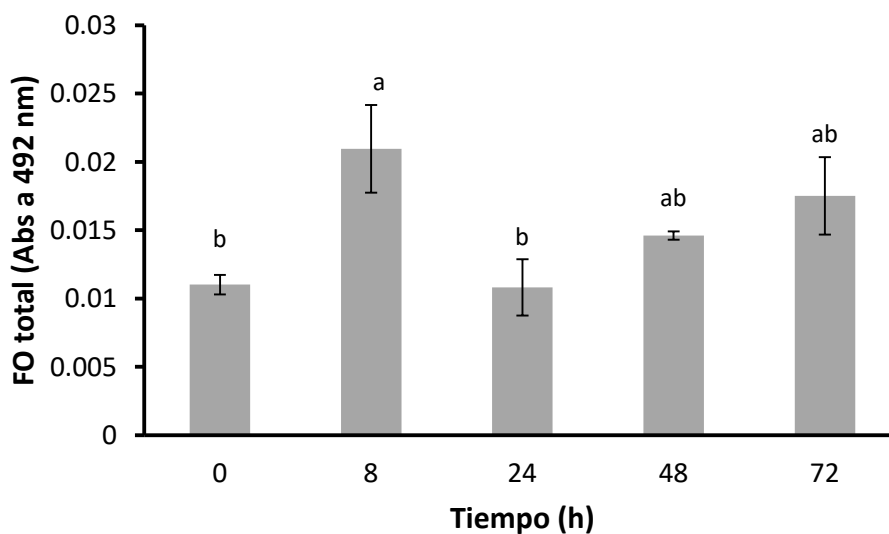


Figura 17. Actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa de *A. ventricosus* infectada con *V. parahaemolyticus* en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h. Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados del análisis de la actividad de enzimas hidrolíticas lisosomales en hemolinfa de *A. ventricosus* retadas con *V. parahaemolyticus* se pueden encontrar en la tabla 3. En el tiempo cero 0 h, no se detectó actividad de α -manosidasa. Se observaron diferencias en la actividad de los diferentes tipos de enzimas, así como entre los tiempos de muestreo. Las enzimas que exhibieron una actividad y una variación aumentadas fueron fosfatasa ácida, naftil fosfohidrolasa, esterasa lipasa, leucil arilamidasa, valil arilamidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y α -manosidasa. A las 72 h después de la estimulación, la actividad enzimática era muy similar a la del control. A las 8, 24 y 48 h hubo una mayor variación en la actividad enzimática, especialmente en las ocho enzimas mencionadas, en comparación con los tiempos 0 y 72 h.

Tabla 3. Actividad enzimática usando el kit API ZYM (U hidrolizado en nM mg/proteína) y ensayo de placa (U mg/proteína) en *A. ventricosus* retada con *V. parahaemolyticus*.

Enzimas	0 h	8 h	24 h	48 h	72 h
<i>Fosfatasas</i>					
Fosfatasa alcalina	9.09	12.2	8.77	9.8	8.77
Fosfatasa ácida	18.18	24.39	35.09	19.61	8.77
Naftol fosfohidrolasa	9.09	12.2	35.09	39.22	8.77
<i>Esterasas</i>					
Esterasa	18.18	12.2	8.77	9.8	8.77
<i>Lipasas</i>					
Esterasa lipasa	9.09	24.39	17.54	19.61	8.77
Lipasa	9.09	12.2	8.77	9.8	8.77
<i>Proteasas</i>					
Leucil arilamidasa	72.73	97.56	70.18	78.43	35.09
Valil arilamidasa	36.36	48.78	35.09	58.82	8.77
Cistina arilamidasa	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77
Tripsina	9.09	12.2	8.77	9.8	8.77
α -quimotripsina	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77

Glicosidasas

β -galactosidasa	36.36	12.2	70.18	58.82	8.77
α -galactosidasa	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77
β -glucuronidasa	9.09	12.2	17.54	19.61	8.77
α -glucosidasa	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77
β -glucosidasa	9.09	24.39	17.54	9.8	8.77
N-acetyl- β -glucosaminidasa	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77
α -manosidasa	0	12.2	17.54	39.22	8.77
α -fucosidasa	9.09	12.2	17.54	9.8	8.77
*Lisozima (hemolinfa)	230 \pm 29 ^{ab}	309 \pm 29 ^c	202 \pm 10 ^a	255 \pm 16 ^b	202 \pm 10 ^a
Lisozima (saliva humana)	3939	3939	3939	3939	3788

*Para la lisozima, se indican la media y la desviación estándar.

La actividad de la lisozima (Tabla 2) sobre el sustrato fue de 230 \pm 29, 309 \pm 29, 202 \pm 10, 255 \pm 16 y 202 \pm 10 U/mg de proteína a 0, 8, 24, 48 y 72 h, respectivamente. A las 8 h, la actividad de lisozima fue significativamente mayor que 0 h (P = 0.0002), 24 h (P = 0.0001), 48 h (P = 0.0139) y 72 h (P = 0.0001). A las 24 h, la actividad de lisozima fue significativamente mayor que 8 h (P = 0.0001) y 48 h (P = 0.0304). A las 48 h, la actividad de lisozima fue significativamente mayor que 8 h (P = 0.0139), 24 h (P = 0.0304) y 72 h (P = 0.0304). A las 72 h, la actividad de lisozima fue significativamente mayor que 8 h (P = 0.0001) y 48 h (P = 0.0304).

El halo de lisis causado por la actividad de la lisozima sobre el sustrato fue de 12.6 \pm 0.66, 12.6 \pm 0.49, 11.5 \pm 0.28, 13.0 \pm 0.40 y 11.5 \pm 0.28 mm en los tiempos 0, 8, 24, 48 y 72 h, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre tratamientos (p>0.05) (Fig. 18).

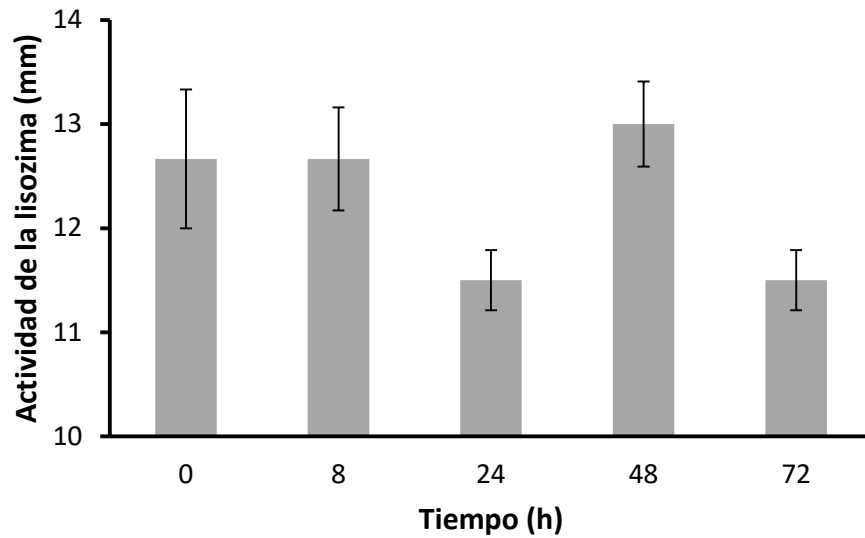


Figura 18. Actividad de la lisozima en hemolinfa de *A. ventricosus* infectada con *V. parahaemolyticus* en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h. Columnas y barras indican la media \pm EE. En la figura 19 se resume la cantidad de proteína (encontrada en la hemolinfa de *A. ventricosus*, donde se obtuvieron 0.55 ± 0.04 , 0.41 ± 0.06 , 0.57 ± 0.007 , 0.51 ± 0.04 y 0.57 ± 0.019 mg/mL en los tiempos 0, 8, 24, 48 y 72 h, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

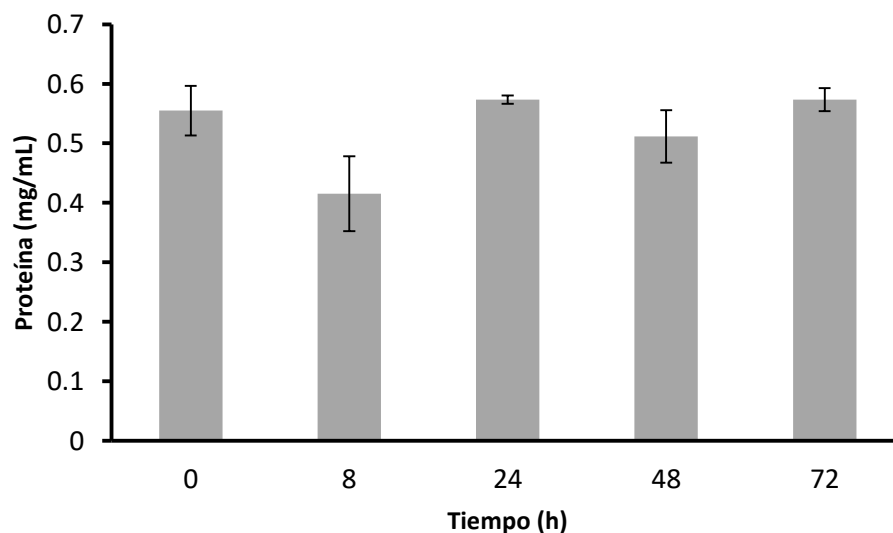


Figura 19. Concentración de proteína en la hemolinfa de *A. ventricosus* infectada con *V. parahaemolyticus* en diferentes tiempos: 0, 8, 24, 48 y 72 h. Columnas y barras indican la media \pm EE.

Objetivo 5. Evaluar la respuesta inmune, a nivel genético, de *A. ventricosus* tratada con bacilos en un cultivo en el laboratorio

La corrida de secuenciación generó un total de 51,033,670 lecturas crudas con una longitud promedio de 74.52 ± 1.06 pb. Las lecturas limpias (filtradas) obtenidas con Trimmomatic y Prinseq fueron 46,432,832. En el primer ensamblaje con Trinity se obtuvieron 102,147 contigs. Con el mapeo con Bowtie2 se eliminaron 45,384,256 lecturas que corresponden a transcritos de rRNA contaminante desde la preparación de la librería de cDNA, quedando 1,048,576 lecturas (8.34 % respecto a las lecturas limpiadas con Trimmomatic y Prinseq). Respecto al gran total de lecturas, sólo el 2.05 % correspondió a lecturas buenas. En el segundo ensamblaje con Trinity se ensamblaron sólo las 1,048,576 lecturas en 82,468 contigs. El número de contigs largos (>1000 pb) fue de 26,812 pb, el contig más largo fue de 16,089 pb. El contenido de GC fue 39.1 % y el tamaño de contig N50 fue 1722 pb. No se reportaron N's (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen estadístico del ensamblaje del transcriptome de *A. ventricosus*.

Categoría	Valor
Número total de lecturas crudas	51,033,670
Longitud promedio de lecturas (pb)	74.52 ± 1.06

Número total del lecturas limpias	46,432,832
Lecturas ensambladas	1,048,576
Contigs totales	82,457
Longitud promedio de contigs (pb)	1,015.85
Total de bases	83,775,475
Contig más largo (pb)	16,089
No. de contigs largos (>1000 pb)	26,812
Contenido de GC (%)	39.10
Tamaño de contig N50 (pb)	1722
# de N's por 100 kpb	0

De los casi 82,457 contigs, 31,120 (37.74 %) se anotaron contra la base de datos de proteínas del NCBI-nr.

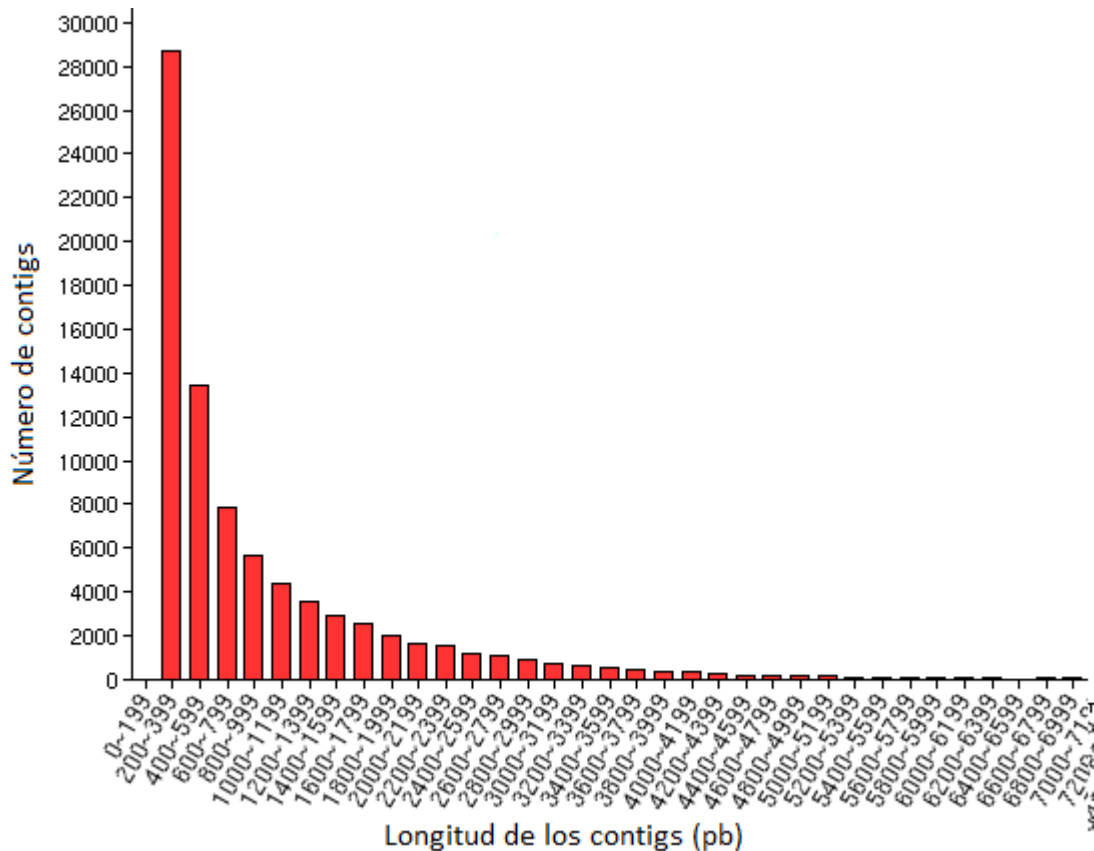


Figura 20. Número total y longitud de los contigs obtenidos en el ensamblaje del transcriptoma de *A. ventricosus*, usando FuntionAnnotator.

El mapeo contra la base de datos de taxonomía del NCBI (distribución filogenética) dió como resultado la siguiente anotación de mayor a menor: *Crassostrea gigas* (20,053)>*Lottia gigantea* (2052)>*Lingula anatina* (1416)>*Aplysia californica* (1309)>*Octopus bimaculoides* (1230)>*Biomphalaria glabrata* (702) (Fig. 20).

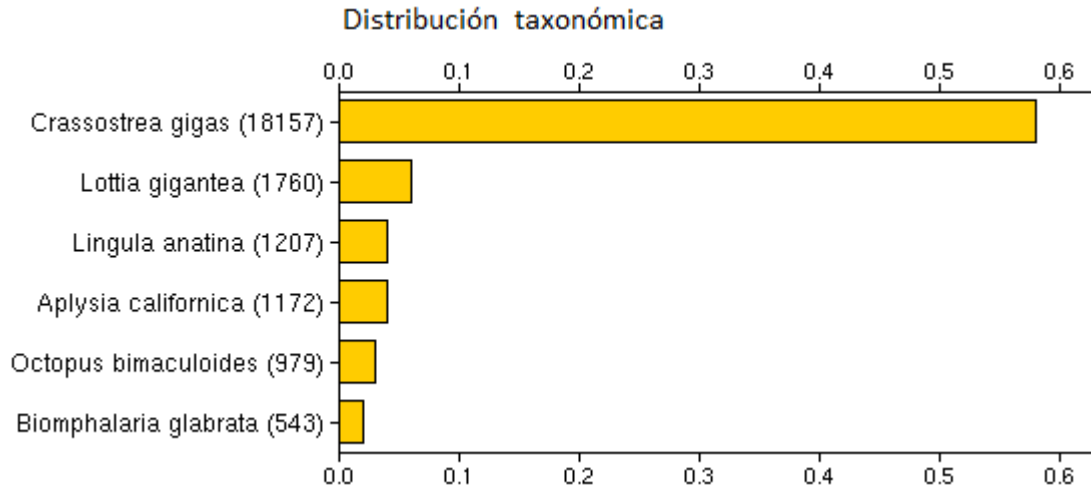


Figura 21. Distribución taxonómica de los contigs anotados contra la base de datos de taxonomía del NCBI. La mayoría de las secuencias se anotaron con el ostión japonés *C. gigas*.

La ontología génica (GO) es un sistema de clasificación funcional internacional, cuyos términos se usaron para clasificar los genes anotados de *A. ventricosus* respecto a sus funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos. Se obtuvieron 31,120 contigs que se anotaron en el nivel 2 con los términos de GO por Blast2GO, 22,690 corresponden a funciones moleculares (Fig. 21), 17,937 a componentes celulares (Fig. 22) y 22,513 a procesos biológicos (Fig. 23). En la categoría de funciones moleculares, la mayoría de los términos correspondieron a genes de unión (75 %) y actividad catalítica (57 %). En los componentes celulares predominaron los términos, parte de células (96 %), organelos (44 %), parte de organelos (34 %) y complejos macromoleculares (29 %). En los procesos biológicos, la mayoría de los términos correspondió a genes de procesos celulares (76 %), procesos metabólicos (67 %), regulación biológica (40 %)

y respuesta a estímulos (28). Sólo 330 genes correspondieron al sistema inmune (1.47 %).

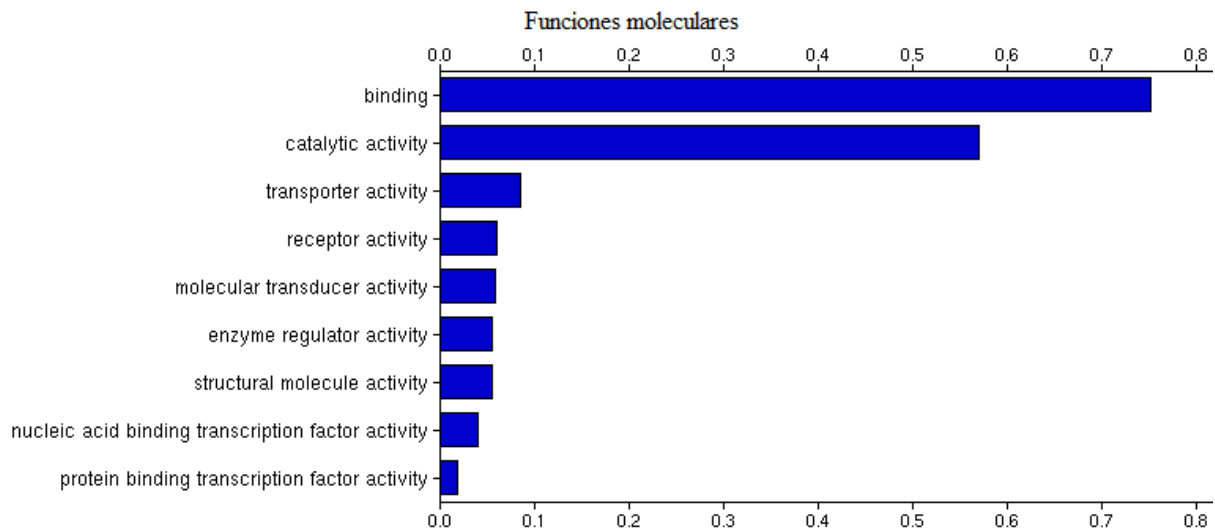


Figura 22. Análisis de ontología génica del transcriptoma de *A. ventricosus* en el nivel 2 correspondiente a funciones moleculares. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.

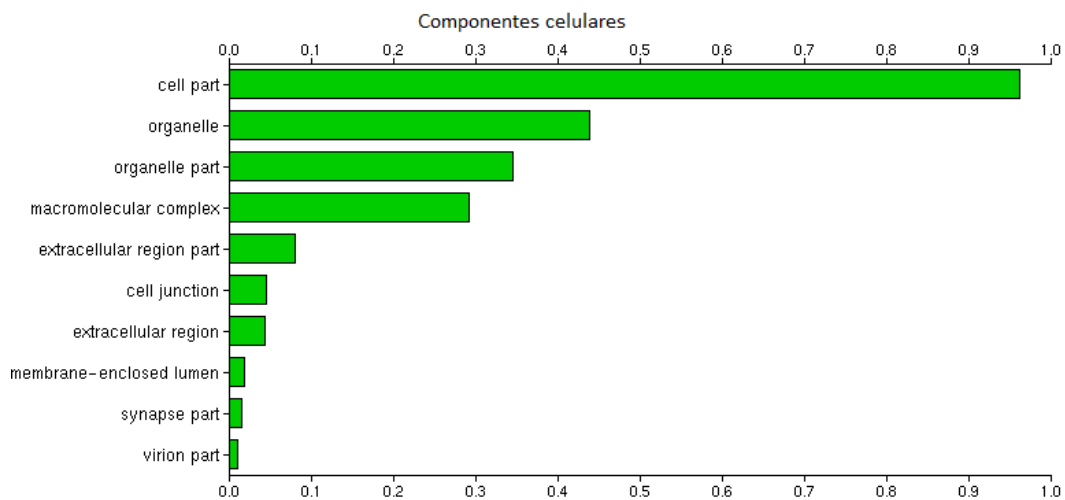


Figura 23. Análisis de ontología génica del transcriptoma de *A. ventricosus* en el nivel 2 correspondiente a componentes celulares. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.

F

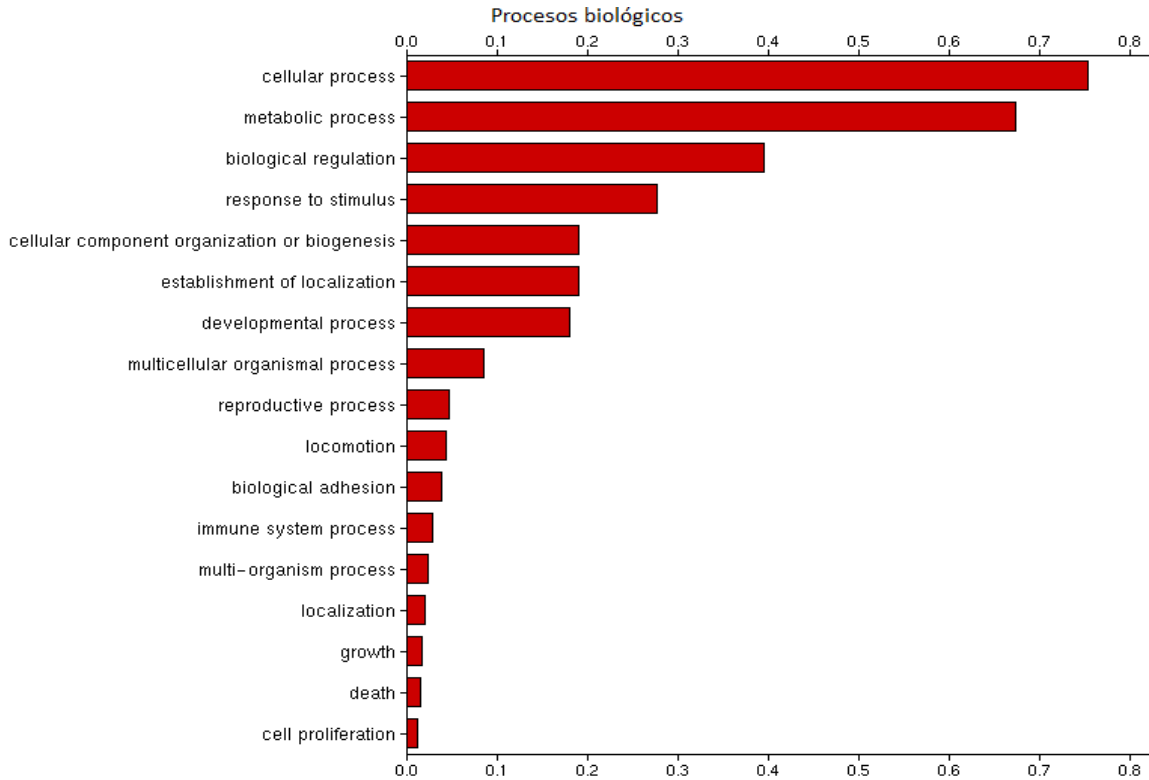


Figura 24. Análisis de ontología génica del transcriptoma de *A. ventricosus* en el nivel 2 correspondiente a procesos biológicos. Los términos se obtuvieron usando Blast2GO.

Mediante el análisis KEGG se identificaron las categorías biológicas metabolismo (14 %), procesos celulares (13 %), procesamiento de información genética 11 %, sistemas orgánicos 22 %, medioambiental 14 % y enfermedades de humanos 26 % (Fig. 25A). Dentro de los sistemas orgánicos se encontraron 491 genes relacionados con la respuesta inmune de la almeja Catarina y distribuidos en 20 vías (Fig. 25B), como los unigenes de la ruta de señalización del receptor NOD, la ruta de señalización de quimocinas, la ruta de señalización del receptor Toll, la ruta de señalización del receptor tipo lectina C, migración transendotelial de

leucocitos, fagocitosis mediada por Fc gama, ruta de señalización del receptor de célula T, citotoxicidad mediada por célula NK, entre otros (Fig. 25B).

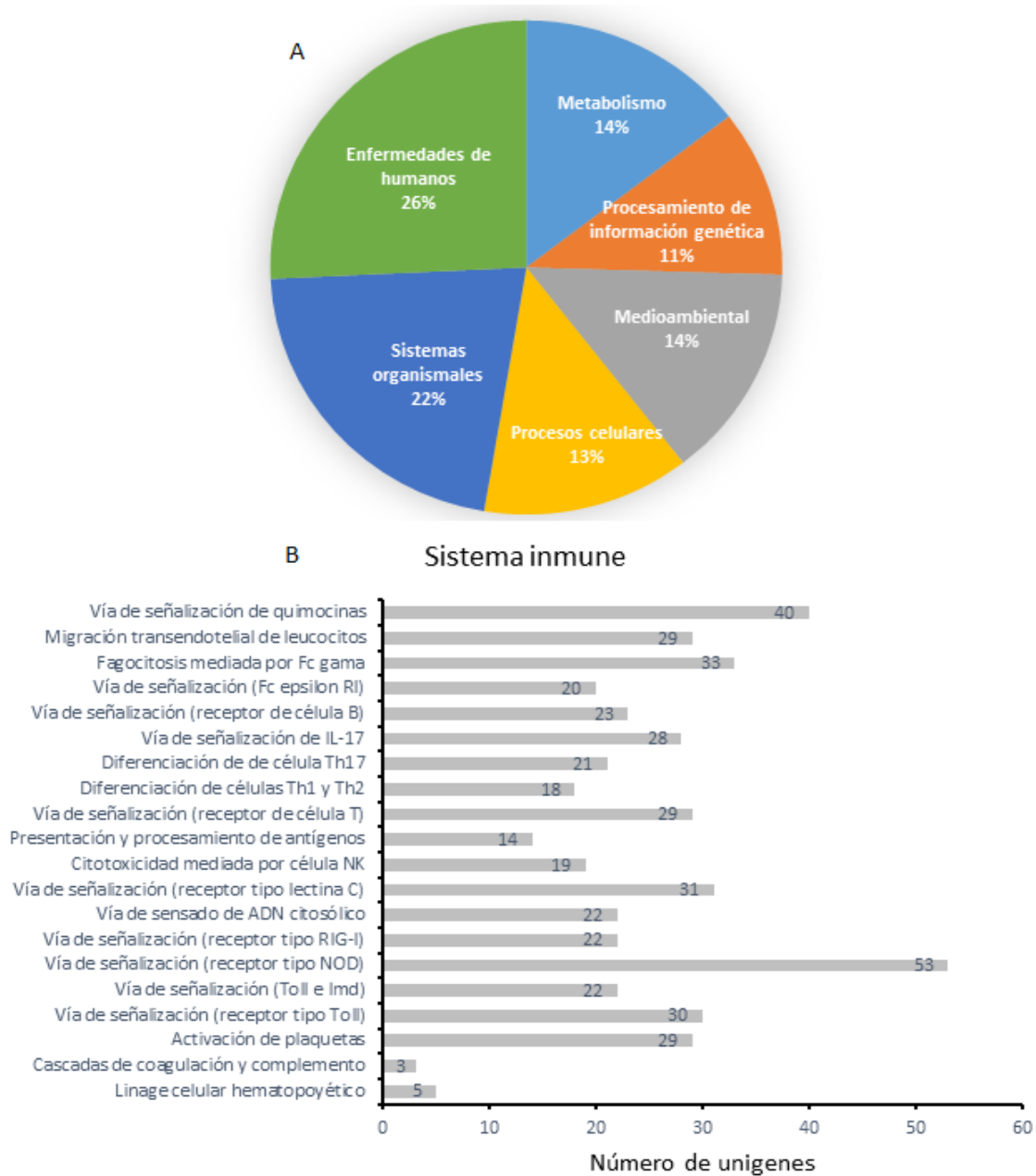


Figura 25. Anotación de unigenes de *A. ventricosus* con la base de datos KEGG. (A) Distribución de unigenes de la almeja Catarina en categorías biológicas

de KEGG. (B) Clasificación de los unigenes de la almeja Catarina del análisis KEGG en la categoría “sistema inmune”.

En la anotación (GO) con la base de datos de proteínas del NCBI-nr se encontraron unigenes potenciales del sistema inmune y relacionados. Entre los unigenes encontrados se encontraron receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRPMs), rutas de señalización inmune, efectores inmunes y de apoptosis (Tablas 5-8).

Tabla 5. Unigenes potenciales relacionados con receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) en *A. ventricosus* con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).

Receptores de reconocimiento de patrones (RRPs)	Identificación del contig (Contig-ID)
Macrophage mannose receptor 1	TRINITY_DN17680_c0_g1_i1
Collectin-12	TRINITY_DN48141_c0_g1_i1
Peptidoglycan recognition protein	TRINITY_DN2029_c0_g2_i1
Ficolin-2-like	TRINITY_DN7275_c0_g1_i2
Scavenger receptor cysteine-rich protein	TRINITY_DN853_c0_g1_i1
Thioester-containing protein C	TRINITY_DN113_c0_g1_i2
Fibrinogen-related protein	TRINITY_DN6130_c0_g1_i4
Down syndrome cell adhesion molecule	TRINITY_DN4900_c0_g2_i1
Galectin	TRINITY_DN18192_c0_g1_i1
Toll-like receptor 13	TRINITY_DN46550_c0_g1_i1
Stabilin-2	TRINITY_DN783_c0_g1_i1

Tabla 6. Unigenes potenciales relacionados con rutas de señalización inmune en *A. ventricosus* con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).

Rutas de señalización inmune	Identificación del contig (Contig-ID)
MyD88-1	TRINITY_DN28044_c0_g1_i1
MyD88-3	TRINITY_DN1714_c0_g2_i1
Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1	TRINITY_DN19224_c0_g1_i1

Interleukin-1 receptor-associated kinase 4-like	TRINITY_DN2601_c0_g1_i4
Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 TRAF	TRINITY_DN812_c0_g1_i1
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	TRINITY_DN50687_c0_g1_i1
Transforming-growth-factor (TGF)-Beta signaling pathway factor	TRINITY_DN7385_c0_g1_i1
Nuclear factor related to kappa-B-binding protein	TRINITY_DN50936_c0_g1_i1
Inhibitor of nuclear factor-kappaB protein	TRINITY_DN1021_c0_g1_i2
Interferon regulatory factor 2	TRINITY_DN19095_c0_g1_i1
Tyrosine-protein kinase JAK2-like	TRINITY_DN15776_c0_g1_i3
Signal transducer and activator of transcription 5	TRINITY_DN6884_c0_g1_i3
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	TRINITY_DN33705_c0_g1_i1
Protein pellino	TRINITY_DN45063_c0_g1_i1
Toll interacting protein (TOLLIP)	TRINITY_DN5090_c0_g1_i3
Suppressor of cytokine signaling 5 (SOCS)	TRINITY_DN17225_c0_g1_i1
NF-kappa-B inhibitor-like protein 1 (NFKBIL1)	TRINITY_DN19405_c0_g1_i1
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein 1-like (IRAK1BP1)	TRINITY_DN19966_c0_g1_i1
Nuclear factor of activated T-cells 5-like	TRINITY_DN7852_c0_g1_i14
<i>Endogenous ligands</i>	
Fibrinogen-related protein	TRINITY_DN6130_c0_g1_i3
Heat shock protein 60	TRINITY_DN1382_c0_g1_i1
Heat shock protein 70	TRINITY_DN45879_c0_g1_i1
Heat shock protein 22	TRINITY_DN3457_c0_g1_i1
Heat shock protein 90	TRINITY_DN196_c0_g1_i1
Stress-induced-phosphoprotein 1-like	TRINITY_DN10431_c0_g1_i1
Intraflagellar transport protein 25 homolog	TRINITY_DN10201_c0_g1_i1
<i>Hypoxia-inducible factors (HIFs)</i>	
Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor-like	TRINITY_DN3930_c1_g1_i1

Tabla 7. Unigenes potenciales relacionados con efectores del sistema inmune encontrados en *A. ventricosus* con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).

Efectores del sistema inmune	Identificación del contig (Contig-ID)
<i>Antioxidant defence system/phagocytosis</i>	
Cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase	TRINITY_DN51865_c0_g1_i1
Catalase	TRINITY_DN849_c0_g1_i1
Glutathione peroxidase	TRINITY_DN445_c0_g1_i1
Nitric oxide synthase	TRINITY_DN47019_c0_g1_i1
Thioredoxin 2	TRINITY_DN7418_c0_g2_i1
Thioredoxin reductase 1	TRINITY_DN5996_c0_g2_i7
Peroxiredoxin	TRINITY_DN21021_c0_g1_i1
Glutaredoxin 5	TRINITY_DN7923_c0_g1_i1
Glutathione S-transferase	TRINITY_DN855_c0_g3_i1
Glutathione synthetase	TRINITY_DN30363_c0_g1_i1

Methionine-R-sulfoxide reductase B1	TRINITY_DN41264_c0_g1_i1
Glutathione reductase, mitochondrial	TRINITY_DN18286_c0_g1_i1
NADPH oxidase 5-like	TRINITY_DN6803_c0_g1_i1
Cytochrome b-245 light chain-like	TRINITY_DN18644_c0_g1_i1
Dual oxidase 2	TRINITY_DN541_c0_g1_i5
Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondria	TRINITY_DN21814_c0_g1_i1
Cathepsin B	TRINITY_DN15563_c0_g1_i1
Cathepsin F	TRINITY_DN619_c0_g1_i6
Cathepsin C	TRINITY_DN618_c0_g1_i5
Cathepsin L	TRINITY_DN25771_c0_g1_i1
Cathepsin D	TRINITY_DN6487_c0_g1_i1
Lysozyme 2	TRINITY_DN19471_c0_g1_i1
G-type lysozyme	TRINITY_DN32398_c0_g1_i1
Antimicrobial peptides	
Big defensin	TRINITY_DN8410_c0_g1_i1
Bactericidal permeability increasing protein	TRINITY_DN24149_c0_g1_i1
Bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein	TRINITY_DN17427_c0_g1_i1

Tabla 8. Unigenes potenciales relacionados con apoptosis en *A. ventricosus* con el análisis GO/base de datos de proteínas del NCBI-nr (anotación).

Apoptosis	Identificación del contig (Contig-ID)
Fas-associated death domain protein (FADD)	TRINITY_DN4612_c0_g1_i2
TNF receptor-associated factor 3	TRINITY_DN9642_c0_g1_i1
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial-like (AIF)	TRINITY_DN4112_c0_g1_i2
Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	TRINITY_DN20141_c0_g1_i1
Bax inhibitor-1	TRINITY_DN1832_c0_g1_i2
Caspase	TRINITY_DN22763_c0_g1_i1
Caspase-2	TRINITY_DN492_c0_g1_i2
Caspase-1-like	TRINITY_DN12351_c0_g1_i1
Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (IAPs)	TRINITY_DN44682_c0_g1_i1
Interferon alpha-inducible protein 27-like (IFI27)	TRINITY_DN2221_c0_g1_i2
apoptosis regulator BAX-like	TRINITY_DN15878_c0_g1_i2
Bcl-2 protein	TRINITY_DN362_c0_g1_i2

Se realizó un BLAST con las secuencias obtenidas (ver contig-ID) contra las bases de datos contenidas en nr-nt (GenBank, EMBL y RefSeq) (<http://www.genome.jp/tools/blast/>) para reconfirmar y seleccionar genes del sistema inmune y relacionados de mayor interés.

Se identificaron varias secuencias que mostraron homología con lectinas, receptores tipo Toll, proteínas de estrés por calor (Hsp), proteína de unión a peptidoglucanos, lisozimas, glutatión peróxidasa y enzimas hidrolíticas lisosomales, aciloxiacil hidrolasa, proteína de expansión de linfocitos y proteína de maduración ribosomal SBDS (Tabla 9). También se identificaron posibles genes de referencia (el transcrito varia muy poco entre tratamientos) como β -actina, ubiquinona, proteína ribosomal 40s, proteína ribosomal 60s, proteína tipo bop1 A y proteína peroxisomal 12.

Se diseñaron 21 pares de primers, 6 de genes de referencia y 15 relacionados con el sistema inmune en Sigma-Genosys. Los oligos se probaron en semillas de almeja Catarina y almejas adultas (pool de tejidos) por medio de la PCR de punto final en gradiente para ver si amplificaban el fragmento esperado y obtener la mejor temperatura media de alineamiento (Tabla 10).

Tabla 9. Primers utilizados en el estudio de la expresión de genes de referencia y genes relacionados con el sistema inmune en *A. ventricosus*.

	Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Tm	Tamaño de amplicón (pb)
Referencia	β -actina	qBactinCat-F	CAGGGAAAAGATGACCCAGA	20	60.04	104
		qBactinCat-R	CTGTGGTACGACCTGAAGCA	20	59.9	
	Ubiquinona	UBI.Cat-F	CCATTTTGGGTTGTTGAGG	20	60.2	93
		UBI.Cat-R	ACCAGCATCAAAGGAACCAG	20	60.15	
	Proteína ribosomal 40s	PR40s.Cat-F	AGCAATGACGGACATGTTAG C	21	60.15	106
		PR40s.Cat-R	TCTTCATTCTCTGGCCACTC	21	59.42	
	Proteína ribosomal 60s	PR60s.Cat-F	AGGTATCTGGTCATGCAAACG	21	60.01	85
		PR60s.Cat-R	TCTTACTGTAGCGGCAGCATT	21	60.05	
	Proteína tipo bop1 A	PTBA.Cat-F	AACCAAAGGACCTGCAACC	19	59.96	113
		PTBA.Cat-R	ACCTGAAGCCAGCCATTCT	19	59.82	
	Proteína peroxisomal 12	PP12.Cat-F	ACAGTACCACCCTGTCCAC	20	60.03	103
		PP12.Cat-R	GTGACATCAAAGCTGGAGCA	20	59.99	

Relacionados con sistema inmune	Glutación peroxidasa	qGpxCat-F	ATGGAGACATGGGCTTTCAG	20	60.07	174
		qGpxCat-R	GTTTCGTTCTTGCCGTTGATT	20	60.12	
	Lisozima G	qLisCat-F	TACCACCACTGTACCAGCA	20	60.02	110
		qLisCat-R	CATGTGGGATGTTTGTGAGC	20	59.97	
	Aciloxiacil hidrolasa	ACH.Cat-F	CTGGCACCGTTAACTCAA	20	59.76	90
		ACH.Cat-R	TGGTCCCATGAACTCCATCT	20	60.33	
	Proteína de expansión de linfocitos	PEL.Cat-F	AGAAGATGCTGGCAAGGAAA	20	59.96	124
		PEL.Cat-R	TCCTTGAAGCGATGTGACAG	20	59.98	
	Proteína de unión a peptidoglicanos	qPUO.Cat-F	AACCAGCTCATAGAACGACA	21	59.75	87
		qPUP.Cat-R	AGTCTCCGTATGACACGTTTCG	21	60.19	
	Proteína de maduración ribosomal SBDS	SBDS.Cat-F	AATGGCCAAAACAGCAGAAC	20	60.12	192
		SBDS.Cat-R	TAGGGGCGATTTGTATCTGG	20	59.92	
	Toll 4	qToll4Cat-F	ATCATCCGCATAAGCGGTAG	20	60.08	175
		qToll4Cat-R	CGTTGTAGCCCATGTTGAGA	20	59.72	
	Toll 13	qToll13Cat-F	GTTTTGCTGGCAGGAGAGAG	20	60.13	134
		qToll13Cat-R	CGAATTCACACCAAGTTGTCG	20	60.15	
	Lectina C	qLecC.Cat-F	TTTAGCGATGACGAATGCTG	20	59.98	197
		qLecC.Cat-R	GTGTATGAACCGTCGCCTTT	20	60	
	Lectina S	LecS.Cat-F	GTGGACCGTGCAACCATAAC	21	60.15	126
		LecS.Cat-R	ATTTGGTGATGTCAGCGTCTC	21	60.13	
	Lectina Like	LECL.Cat-F	TCCATATTGCCGTGAGTGTC	20	59.53	119
		LECL.Cat-R	ACATGCAGAAAGCACATTCG	20	59.87	
	HSP40	qHsp40Cat-F	ATCCCCCAAACAAATCTCC	20	60	200
		qHsp40Cat-R	TTGGCAAAGAATTCATCC	20	59.88	
	HSP60	Hsp60.Cat-F	TCTACTGGTGCCGTGGTATTC	21	60.01	127
		Hsp60.Cat-R	GTCCACGCATAAGCAAACAGT	21	60.19	
HSP70	qHsp70Cat-F	TCAATACCGAGGGACAAAGG	20	59.93	152	
	qHsp70Cat-R	ACGGTTCAGGAACTGTTGG	20	60.01		
HSP90	Hsp90.Cat-F	ATCTTGTGCCTGGGATTGAG	20	60.07	184	
	Hsp90.Cat-R	AGCGGGTGGAAAAGGTTACT	20	60		

Las pruebas de los primers en semillas infectadas con *V. parahaemolyticus* indicaron que hay expresión de 6 genes: B-actina, Hsp40, Hsp70, lisozima G, Toll 13 y de Glutación peroxidasa (Fig. 26), el resto de los genes no se expresaron.

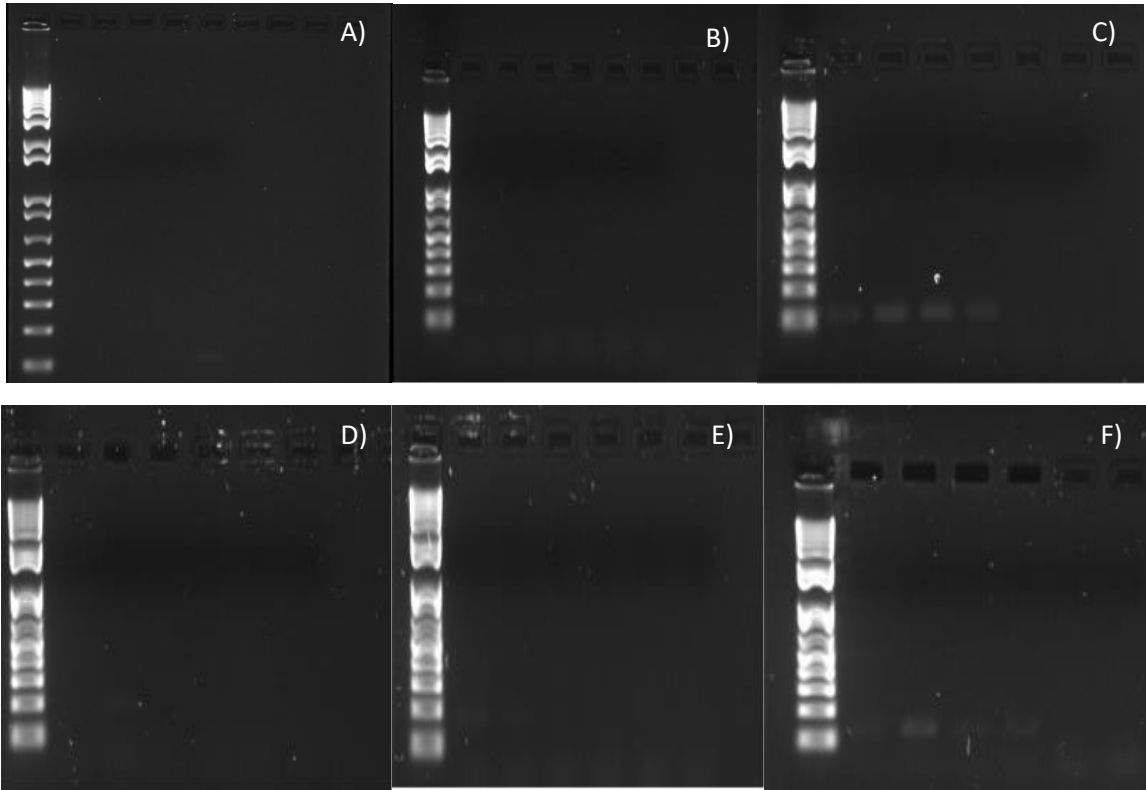
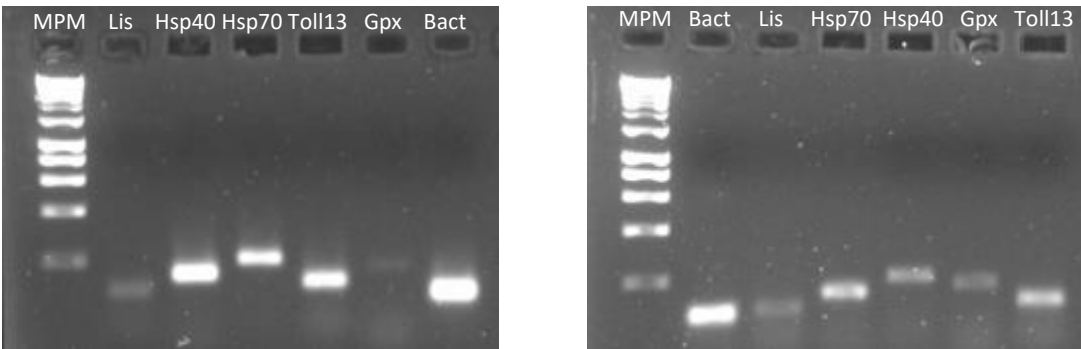


Figura 26. A) B-actina, B) Hsp70, C) Lisozima G, D) Hsp40, E) Glutation peroxidasa y, F) Toll 13.

Posteriormente se hicieron pruebas para determinar la expresión de genes del sistema inmune en los diferentes tejidos de almejas adultas sin infectar. Los resultados arrojaron que los mismos genes que se expresaron en semillas se expresan en los tejidos de almejas adultas (Fig. 27).



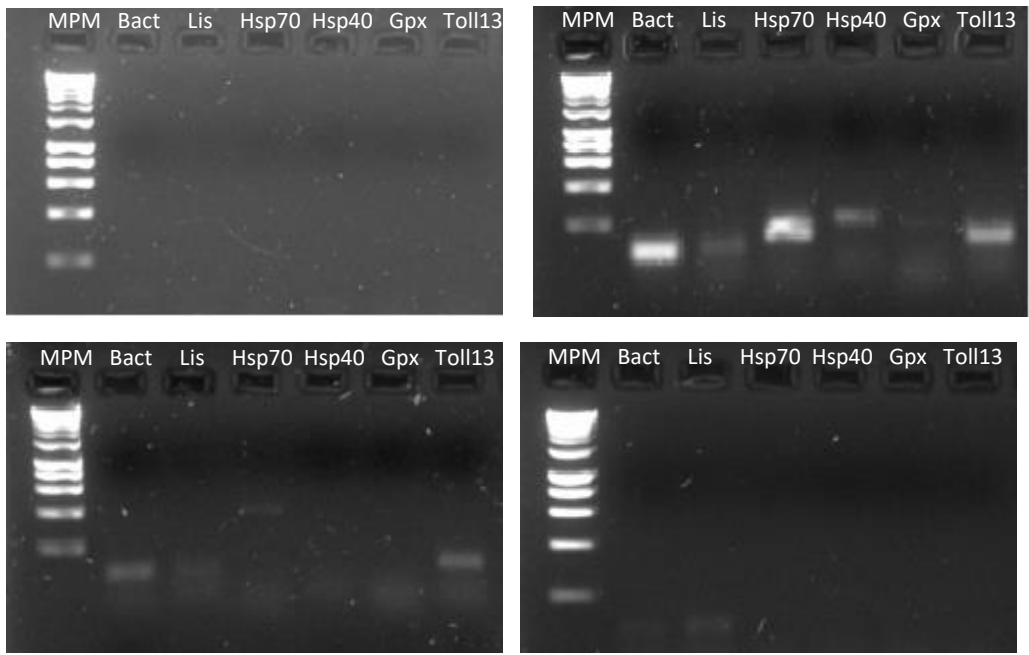


Figura 27. Hemocitos, gónada, hepatopáncreas, branquias, manto y músculo.

Se probó en hemocitos un segundo grupo de genes de referencia y genes relacionados con el sistema inmune (Fig. 28). La tabla 10 muestra los resultados donde se observa los genes que amplificaron el fragmento del tamaño esperado.

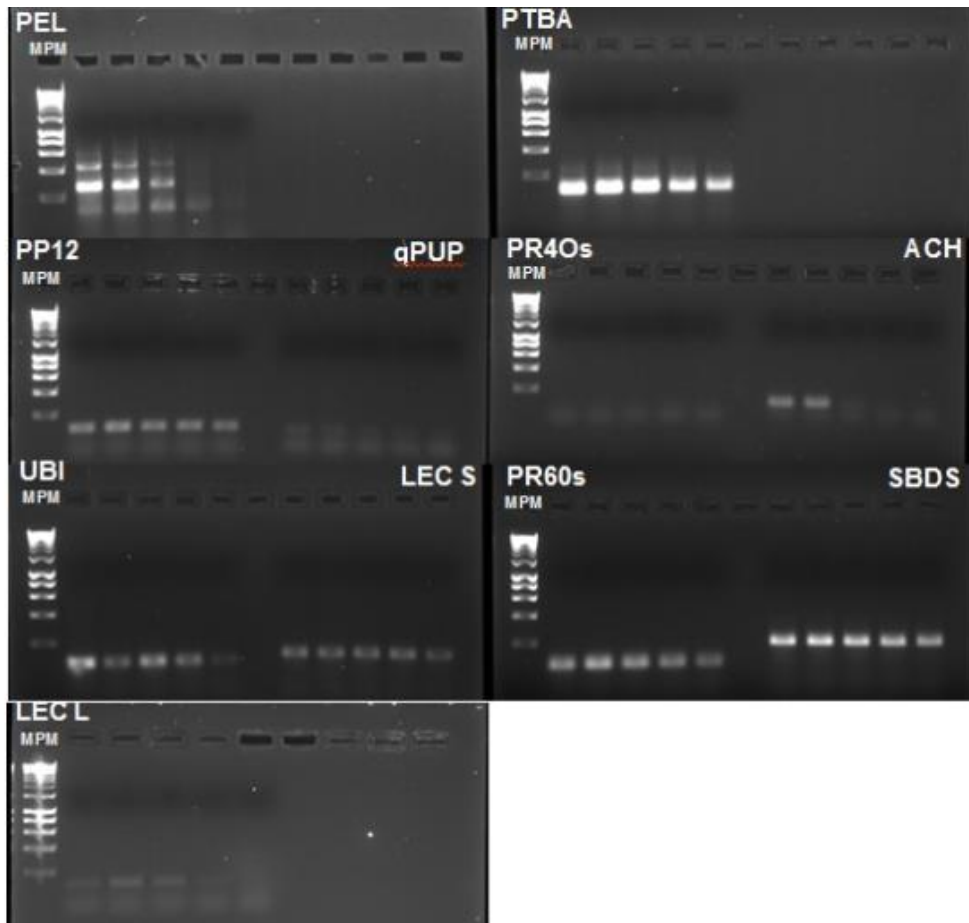


Figura 28. Prueba de primers en hemocitos de almeja catarina adulta sin infectar.

Tabla 10. Resultados de las pruebas de primers en tejidos de *A. ventricosus*.

	Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	MT	Tamaño de amplicón (pb)	Alineamiento
Referencia	β-actina	qBactinCat-F	CAGGGAAAAGATGACCCAGA	20	55	104	+
		qBactinCat-R	CTGTGGTACGACCTGAAGCA	20	55		
	Ubiquinona	UBI.Cat-F	CCATTTTTGGGTTGTTGAGG	20	55	93	+
		UBI.Cat-R	ACCAGCATCAAAGGAACCAG	20	55		
	Proteína ribosomal 40s	PR40s.Cat-F	AGCAATGACGGACATGTTAGC	21	60.15	106	-
		PR40s.Cat-R	TCTTCATTCTCTGGCCACTC	21	59.42		
	Proteína ribosomal 60s	PR60s.Cat-F	AGGTATCTGGTCATGCAAACG	21	55	85	+
		PR60s.Cat-R	TCTTACTGTAGCGGCAGCATT	21	55		
Proteína tipo bop1 A	PTBA.Cat-F	AACCAAAGGACCTGCAACC	19	65	113	+	

		PTBA.Cat-R	ACCTGAAGCCAGCCATTCT	19	65		
	Proteína peroxisomal 12	PP12.Cat-F	ACAGTACCACCCTGTCCAC	20	55	103	+
		PP12.Cat-R	GTGACATCAAAGCTGGAGCA	20	55		
Relacionados con sistema inmune	Glutación peroxidasa	qGpxCat-F	ATGGAGACATGGGCTTTCAG	20	55	174	+
		qGpxCat-R	GTTCTGTTCTTGCCTTGATT	20	55		
	Lisozima-G	qLisCat-F	TACCACCACTGTACCCAGCA	20	56.9	110	+
		qLisCat-R	CATGTGGGATGTTTGTGAGC	20	56.9		
	Aciloxiacil hidrolasa	ACH.Cat-F	CTGGCACCGTTAACTCAA	20	55	90	+
		ACH.Cat-R	TGGTCCCATGAATCCATCT	20	55		
	Proteína de expansión de linfocitos	PEL.Cat-F	AGAAGATGCTGGCAAGGAAA	20	56.9	124	+
		PEL.Cat-R	TCCTTGAAGCGATGTGACAG	20	56.9		
	Proteína de unión a peptidoglicanos	qPUP.Cat-F	AACCCAGCTCATAGAACGACA	21	55	87	+
		qPUP.Cat-R	AGTCTCCGATGACACGTTCCG	21	55		
	Proteína de maduración ribosomal SBDS	SBDS.Cat-F	AATGGCCAAAACAGCAGAAC	20	55	192	+
		SBDS.Cat-R	TAGGGGCGATTTGTATCTGG	20	55		
	Toll-4	qToll4Cat-F	ATCATCCGCATAAGGCGTAG	20	60.08	175	-
		qToll4Cat-R	CGTTGTAGCCCATGTTGAGA	20	59.72		
	Toll-13	qToll13Cat-F	GTTTTGCTGGCAGGAGAGAG	20	56.9	134	+
		qToll13Cat-R	CGAATTCACACAGTTGTCG	20	56.9		
	Lectina-C	qLecC.Cat-F	TTTAGCGATGACGAATGCTG	20	59.98	197	-
		qLecC.Cat-R	GTGTATGAACCGTCGCCTTT	20	60		
	Lectina-S	LecS.Cat-F	GTGGACCGTGTCAACCATAAC	21	55	126	+
		LecS.Cat-R	ATTTGGTGATGTCAGCGTCTC	21	55		
Lectina Like	LECL.Cat-F	TCCATATTGCCGTGAGTGTC	20	56.9	119	+	
	LECL.Cat-R	ACATGCAGAAAGCACATTCG	20	56.9			
HSP40	qHsp40Cat-F	ATTCCCCAAAACAATCTCC	20	56.9	200	+	
	qHsp40Cat-R	TTGGCAAAGAATCCATCC	20	56.9			
HSP60	Hsp60.Cat-F	TCTACTGGTGCCGTGGTATTC	21	60.01	127	-	
	Hsp60.Cat-R	GTCCACGCATAAGCAAACAGT	21	60.19			
HSP70	qHsp70Cat-F	TCAATACCGAGGGACAAAGG	20	56.9	152	+	
	qHsp70Cat-R	ACGGTTCAGAACTGTTTGG	20	56.9			
HSP90	Hsp90.Cat-F	ATCTTGTCCTGGGATTGAG	20	60.07	184	-	
	Hsp90.Cat-R	AGCGGGTGAAAAGGTTACT	20	60			

Los probióticos tienen un efecto protector en los cultivos acuícolas de vertebrados e invertebrados. En este sentido, se observó que la adición de la mezcla de bacilos en el agua de cultivo de *A. ventricosus* aumentó significativamente la

expresión de los genes HSP70, PEL y qPUP a las 48 h post-inoculación respecto a las cero horas (control) (Fig. 29).

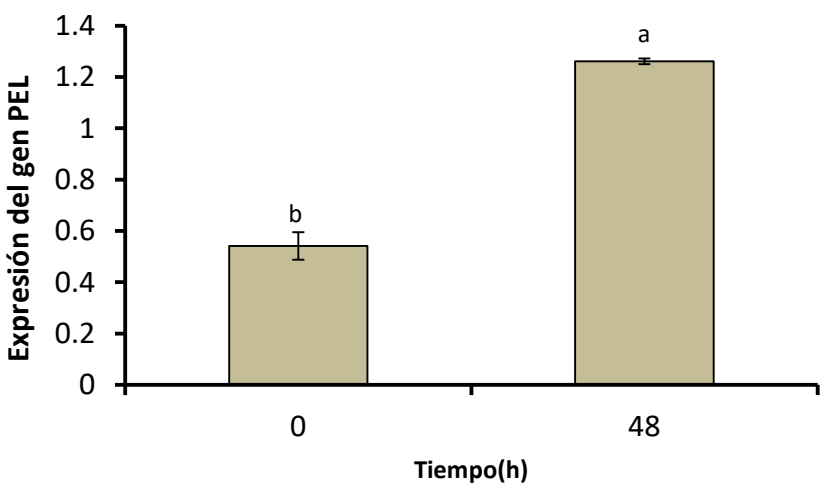
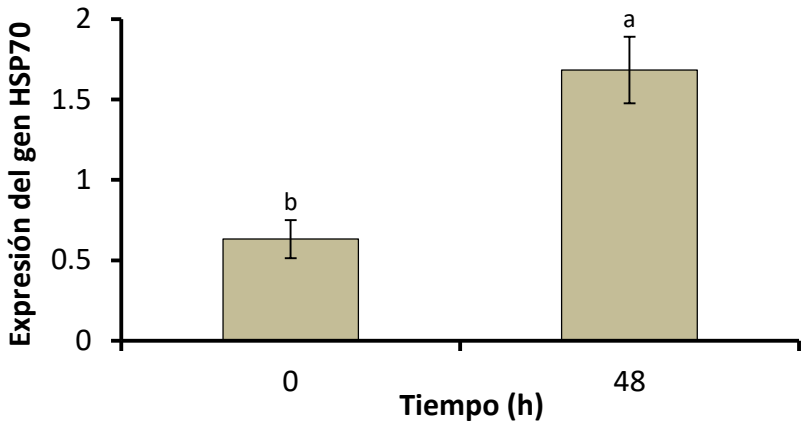
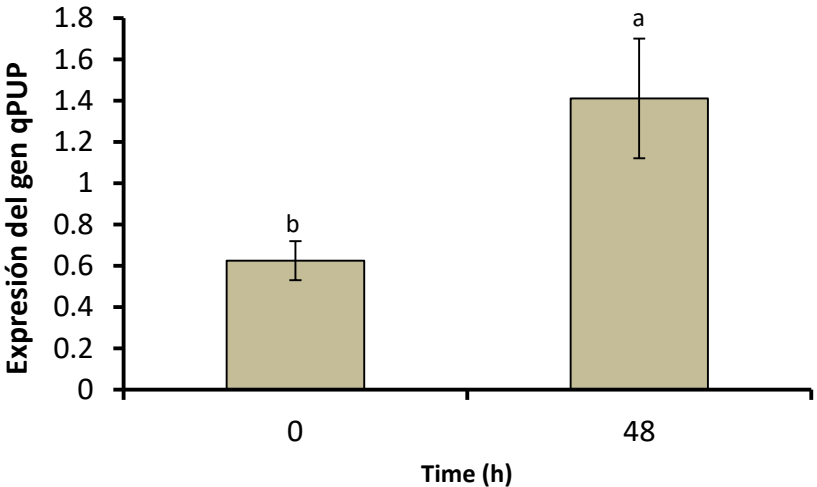


Figura 29. Expresión relativa de los genes relacionados con el sistema inmune HSP70, PEL y qPUP a las 0 y 48 h en *A. ventricosus* tratada con la mezcla de bacilos (1×10^6 UFC/L).

DISCUSIÓN

Susceptibilidad de *A. ventricosus* a *V. parahaemolyticus* y su concentración letal media

Este es el primer reporte sobre la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, el agente causal de AHPND en camarones peneidos, en moluscos bivalvos. Se observaron mortalidades y la CL_{50} obtenida en semillas fue de 623 UFC/mL, mientras que en adultos, la CL_{50} obtenida fue de 62,853 UFC/mL. Por otra parte, es importante señalar que en las semillas se observaron las primeras mortalidades a las 29 h, diferente a los adultos, donde se observaron mortalidades a las 125 h. Los síntomas de la enfermedad incluyeron valvas abiertas, cierre lento de valvas, manto suelto y no comer. Sin embargo, existen muchos reportes de la incidencia de mortalidades masivas causadas por bacterias del género *Vibrio* en cultivos de moluscos bivalvos. Lee *et al.* (2003) encontraron que *V. parahaemolyticus* es patogénico para abulones pequeños de la especie *Haliotis diversicolor supertexta* (cepa 880915). Gómez-León *et al.* (2005) demostraron que *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio splendidus* están asociadas a mortalidades masivas en larvas de *Ruditapes decussatus*. Prado *et al.* (2005, 2014) encontraron que *Vibrio neptunius* y *V. ostreicida* sp. no son patógenos para las larvas de la ostra *Ostrea edulis*. Garnier *et al.* (2007) encontraron que *V. aestuarianus* y *V. splendidus* están envueltas en la “mortalidad de verano” en adultos de *C. gigas* cultivado en Francia. Gómez-León *et al.* (2008) retaron larvas y juveniles de *C.*

virginica con bacterias patógenas (*Vibrio* spp. y *Roseovarius crassostreae*) y observaron que en los dos estadios de su ciclo de vida ocurrieron mortalidades importantes causadas los productos extracelulares y las células viables de las bacterias probadas. Elston *et al.* (2008) encontraron que durante 2006 y 2007, *Vibrio tubiashii* causó mortalidades en larvas y juveniles de *Crassostrea sikamea*, *C. gigas* y *Panopea abrupta* debido a que posee dos factores de virulencia, una proteasas y hemolisinas. Por último, Hasegawa *et al.* (2009) demostraron que las metaloproteasas producidas por *V. tubiashii*, *V. cholerae*, and *V. splendidus* es uno de los factores de virulencia que causa mortalidades en larvas de *C. gigas*. Rojas *et al.* (2015) identificaron tres cepas patógenas (cepas VPAP16, VPAP18 y VPAP23) de *V. splendidus* en semillas de *A. purpuratus*. Los cultivos sanos de larvas de almejas de 10 días mostraron porcentajes de mortalidad de 69.61 ± 3.35 %, 79.78 ± 6.11 % y 61.73 ± 3.71 % después de 48 h cuando se inocularon 1×10^6 UFC/mL de VPAP16, VPAP18 y VPAP23, respectivamente, y se evidenció que las concentraciones $\geq 10^4$ UFC/mL serían probablemente perjudiciales para el cultivo de larvas. Los principales signos clínicos observados en las larvas desafiadas durante 24 h fueron acumulaciones de bacterias en los márgenes de las larvas, extensión y desintegración del velo, desprendimiento de células del velo y necrosis del tejido digestivo. Como el presente trabajo es el primer informe de la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* en *A. ventricosus*. Rojas *et al.* (2015) informaron por primera vez la patogenicidad de *V. splendidus* en *A. purpuratus*.

A nivel tisular, la glándula digestiva de las almejas retadas mostró una diferencia notable de las almejas no retadas que mostraban epitelio normal de conductos y túbulos. En la fase aguda de la enfermedad, la morfología y el epitelio de

los túbulos y conductos y tejido conectivo fueron dañados y se observó infiltración hemocítica. Del mismo modo, Soto-Rodríguez *et al.* (2014) y Dabu *et al.* (2017) descubrieron descamación de células epiteliales tubulares de hepatopáncreas juveniles de camarón blanco en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, el curso temporal de la enfermedad fue diferente, en el camarón, las lesiones y la mortalidad ocurrieron en las primeras horas posteriores a la infección (Soto-Rodríguez *et al.*, 2014) y en las almejas esto ocurrió a los 5 días. En el camarón, el ataque bacteriano fue más rápido que la activación del sistema inmunológico (Soto-Rodríguez *et al.*, 2014), pero en las almejas el sistema inmune fue derrotado por la infección por *Vibrio* después de algunos días de lucha.

En este trabajo, las células de *V. parahaemolyticus* murieron por shock térmico a 60 °C, ya que se encontró que en esta especie la reducción de células cultivables a niveles no detectables se produce a 55 °C (OIE, 2013). Sin embargo, endotoxinas como LPS (Gorbet y Sefton, 2006) y exotoxinas PirA y PirB (Tinwongger *et al.*, 2016) son estables al calor y pueden activar la respuesta inmune.

Crecimiento de *A. ventricosus*, tratada con productos naturales, en un cultivo en el laboratorio

Respecto a la TCE se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, de igual manera en los datos registrados por las biometrías finales (peso, alto, largo y ancho) mostraron diferencias significativas entre tratamientos, por ejemplo, en cuanto a las variables peso, alto y ancho el mejor tratamiento fue el tratamiento II (MPAC). En cuanto a longitud los mejores tratamientos fueron el II (MPAC) y el IV (MPAC más inulina y ácido fúlvico). Por lo tanto, el adicionar los productos naturales mejora el crecimiento de la almeja *A. ventricosus*. Esto coincide con lo reportado por Aguilar-

Macías *et al.* (2010), en donde encontró un mayor crecimiento en juveniles de *Pinctada mazatlanica* al adicionar microorganismos probióticos

Supervivencia de *A. ventricosus*, cultivada en el laboratorio, tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*

En el presente trabajo encontramos que la supervivencia de la almeja *A. ventricosus* al ser tratada con productos naturales y retada con *V. parahaemolyticus*, es mayor que en los controles, esto coincide con lo reportado por Aguilar-Macías *et al.* (2010) en donde se probó el uso de una cepa de *Lactobacillus sp.*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura marina *Yarrowia lipolytica* en el cultivo de juveniles de *P. mazatlanica*, encontrando que al administrar los microorganismos, se presentó una mayor supervivencia y crecimiento a diferencia del grupo control no tratado con ningún aditivo probiótico, de un grupo tratado con antibiótico y uno más tratado con un probiótico comercial. Campa-Córdova *et al.* (2011) probaron el potencial probiótico de una bacteria ácido láctica y una mezcla de bacilos en la supervivencia y crecimiento larvario de *C. corteziensis*, encontrando mayor supervivencia con la mezcla de bacilos que con la bacteria ácido láctica, y que ambos tratamientos fueron mejores que los obtenidos en el grupo control, al cual no se le administró ningún probiótico. Respecto al uso de inulina y ácido fúlvico no existen reportes de su uso en cultivo de moluscos, sin embargo, Gutiérrez-Dagnino *et al.* (2015) estudiaron el efecto del prebiótico inulina y ácido fúlvico, adicionados en el alimento, en el crecimiento, supervivencia, prevalencia de WSSV y sistema inmune de *L. vannamei*, encontrando que los aditivos no afectan negativamente el crecimiento y protegen al camarón contra WSSV en organismos infectados con una carga viral relativamente alta.

Respuesta inmune, a nivel bioquímico, de A. ventricosus inyectada con V. parahaemolyticus

Para entender cómo los moluscos bivalvos se defienden de patógenos, como *V. parahaemolyticus*, es necesario comprender los mecanismos de defensa interna (efectores celulares y humorales). En estos organismos, los hemocitos juegan un papel importante en la defensa interna y la homeostasis (Hine, 1999), así como en la desintoxicación de contaminantes bióticos y abióticos (Donaghy *et al.*, 2009), y la variación en su número es un signo temprano de la respuesta inmune a la agresión (Tiscar y Mosca, 2004; Hannam *et al.*, 2010), como ocurrió en este trabajo con organismos adultos, donde a las 8 h después de desafiar con células de *Vibrio* muertas, el número de hemocitos disminuyó significativamente con respecto al tiempo cero (no infectadas), posiblemente debido a la lisis de las células (Tiscar y Mosca, 2004; Buggé *et al.*, 2007) o a su infiltración en los tejidos para reparar daños potenciales (Tiscar y Mosca, 2004; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Ramírez-Castillo *et al.*, 2011). Después de su disminución a las 8 h, el número de células aumentó significativamente a las 24 h, incluso con respecto al tiempo cero, lo cual es consistente con las observaciones en otras especies infectadas con patógenos, como *C. virginica* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010) y *Nodipecten subnodosus* (Ramírez-Castillo *et al.*, 2011). Los resultados sugieren que el aumento en el número de células se debió a la hipersíntesis de hemocitos después del desafío con el *Vibrio* ya que el área de las células disminuyó, lo que indica una abundancia de células inmaduras, como se observó en *N. subnodosus* desafiada con *V. alginolyticus* (Ramírez-Castillo *et al.*, 2011). A las 72 h, el número y el área de los hemocitos fue

similar al tiempo cero, lo que indica que la respuesta inmune regresó a la línea de base y que la mayoría de las células eran maduras.

Con respecto a la actividad fenoloxidasa, se encontraron diferencias significativas en los tiempos de muestreo. Se incrementó a las 8 h en respuesta a la estimulación bacteriana pero disminuyó a las 24 h debido a que la mayoría de las células eran inmaduras. Luna-González *et al.* (2003) encontraron actividad de de PO en el plasma adulto de cuatro diferentes especies de bivalvos, incluyendo *A. ventricosus*. Le Bris *et al.* (2015) estudiaron los cambios en la PO y la superóxido dismutasa (SOD) en dos tejidos (manto y hemolinfa) de la almeja manila, *Venerupis philippinarum*, desafiados con dos cepas de *Vibrio tapetis*, CECT4600T, el agente causante de la enfermedad del anillo marrón (BRD) y LP2 no patógeno para *V. philippinarum*. La infección bacteriana en *V. philippinarum* moduló la actividad de PO y SOD que fue dependiente de los tejidos y del tiempo. Se detectó una respuesta en los primeros tiempos en el manto y se asoció con aumentos significativos en las actividades de PO y SOD en las almejas retadas con LP2 y CECT4600T 36 h después de la inyección. En la hemolinfa, la respuesta fue tardía y se asoció con un aumento en la actividad PO y una disminución en la actividad SOD. Como la hemolinfa es un fluido circulante, este retraso de la respuesta puede deberse a un "tiempo de integración" que el organismo necesita para contrarrestar la infección.

Las enzimas hidrolíticas lisosomales son importantes mecanismos de defensa interna de los moluscos, ya que participan en la muerte y degradación del material fagocitado (Cheng *et al.*, 1981; Ramírez-Castillo *et al.*, 2011). En este trabajo, encontramos diferencias en la actividad de diferentes tipos de enzimas, detectadas por el kit API ZYM, así como entre los tiempos de muestreo encontrados

en *N. subnodosus* por Ramírez-Castillo *et al.* (2011). Nuestros resultados también concuerdan con los obtenidos por Estrada *et al.* (2013), quienes encontraron que algunos hemocitos eran inmunológicamente activos porque fagocitaban células de *Escherichia coli*. Los ensayos citoquímicos mostraron actividad de fosfatasa ácida, esterasa específica y esterasa inespecífica, enzimas comúnmente asociadas con lisosomas y actividad inmunológica. En este trabajo, la actividad de la lisozima en la hemolinfa aumentó significativamente, mostrando el valor más alto a las 8 h post-desafío y una tendencia a disminuir a las 24 h donde la mayoría de las células son inmaduras. Los resultados no coinciden con los encontrados por Ramírez-Castillo *et al.* (2011) en *N. subnodosus* infectados con *V. alginolyticus*, donde no se detectaron diferencias entre los tiempos.

En el análisis de proteínas, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos; sin embargo, se observó una disminución a las 8 h. La concentración de proteínas es importante porque muchas de ellas son inmunoproteínas (Campa-Córdova *et al.*, 2004).

Respuesta inmune a nivel genético de *A. ventricosus* tratada con bacilos en un cultivo en el laboratorio

La supervivencia de los invertebrados ante el ataque de patógenos depende de su capacidad para reconocerlos e inducir respuestas de defensa apropiadas (Janeway y Medzhitov, 2002). Los invertebrados, como *A. ventricosus*, no poseen un sistema inmune adaptativo (no producen anticuerpos ni células de memoria) como los vertebrados, por lo que su defensa contra un medio ambiente rico en microorganismos potencialmente patógenos descansa en un sistema inmune innato compuesto por efectores celulares (hemocitos) y humorales (enzimas hidrolíticas

lisosomales, péptidos antimicrobianos, superóxido dismutasa, catalasa, lisozima) (Zheng *et al.*, 2011; Gerdol, 2017). Con el objetivo de identificar genes del sistema inmune y genes relacionados en la almeja catarina, se realizó un primer análisis transcriptómico de las secuencias obtenidas mediante RNA-Seq ya que, a diferencia de otras especies de moluscos bivalvos, como *Mizuhopecten yessoensis* (Meng *et al.*, 2013), *Crassostrea virginica* (Zhang *et al.*, 2014), *Ruditapes decussatus* (Batista *et al.*, 2019), *Mytilus edulis* (Tanguy *et al.*, 2013), *Saccostrea glomerata* (Ertl *et al.*, 2016), *Chlamys farreri* (Zhan *et al.*, 2017 y *Mytilus galloprovincialis* (Rey-Campos *et al.*, 2019), este tipo de estudios no se han reportado.

En el análisis de la calidad de la secuenciación, se observó que había más de un 90 % de rRNA contaminante, que estaba presente desde la elaboración de la librería de cDNA, lo anterior se observó con el mapeo de las lecturas contra el ensamblado previo con 51,033670 lecturas crudas (Trinity) (como un genoma de referencia) con Bowtie2. A pesar de lo anterior, se obtuvieron 82,457 contigs, tal número es relativamente similar al obtenido en otros moluscos bivalvos como *M. yessoensis* (112,265,296 lecturas crudas, 194,839 contigs) (Meng *et al.*, 2013) y *C. virginica* (52,857,842 lecturas crudas, 61,147 contigs) (Zhang *et al.*, 2014) o incluso más alto que el reportado en mejillón *M. galloprovincialis* (57,059,700 de lecturas crudas, 21,193 contigs) (Gerdol *et al.*, 2014). En el análisis del transcriptoma de la almeja Catarina se obtuvo que la longitud promedio de las lecturas crudas (74 pb) y los contigs (1016 pb) obtenidos fueron similares o diferentes a los de *Crassostrea virginica* (90 pb y 874 pb, respectivamente) (Zhang *et al.*, 2014), *M. yessoensis* (93 pb y 461 pb, respectivamente) (Meng *et al.*, 2013), *M. galloprovincialis* (94 pb y 771

pb, respectivamente) (Gerdol *et al.*, 2014) y *Cristaria plicata* (126 pb y 731 pb, respectivamente) (Patnaik *et al.*, 2016).

La función de los transcritos se caracterizó a través de la asignación de los términos de ontología génica. La ontología génica (GO) es un sistema de clasificación funcional internacional, cuyos términos se usaron para clasificar los genes anotados de *A. ventricosus* respecto a sus funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos.

Dentro de los genes anotados con términos GO se observó una amplia variedad de categorías funcionales representadas en el nivel 2 de de la base de datos GO que corresponden a funciones moleculares (9 términos GO), componentes celulares (10 términos GO) y procesos biológicos (17 términos GO). En la categoría de funciones moleculares, la mayoría de los términos correspondieron a genes de unión y actividad catalítica lo que coincide con lo reportado en *M. yessoensis* (Meng *et al.*, 2013) pero es contrario a lo reportado en *M. edulis* (Tanguy *et al.*, 2013) donde predominaron los términos de actividad catalítica por sobre los de unión. En los componentes celulares predominaron los términos células, organelos y complejos macromoleculares de manera similar a lo encontrado en *M. yessoensis* (Meng *et al.*, 2013) para el término células; sin embargo, no hay coincidencia respecto a los términos organelos y complejos macromoleculares ya que en *M. yessoensis* el segundo y el tercer término más abundante fue intracelular y citoplasma, respectivamente. En *M. edulis* predominaron los términos células, intracelular y membranas (Tanguy *et al.*, 2013). En los procesos biológicos, la mayoría de los términos correspondió a genes de procesos celulares, procesos metabólicos y regulación biológica lo que coincide con lo encontrado en *M. yessoensis* (Meng *et al.*,

2013) Pero difiere con lo encontrado por Tanguy *et al.* (2013) en *M. edulis*, donde los términos que predominaron fueron los metabólicos y celulares, respectivamente. Se obtuvieron 330 genes relacionados con el sistema inmune con la anotación con NCBI nr en comparación con los 62 genes obtenidos por Zhang *et al.* (2014) en *C. virginaca* en la misma base de datos. El sistema de clasificación funcional internacional GO para *A. ventricosus* sugirió similitudes con los términos GO de secuencias de *Patinopecten yessoensis* (Hou *et al.*, 2011), *Crassostrea hongkongensis* (Tong *et al.*, 2015) y *Cristaria plicata* (Patnaik, 2016).

La información sobre los genes involucrados en la respuesta inmune de moluscos se ha incrementado. Sin embargo, la información existente es insuficiente (Moreira *et al.*, 2012). Por lo anterior, en este trabajo se hizo una anotación (KEGG) y se identificaron varias secuencias que mostraron homología con receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), rutas de señalización inmune, apoptosis y efectores inmunes en concordancia con lo encontrado en la ostra *Saccostrea glomerata* por Ertl *et al.* (2016). Se obtuvieron 491 genes relacionados con el sistema inmune con la anotación KEGG en comparación con los 895 obtenidos por Zhang *et al.* (2014) en *C. virginaca* en la misma base de datos.

En este trabajo, se obtuvieron más genes relacionados con el sistema inmune en KEGG (491) en comparación con NCBI (330). Lo anterior concuerda con lo obtenido por Zhang *et al.* (2014) en *C. virginaca* donde se observaron 895 con KEGG y 62 con NCBI nr.

El sistema de defensa innato se encuentra en plantas, hongos y todos los animales, es evolutivamente antiguo pero rápido y eficiente (Macagno *et al.*, 2010). Según Zhang *et al.* (2014), el sistema inmune innato de invertebrados es más

sofisticado que el sistema inmune innato de vertebrados, lo que le permite hacer frente a un ambiente acuático rico en patógenos potenciales. Los moluscos bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto, y los hemocitos se encuentran en la hemolinfa o en los tejidos, respectivamente, como células circulantes o infiltradas (Song *et al.*, 2010). Los hemocitos poseen receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRPM) (Zheng *et al.*, 2011) presentes en los patógenos como lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, peptidoglucanos de bacterias Gram positivas y negativas, β -1,3-glucanos de hongos, ADN bacteriano y ARN viral (Kawasaki *et al.*, 2011; Anjugam *et al.*, 2016; Tatematsu *et al.*, 2018). El reconocimiento de los patrones moleculares de patógenos (PMP) desencadena una respuesta inmune variada en los invertebrados (Anjugam *et al.*, 2016). En este trabajo se encontraron varios RRPM en la almeja Catarina como son receptores tipo Toll, molécula de adhesión celular síndrome Down (DSCAM, por sus siglas en inglés), receptor de manosa de macrófagos, colectina, proteína de reconocimiento de peptidoglucanos, galectinas, estabilina, ficolinas, entre otras. La mayoría de los RRPM encontrados se expresan en otros moluscos como *Argopecten irradians* (Song *et al.*, 2011), *Mytilus edulis* (Philipp *et al.*, 2012), *Pinctada margaritifera* (Teaniniuraitemoana *et al.*, 2014), *Crassostrea virginica* (Zhang *et al.*, 2014), *Venerupis philippinarum* (Mu *et al.*, 2014); *Crassostrea gigas* (Huang *et al.*, 2015), *Chlamys farreri* (Song *et al.*, 2015) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Los receptores tipo Toll son glucoproteínas de membrana (transmembranales) que tienen una función muy importante en la respuesta inmune de invertebrados y vertebrados (Bowie y O'Neill, 2000; O'Neill *et al.*, 2013). Los receptores tipo Toll típicos son proteínas que contienen un dominio de repeticiones

ricas en leucina (LRR), un dominio transmembranal y un dominio del receptor citoplásmico Toll/IL-1 (TIR). El dominio LRR interviene en el reconocimiento de patógenos, mientras que el dominio TIR interactúa con los adaptadores de transducción de señales e inicia la señalización (Takeda *et al.*, 2003). Existen 12 familias de receptores tipo Toll (Bowie y O'Neill, 2000), TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lípidos, mientras que los receptores TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos (Akira *et al.*, 2006). Los receptores tipo Toll han sido identificados en *C. farreri* (Qiu *et al.*, 2007), *Bathymodiolus azoricus* (Bettencourt *et al.*, 2010), *C. gigas* (Zhang *et al.*, 2011), *M. edulis* (Philipp *et al.*, 2012), *C. virginica* (Zhang *et al.*, 2014), *Pecten maximus* (Pauletto *et al.*, 2014), *Cyclina sinensis* (Ren *et al.*, 2016) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Las moléculas DSCAM se encuentran en vertebrados e invertebrados. En invertebrados se estudiaron primero en *Drosophila melanogaster* (Watson *et al.*, 2005). DSCAM se unen a la superficie de los patógenos (Watson *et al.*, 2005) y están asociadas a la fagocitosis (Wang y Wang, 2013). Al igual que en *A. ventricosus*, DSCAM se expresa también en *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Las ficolinas (proteína relacionada al fibrinógeno o lectina de unión a manosa) son proteínas solubles que se unen a carbohidratos en patógenos y activan el sistema del complemento y en moluscos se encontraron por primera vez transcritos en *Crassostrea hongkongensis* (Xiang *et al.*, 2014) y han sido detectados en otros moluscos como *C. gigas* (Zhang *et al.*, 2012), *Pecten maximus* (Pauletto *et al.*, 2014) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Las proteínas de reconocimiento de peptidoglucanos se unen a los peptidoglucanos de bacterias (Royet *et al.*, 2011) y en moluscos se han identificado

transcritos en *Argopecten irradians* (Su *et al.*, 2007), *C. farreri* (Yang *et al.*, 2010) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Después del reconocimiento de los PMP, el dominio TIR intracelular del receptor tipo Toll se dimeriza y recluta adaptadores como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) que desencadena una cascada de activación en el citoplasma que implica a miembros de la familia IRAK y el factor nuclear kappaB que se transloca al núcleo y activa varios genes de la respuesta inmune (Silverman *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). Transcritos de esta vía de señalización de han encontrado en bivalvos como *M. edulis* (Toubiana *et al.*, 2013), *M. galloprovincialis* (Toubiana *et al.*, 2014), *C. sinensis* (Ren *et al.*, 2016) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

En *A. ventricosus* se encontraron secuencias de moléculas (pellino, TOLLIP, IRAK1BP1, SOCS, NFKBIL1 y HSPs) involucradas en la regulación de las vías de señalización de los receptores tipo ToLL similares a las encontradas en *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

En los bivalvos, la fagocitosis es un importante mecanismo de defensa, siendo los hemocitos (efectores celulares) los encargados de la misma. La internalización y destrucción de microorganismos o células se da gracias al reconocimiento de éstos por los receptores (TLRs, receptor de manosa y estabilin-2) de hemocitos (Malagoli *et al.*, 2007; Underhill y Goodridge, 2012; Flanagan *et al.*, 2012). Las especies reactivas del oxígeno (ERO) que se producen durante la fagocitosis en la explosión respiratoria con incremento del consumo del oxígeno intracelular. La producción de ERO es un mecanismo dependiente de la NADPH oxidasa. Los EROS son moléculas oxidantes que oxidan componentes de células

microbianas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos); sin embargo, para evitar el daño en el hemocito que los produce existen antioxidantes como minerales, carotenoides, glutatión, enzimas como la SOD, catalasa, glutatión peroxidasa y proteínas redox como glutaredoxin, thioredoxin, peroxiredoxin y glutatión transferasa (Flanagan *et al.*, 2012; Birben *et al.*, 2012). Al igual que en este trabajo, transcritos del sistema antioxidante se han demostrado en otros moluscos bivalvos como *C. virginica* (Jenny *et al.*, 2002), *Ruditapes decussatus* (Leite *et al.*, 2013), *Pinctada fucata* (Kuchel *et al.*, 2012), *C. gigas* (Trevisan *et al.*, 2012) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

Durante el proceso de fagocitosis de un microorganismo se forma el fagosoma, el cual se une a los lisosomas para formar el fagolisosoma, el cual tiene un pH ácido (4.0-4.5) y en el que se pueden encontrar cathepsinas, anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, radicales del nitrógeno, enzimas hidrolíticas lisosomales, proteínas y péptidos antimicrobianos y lisozimas que contribuyen a la digestión intracelular (Yang *et al.*, 2013; Ertl *et al.*, 2016). Las enzimas hidrolíticas como la lisozima y otras tienen propiedades líticas ya que degradan los peptidoglucanos de la pared celular de bacterias (Xue *et al.*, 2010). Los péptido antimicrobianos como la defensina grande son efectores inmunes muy importantes por su actividad bactericida y efectos inmunomoduladores (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Las catepsinas son proteasas que degradan proteínas en el fagolisosoma y en los moluscos se han encontrado del tipo cisteína, aspártico y serinas (Conus y Simon, 2008; Guha y Pad, 2008; Turk *et al.*, 2012). Además de este trabajo, transcritos de proteínas y péptidos antimicrobianos se han encontrado en otros bivalvos como *Mactra veneriformis* (Fang *et al.*, 2013), *Sinonovacula constricta* (Niu *et al.*, 2014) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016).

La muerte celular programada o apoptosis es importante en la homeostasis y la respuesta inmune ya que remueve células dañadas sin que haya inflamación (Hughes *et al.*, 2010). Sin embargo, los mecanismos moleculares no están bien estudiados en moluscos (Zhang *et al.*, 2014). Algunos de los genes de apoptosis encontrados en *A. ventricosus* (Caspasas, Bcl-2, BAX, IAPs, TNF, FADD, IFI27 y AIF) también están presentes en *C. virginica* (Zhang *et al.*, 2014) y *S. glomerata* (Ertl *et al.*, 2016). Al respecto, Zhang *et al.* (2014) mencionan que la regulación de la apoptosis por los genes mencionados es crítica en la respuesta inmune de la ostra contra patógenos intracelulares como parásitos y virus.

En este trabajo, se demostró por primera vez, un aumento en la expresión de tres genes relacionados con el sistema inmunológico de la almeja Catarina (molusco bivalvo). Las proteínas HSP se expresan durante el estrés por calor, el estrés oxidativo, la desnutrición, las infecciones virales y bacterianas, entre otras condiciones estimulantes (Asea *et al.*, 2007; Hickey y Singer, 2004; Multhoff, 2007), pero también se ha observado que tienen un papel en la respuesta inmune como chaperones (Spagnolo *et al.*, 2007). Lacoste (2001) demostró que la expresión de proteínas de choque térmico (hsp) es un mecanismo homeostático inducido en células procarióticas y eucariotas en respuesta a ataques metabólicos y ambientales. En su estudio, examinó el efecto de la noradrenalina (NA) en la respuesta de hsp70 en células inmunes de moluscos (ostra y abulón). Los resultados demuestran que la exposición a NA conduce a la inducción del promotor del gen hsp70 tanto en las células inmunes de los gastrópodos como en las bivalvas. De Silva (2017) demostró la inducibilidad de HSP70 de *Biomphalaria glabrata* por el cadmio, un contaminante ambiental relevante, a niveles no letales, proporcionando evidencias de que la

evaluación de HSP70 en *B. glabrata* puede considerarse un biomarcador adecuado para estudios ecotoxicológicos. Laranja *et al.* (2017) realizaron un estudio sobre las postlarvas del camarón *P. monodon*, donde alimentaron a los organismos con *Artemia* enriquecida con *Bacillus* sp. JL47 y los retaron con *Vibrio campbelli*. Encontraron que antes del desafío no había diferencias significativas en la expresión de HSP70 respecto al control (sin *Bacillus* sp. JL47). Lo anterior, difiere con lo encontrado en este trabajo donde si hay diferencias significativas en la expresión de HSP70 entre el control y el tratamiento *Bacillus*. Werner y Hinton (1999) encontraron que tanto el aumento como la disminución en la regulación de las proteínas HSP70 pueden ser un indicador de estrés en la almeja asiática (*Potamocorbula amurensis*). Sánchez *et al.* (2015) encontró una subexpresión del gen HSP70 en *L. vannamei* en tratamientos en los que se agregaron bacterias potencialmente probióticas, lo que sugiere un menor nivel de estrés, pero también una respuesta derivada del efecto inmunoestimulador de la mezcla bacteriana, que también difiere de los resultados obtenido en este trabajo.

El qPUP es una molécula similar a la proteína de unión a peptidoglicano que participa en la respuesta inmune innata por la degradación de la pared formada por peptidoglicanos en las bacterias. En el pez *Oplegnathus fasciatus*, PUP, tiene una función muy importante en la aglutinación de las bacterias Gram (-) y Gram (+) y promueve la fagocitosis en los leucocitos (Choi *et al.*, 2018). Con respecto a la molécula PEL, se descubrió en 2015 que está involucrada en la proliferación de linfocitos en humanos; sin embargo, en peces, crustáceos y moluscos no hay trabajo, por lo que este sería el primer reporte sobre invertebrados.

CONCLUSIONES

- 1.- La almeja Catarina es susceptible a *V. parahaemolyticus*, el agente causal de AHPND en el camarón.
- 2.- Los aditivos naturales mejoran el crecimiento de semillas de *A. ventricosus*.
- 3.- Los aditivos naturales aumentaron un 35 % la supervivencia de semillas de *A. ventricosus* retadas con *V. parahaemolyticus* por inmersión.
- 4.- La respuesta inmune, a nivel bioquímico, de *A. ventricosus* fue modulada por *V. parahaemolyticus*.
- 5.- Se obtuvieron 82,457 contigs, de los cuales 31,120 (37.74 %) se anotaron contra la base de datos de proteínas del NCBI-nr.
- 6.- Se detectaron al menos 491 transcritos relacionados con el sistema inmune. Además, con la anotación funcional, se demostró que la almeja Catarina cuenta en su genoma y expresa genes que codifican para receptores de reconocimiento de patrones moleculares (RRPMs), rutas de señalización inmune, efectores inmunes y de apoptosis, entre otros.
- 6.- Este es el primer reporte sobre transcritos de genes involucrados en la respuesta inmune de *A. ventricosus* (491) que permiten dilucidar la complejidad de su sistema inmune innato, el cual le permite adaptarse a la vida en un ambiente rico en patógenos potenciales.
- 7.- La mezcla de bacilos en el agua de cultivo de *A. ventricosus* aumentó significativamente la expresión de los genes HSP70, PEL y qPUP. Lo cual significa que las bacterias probióticas empleadas inmunoestimulan a la almeja catarina.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Macías, O.L.; J.J. Ojeda-Ramírez; A.I. Campa-Córdova & P.E. Saucedo. 2010. Evaluation of natural and comercial probiotics for improving growth and survival of the Pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *Journal of the WAS* 41(3): 447-454.
- Aguirre-Guzmán, G.; M. Lara-Flores; J.G. Sánchez-Martínez; A.I. Campa-Córdova & A. Luna-González. 2012. The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6(623): 4845-4857.
- Aguirre-Rodríguez, J.C.; M.T. Quesada-Molinos & J. Linares-Martín. 2011. Dolor precordial en atención primaria: a propósito de un caso. *Medicina de familia. SEMERGEN* 37(2): 102-106.
- Aiken, G.R.; D.M. McKnight. 1985. Humic Substances in Soil, Sediment, and Water. *Geochemistry, Isolation, and Characterization*. New York, John Wiley & Sons.
- Akira, S.; S. Uematsu & O. Takeuchi. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Allam, B. & C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33:123-128.
- Andersen, C. L.; J.L. Jensen & T.F. Orntoft. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64 (15): 5245-5250.
- Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

- Anjugam, M.; B. Vaseeharan; A. Iswarya; M. Divya & G. Sargunar. 2016. Involvement of Pattern Recognition Proteins in Invertebrate Immune System. *J. Fish. Soc. Taiwan* 43(4): 297-311.
- Auffret, M. 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 169-177.
- Avendaño, R.E. & C. Riquelme. 1999. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquac. Res.* 30: 893-900.
- Bachère, E.; D. Chagot & H. Grizel. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 549-559.
- Bachère, E.; E. Mialhe; D. Noël; V. Boulo; A. Morvan & J. Rodríguez. 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132: 17-32.
- Baqueiro, C.E.; R.I. Peña & J. Massó. 1981. Análisis de una población sobreexplotada de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en la Ensenada de la Paz, B. C. S., México. *Cienc. Pesq.* 1(2): 57-65.
- Barbosa, V.; A. Luna-González; G. Aguirre-Guzmán; C. Riquelme & F. Ascencio-Valle. 2001. Enfermedades microbianas de pectínidos cultivados en Iberoamérica, In: Maeda-Martínez, A. N (Ed), *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*, Limusa. Mexico, pp. 325-342.
- Batista, F.M.; A.M. Churcher; M. Manchado, A. Leitao & D.M. Power. 2019. Uncovering the immunological repertoire of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* through a transcriptomic-based approach. *Aquaculture and Fisheries* 4: 37–42.

- Bayne, C.J.; T. Sminia & W.P.W. Van der Knaap. 1980. Immunological memory: status of molluscan studies. En : “ Phylogeny of immunological memory”. Elsevier.
- Beaz-Hidalgo, R.; S. Balboa; S. Romalde & J.L. Figueras. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve mollusks. *Environmen Microbiol Rep.* 2(1): 34-43.
- Bettencourt, R.; M. Pinheiro; C. Egas; P. Gomes; M. Afonso & T. Shank. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics.* 2010; 11:559.
- Birben, E.; U. M. Sahiner; C. Sackesen; S. Erzurum & O. Kalayci. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5(1):9–19.
- Bolger, A.M.; M. Lohse, & B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In *Bioinformatics*, 30 (15), pp. 2114-2120.
- Borrego, J.J., D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M.T. García & A. Ventosa. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov. the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 480-484.
- Bowie, A. & L. A. O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.* 67, 508–514.
- Braby, C.E. & G.N. Somero. 2006. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *J. Exp. Biol.* 209: 2554-2566.
- Bradford, M.M. 1976. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Bricelj, V.M.; J. Epp & R.E. Malouf. 1987. Intraspecific variation in reproductive and somatic growth cycles of bay scallops *Argopecten irradians*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 36: 123-137.
- Buggé, D.M.; H. Hégaret; G.H. Wikfors & B. Allam, B. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 23(1): 188-196.
- Cajaraville, M.P.; S.G. Pal. 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. Cell Struct. Funct. 20, 355-67.
- Campa-Córdova, A.I.; A. Luna-González; J.M. Mazón-Suástegui; G. Aguirre-Guzmán; F. Ascencio & H.A. González-Ocampo. 2011. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión del placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). Rev. Biol. Trop.. 59(1): 183-191.
- Canicatti, C.1990. Distribution d'une activite lysozymiale dans un echinoderme holothuroide, *Holothuria polii*, et dans les oeufs et les larves d'un echinoderme echinoide, *Paracentrotus lividus*. Eur. Arch. Biol. 101, 309–318.
- Carstensen, D.; J.M. Riascos; O. Heilmayer; W.E. Arntz & J. Laudien. 2010. Recurrent, thermally-induced shifts in species distribution range in the Humboldt current upwelling system. Mar. Environ. Res. 70: 293-299.
- Carballal, M.J.; C. López; C. Azevedo & A. Villalba. 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol. 70: 96–105.
- Cascales, E. 2008. The type VI secretion tool kit. EMBO Rep. 9, 735–741.

- Chang, Q.; Z. Lu; M. He; R. Gao; H. Bai; B. Shi & A. Shan. 2014. Effects of dietary supplementation of fulvic acid on lipid metabolism of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 2014.92:4921-4926.
- Cheng, T.C. 1981. Bivalves. En: "Invertebrate blood cells". Academic Press, London.
- Cheng, T.C. 1984. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. En: "Comparative Pathobiology. Invertebrate blood cells and serum factors".
- Chen, T.W.; R.G. Ruei-Chi, T. Wu; H. Po-Jung; L. Cheng-Yang; M.C. Yi-Ywan; C. Che-Chun & T. Petrus. 2012. FastAnnotator: an efficient transcript annotation web tool. *BMC Genomics* 13: Suppl 7, S9.
- Clark, M.S.; M.A. Thorne; F.A. Vieira; J.C. Cardoso; D.M. Power & L.S. Peck. Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 11: 362- 2010
- CONAPESCA. 1998. Anuario. Cultivo de la almeja catarina.
- Contreras-Espinosa, F. 1993. Ecosistemas Costeros Mexicanos. UAM-CONABIO. México, D.F. 415 pp.
- Conus, S. & H. U. Simon. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76:1374–82.
- Costa-Portela, M. 2008. Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis*. Tesis de Doctorado. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto de Investigaciones Marinas.

- Dabu, I.M.; J.J. Lim; P.M.T. Arabit; S.J.A.B. Orense; J.A. Tabardillo; V.L. Corre & M.B.B. Maningas. 2017. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquac. Res.* 48(3), 792-799.
- Destoumieux, D.; M. Muñoz; C. Cosseau; J. Rodríguez; P. Bulet; M. Comps & E. Bachère. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Sci.*, 113: 461-469.
- Des-Voigne, D.M. & A.K. Spark. 1968. The process of wound healing in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Invertebr. Pathol.* 12, 23-65.
- Des-Voigne, D.M. & A.K. Sparks. 1969. The reaction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, to homologous tissue implants. *J. Invertebr. Pathol.* 14, 293-300.
- Donaghy, L.; E. Kraffe; N. Le Goïc; C. Lambert; A.K. Volety & P. Soudant. 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7, e46594.
- Elston, R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *Journal of the WAS*, 15 (1-4): 284-300.
- Elston, R.A.; H. Hasegawa; K.L. Humphrey; I.K. Polyak & C.C. Häse. 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis. Aquat. Organ.* 82: 119-134.
- Ertl, N. G.; W. A. O'Connor; A. Papanicolaou; A. N. Wiegand & A. Elizur. 2016. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *PLoS ONE* 11(6): e0156649. doi:10.1371/journal.pone.0156649

- Escamilla-Montes, R. 2012. Cultivo del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) en el estero San Buto, Baja California Sur, México. Tesis de Doctorado. CIMACO-UABCS. La Paz, B. C. S., 232 P.
- Escobedo-Urías, D.; A. Jiménez-Illescas; A. Martínez-López; M.T. Hernández-Real; A. Reyes-Salinas; N. Herrera-Moreno; A.A. Ulloa-Pérez; P. Álvarez-Ruiz; A. Zavala Norzagaray & Y. Chiquete-Ozono. 2003. Dinámica oceanográfica de la laguna de Navachiste, Sinaloa. Pp. 19 in Resúmenes del IX Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés AC y III Simposio Internacional Sobre el Mar de Cortes, La Paz, B.C.S. 5-9 mayo.
- Estrada, N.; E. Velázquez; C. Rodríguez-Jaramillo & F. Ascencio. 2013. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Immunobiology*. 218 (8): 1093-1103.
- Fang, Y.; H. Yang; B. Liu & L. Zhang. Transcriptional response of lysozyme, metallothionein, and superoxide dismutase to combined exposure to heavy metals and bacteria in *Macrta veneriformis*. *Comp Biochem Physiol C, Comp Pharmacol Toxicol*. 2013; 157(1):54–62.
- FAO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *Food and Nutrition Paper*. 85:1-50.
- FAO. 2014. Fishery information (year book of fishery statistics).
- Farley, C.A. 1968. *Minchinia nelsoni* (Haplosporidia) disease syndrome in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Protozool*. 15, 585-599.
- Félix-Pico, E., 1993. Estudio biológico de la almeja catarina, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en Bahía Magdalena, B.C.S., México.

- Feng, S.Y. 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 18, 153-168.
- Finney, D.J. 1952. Probit Analysis. Cambridge University, Cambridge, England.
- Fisher, W.S. 1986. Structure and functions of oyster hemocytes. En "Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions". Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Flannagan, R. S.; V. Jaumouillé & S. Grinstein. The cell biology of phagocytosis. Annu Rev Pathol. 2012; 7:61–98.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. The J. of Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- Garber, M.; M. Grabherr; M. Guttman & C. Trapnell. 2011. Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification using RNA-seq. Nature Methods 8: 469–477.
- García, E. 1973. *Modificaciones al sistema de clasificación climática Koeppen*. Segunda edición, Instituto de Geografía, UNAM, México.
- Garnier, M.; Y. Labreuche; C. García; M. Robert & J.L. Nicolas. 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microb. Ecol. 53, 187-196.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquac. Res. 180, 147–165.
- Gerdol, M.; G. De Moro; C. Manfrin; A. Milandri; E. Riccardi; A. Beran; P. Venier & A. Pallavicini. 2014. RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. BMC Research Notes 2014, 7:722.

- Gerdol, M. 2017. Immune-related genes in gastropods and bivalves: A comparative overview. *Invertebrate Survival Journal* 14: 95-111.
- Gibson, G.R. & M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.
- Gismondo, M.R.; L. Drago & A. Lombardi. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 12: 287-292.
- Glinski, Z. & J. Jarros. 1997. Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 45, 149-155.
- Gómez-Gil, B.; A. Roque & J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquac. Res.* 191(1-3): 259-270.
- Gómez-León, J.; L. Villamil; M.L. Lemos & B. Novoa. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 98-104.
- Gómez-León, J.; L. Villamil; S.A. Salger; R.H. Sallum; A. Remacha-Triviño; D.F. Leavitt & M. Gómez-Chiarri. 2008. Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis. Aquat. Org.* 79, 95-105.
- Gorbet, M.B. & M.V. 2006. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials* 26, 6811-6817.
- Grabherr M.G.; B.J. Haas; M. Yassour; J.Z. Levin; D.A. Thompson; I. Amit; X. Adiconis; L. Fan; R. Raychowdhury; Q. Zeng; Z. Chen; E. Mauceli; N. Hacohen; A. Gnirke; N. Rhind; F. di Palma; B.W. Birren; C. Nusbaum; K.

- Lindblad-Toh; N. Friedman & A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. [Nat Biotechnol. 2011 May 15;29\(7\):644-52](#). doi: 10.1038/nbt.1883.
- Grizzle, R.E. & P.J. Morin. 1989. Effects of tidal currents, seston and bottom sediment on growth of *Mercenaria mercenaria*: results of a field experiment. *Mar. Biol.* 102: 85-93.
- Guaní-Guerra, E.; T. Santos-Mendoza; S. O. Lugo-Reyes & L. M. Teran. 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 135, 1–11.
- Guha, S. & H. Padh. Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J Biochem Biophys.* 2008; 45:75–90. PMID
- Gutiérrez-Dagnino, Anayeli; A. Luna-González; J.A. Fierro-Coronado; P. Álvarez-Ruiz; M. Flores-Miranda; S. Miranda-Saucedo; V. Medina-Beltrán & R. Escamilla-Montes. (2015). Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. *Lat. Am. J. Aquac. Res.*, 43(5), 912-921. <https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-11>
- Gurevich, A.; V. Saveliev; N. Vyahhi & G. Tesler. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29(8): 1072-1075.
- Haas B.J.; A. Papanicolaou; M. Yassour; M. Grabherr; P.D. Blood; J. Bowden; M.B. Couger; D. Eccles; B. Li; M. Lieber; M.D. Macmane; M. Ott; J. Orvis; N. Pochet; F. Strozzi; N. Weeks; R. Westerman; T. William; C.N. Dewey; R. Henschel; R.D. Leduc; N. Friedman & A. Regev. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference

- generation and analysis. Nat Protoc. 2013 Aug;8(8):1494-512. doi: 10.1038/nprot.2013.084.
- Hannam, M.L.; S.D. Bamber; T.S. Galloway; A.J. Moody & M.B. Jones. 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78: 779-784.
- Harris, J.M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecology* 25: 195-231.
- Hasegawa, H.; D.N. Gharaibeh; E.J. Lind & C.C. Häse. 2009. Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 85: 123-131.
- Hernández-López, J.; T. Gollas-Galván & F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* 113: 61–66.
- Hidalgo, C.; A. Mas & M.J. Torija. 2012. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiol.* 30(1), 98-104.
- Hine, P.M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9: 367–385.
- Hou, R.; Z. Bao; S. Wang; H. Su; Y. Li; H. Du; et. al. 2011. Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. *PLoS ONE* 6: e21560.
- Howart, D.W. & C. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. U. S. dep. Comm., NOAA, Tech. Men. NMFS-F/NEC-25. 102.

- Huan, P.; H. Wang & B. Liu. 2012. Transcriptomic analysis of the clam *Meretrix meretrix* on different larval stages. *Mar. Biotechnol.* 14: 69-78, 2012.
- Huang, J.; Y. Yang & A. Wang. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 240-244.
- Huang, B.; L. Zhang; L. Li; X. Tang & G. Zhang. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immun.* 2015;43:485–490. doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.021.
- Hughes, F. M.; B. Foster; S. Grewal & I. M. Sokolova. 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol* 29(2):247–257
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. Cuarta Edición. W. H. Freeman & Co. San Francisco. 629 pp.*
- Islam, M.Z.; S. Yasmin; K.A. Malik; M.A. Sattar & F.Y. Hafeez. 2005. Potentials of PGPR to rice production in Bangladesh. Proceedings of the International Seminar on Rice Crop, held on 12 October, 2005 at Rice Research Institute, Lahore, Pakistan, pp. 87-96.
- Jenny, M. J.; A. H. Ringwood; E. R. Lacy; A. J. Lewitus; J. W. Kempton & P. S. Gross. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar Biotechnol.* 2002; 4:81–93.

- Jiravanichpaisal, P.; B.L. Lee & K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213-236.
- Johnson, P.T. & S.V. Otto. 1981. Histology of a bilateral gynandromorph of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun (Decapoda: Portunidae). *Biological Bulletin* 161: 236-245.
- Jorquera, M.A.; C.E. Riquelme; L.A. Loyola & L.F. Muñoz. 1999. Production of bactericidal substances by a marine vibrio isolated from cultures of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquac. Res.* 7: 433-448.
- Joubert, C.; D. Piquemal; B. Marie; L. Manchon; F. Pierrat; I. Zanella-Cléon; Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics* 11: 613-2010.
- Kanehisa, M.; S. Goto; M. Furumichi; M. Tanabe & M. Hirakawa. 2010. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.*, 38 (1): D355-D360.
- Karim, M.; W. Zhao; D. Rowley; D. Nelson & M. Gómez-Chiarri. 2013. Probiotic strains for shellfish aquaculture: protection of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. *J. Shellfish Res.* 32: 401–408.
- Kawasaki, T; T. Kawai & A. Shizuo. 2011. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunological Reviews* 243: 61–73.
- Keen, A.M. 1971. Sea shells of tropical West America. Marine molluscs from Baja California to Peru. California, Stanford Univ. Press, Stanford, 1125 pp.

- Kesarcodi-Watson, I.; M.M. Shivu; S.K. Girisha; G. Krohne & I. Karunasagar. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquac. Res.* 274:1-14.
- Kirby-Smith, W.1970. Growth of the scallops, *Argopecten irradians concentricus* and *Argopecten gibbus*, as influenced by food and temperature. Ph. D. Thesis, Duke University. 127 pp.
- Koch, V.; J.M. Mazon-Suastegui; F. Sinsel; M. Robles-Mungaray & D. Dunn. 2005. Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835) aquaculture in Bahía Magdalena, México: effects of population density and season on juvenile growth and mortality. *Aquaculture Res.* 36(5):505-512.
- Kongrueng, J.; S. Yingkajorn; N. Bunpa; K. Sermwittayawong & V. Vuddhakul. 2014. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish Dis.* <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12308>
- Köppen, W. 1900: Versuch einer Klassifikation der Klimate, vorzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt (Attempted climate classification in relation to plant distributions). *Geogr. Zeitschrift*, 6, 593-611, 657-679. map 1 and map 2.
- Kuchel, R. P.; S. Nair & D. A. Raftos. Changes in the transcriptional expression of oxidative stress response genes in Akoya pearl oysters (*Pinctada fucata*) exposed to air and mechanical agitation. *Aquaculture*. 2012; 362–363:33–8.
- Kunavue, N. & T.F. Lien. 2012. Effects of fulvic acid and probiotic on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters and immunity of pigs. *J. Anim. Sci. Adv.* 2:711–721.

- Lane, E. & T.C. Birkbeck. 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23, 275-279.
- Lambert, C.; P. Soudan; L. Dégremont; M. Delaporte; J. Moal; P. Boundry; F. Jean; A. Huvet & J.F. Samain. 2007. Haemocyte characteristics in families of oyster, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.
- Lane, E. & T.H. Birkbeck. 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Living. Resour.* 12, 343-350.
- Langmead, B.; C. Trapnell; M. Pop & S.L. Salzberg. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10(3): R25.
- Langmead, B. & S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4): 357-359.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. En: "Diseases of Marine Animals". Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg.
- Le Bris, C.; G. Richard; C. Paillard; C. Lambert; C. Segueineau; O. Gauthier; F. Pernet & F. Guérard. 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*-Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish & Shellfish Immunology.* 42: 16-24.
- Lee, K.K.; P.C. Liu & C.Y. Huang. 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes and Infection* 5, 481–485.

- Lee, C.T.; I.T. Chen; Y.T. Yang; T.P. Ko; Y.T. Huang; J.Y. Huang; M.F. Huang; S.J. Lin; C.Y. Chen; S.S. Lin; D.V. Lightner; H.C. Wang; A.H.J. Wang; H.C. Wang; L.I. Hor & C.F. Loa. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 112(34), 10798–10803.
- Leyton, Y. & C. Riquelme. 2008b. Use of specific bacterial-microalgal biofilms for improving the larval settlement of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) on three types of artificial spat-collecting materials. Aquac. Res. 276: 78-82.
- Lim, H.J.; D. Kapareiko; E.J. Schott; A. Hanif & G.H. Wikfors. 2011. Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: I. Isolation and screening for bioactivity. J. Shellfish Res. 30(3): 609-615.
- Lodeiros, C.; L. Freitas; M. Núñez & J. Himmelman. 1993. Growth of the Caribbean scallop *Argopecten nucleus* (Born 1780) in suspended culture. J. Shellfish Res. 12: 291-294.
- Longeon, A.; J. Peduzzi; M. Barthelemy; S. Corre; J.L. Nicolas & M. Guyot. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mar. Biotechnol.
- López, C.; M.J. Carballal; C. Azevedo & A. Villalba. 1997. Morphological characterization of the haemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). J. Inv. Pathol. 69, 51–57.
- Luna-González, A.; A.N. Maeda-Martínez; J.C. Sainz & F. Ascencio-Valle. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strains. Dis. Aquat. Organ. 49:221-226.

- Luna González, A. 2003. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa de moluscos bivalvos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
- Luna-González, A.; M. Romero-Geraldo; A. Campa-Córdova; J. Orduña-Rojas; R. Valles-Jiménez & C.A. Ruíz-Verdugo. 2008. Seasonal variations in the immunological and physiological parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía de Macapule (Sinaloa, Mexico). *Aquac. Res.* 39, 1488-1497.
- Luna-González, A.; A.N. Maeda-Martínez; F. Ascencio-Valle & M. Robles-Mungaray. 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 287–294.
- Luna-González, A.; J.C. Almaraz-Salas; J.A. Fierro Coronado; Ma. Del C. Flores-Miranda; H.A. González-Ocampo & V. Peraza-Gómez. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquac. Res.* 362-363: 28-32.
- Macagno, E.; T. Gaasterland; L. Edsall; V. Bafna; M. Soares; T. Scheetz; T. Casavant; C. Da Silva; P. Wincker; A. Tasiemski & M. Salzet. 2010. Construction of a medicinal leech transcriptome database and its application to the identification of leech homologs of neural and innate immune genes. *BMC Genomics* 11(1):407.
- Madrigal, L. & E. Sangronis. 2007. La inulina y derivados como ingredientes clave en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 57(4):387-396.

- Maeda, M.; K. Nogami; S. Kanematsu & Y. Kotani. 1997. Manipulation of microbial communities for improving the aquaculture environment. UJNR Technical Report. 24:125-130.
- Maeda-Martínez, A.N.; P. Ormart; L. Mendez; B. Acosta & M.T. Sicard. 2000. Scallop growout using a new bottom-culture system. Aquac. Res. (189): 73–84.
- Malagoli, D.; L. Casarini; S. Sacchi & E. Ottaviani. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Fish Shellfish Immunol. 2007; 23(1):171–7.
- Mann, R. 1979. Some biochemical aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 59: 95-110.
- Matozzo, V.; M. Pagano; A. Spinelli; F. Caicci & C. Faggio. 2016. Pinna nobilis: A big bivalve with big haemocytes? Fish Shellfish Immunol. 55, 529-534.
- Medina, B.; H.M. Guzman & J.M. Mair. 2007. Failed recovery of a collapsed scallop fishery in Las Perlas Archipelago, Panama. J. Shellfisheries Res. 26, 9-15.
- Meinelt, T.; K. Chreckenbach; K. Knopf; A. Wienke; A. Stuber & C.E.W. Steinberg. 2004. Humic substances affect constitution and sex ratio of *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). Aquat. Sci., 66: 239-245.
- Meng, X.I.; M. Liu; K.Y. Jiang; B.J. Wang; X. Tian; S.J. Sun; Z.Y. Luo; C.W. Qiu & L. Wang. 2013. De novo characterization of Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* transcriptome and analysis of its gene expression following cadmium exposure. PLoS ONE 8(5): e64485.
- Milan, M: A. Coppe; R. Reinhardt; L.M. Cancela; R.B. Leite; C. Saavedra; et al. 2011. Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam,

- Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. BMC Genomics 12: 234-2011.
- Mitta, G.; F. Vandenbulcke; F. Hubert; M. Salzet & P. Roch. 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. J. Biol. Chem. 275, 12954–12962.
- Moreira, R.; P. Balseiro; J. Planas; B. Fuste; S. Beltrán; B. Novoa; et al. 2012. Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. PLoS ONE 7(4): e35009
- Mount, A.S.; A.P. Wheeker; R.P. Paradkar & D. Snider. 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. Science. 304, 297-300.
- Mu, C.; L. Chen; J. Zhao & C. Wang. Molecular cloning and expression of a C-type lectin gene from *Venerupis philippinarum*. Mol. Biol. Rep. 2014;41:139–144. doi: 10.1007/s11033-013-2846-2.
- Narain, A.S. 1973. The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. Malacol. Rev. 6, 1-12.
- Niu, D.; S. Xie; Z. Bai; L. Wang; K. Jin & J. Li. Identification, expression, and responses to bacterial challenge of the cathepsin C gene from the razor clam *Sinonovacula constricta*. Development and Comparative Immunology. 2014; 46(2):241–5.
- OIE. 2013. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Etiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/Aquatic_Commission/AHPND_DEC_2013.pdf.

- O'Neill L. A.; D. Golenbock & A. G. Bowie. The history of toll-like receptors—redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:453–60.
- Qiu, L.; L. Song L; W. Xu; D. Ni & Y. Yu. Molecular cloning and expression of a toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immun* (2007) 22(5):451–66.
- Ostle, B. 1965. Estadística aplicada. Limusa-Wiley, México. 629 pp.
- Patnaik B.B.; T.H. Wang; S.W. Kang; H.J. Hwang; S.Y. Park & E.B. Park. 2016 Sequencing, De Novo Assembly, and Annotation of the Transcriptome of the Endangered Freshwater Pearl Bivalve, *Cristaria plicata*, Provides Novel Insights into Functional Genes and Marker Discovery. *PLoS ONE* 11(2): e0148622. doi:10.1371/journal.pone.0148622
- Pauletto, M.; M. Milan; R. Moreira; B. Novoa; A. Figueras; M. Babbuccia; T. Patarnello & L. Bargellonia. 2014. Deep transcriptome sequencing of *Pecten maximus* hemocytes: A genomic resource for bivalve immunology. *Fish & Shellfish Immunology* 37(1): 154–165.
- Plaza, C.; N. Senesi; A. Polo & G. Brunetti. 2005. AcidBase properties of humic and fulvic acids formed during composting. *Environ. Sci. Technol.*, 39:7141-7146.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Feed Techn.* 29:4-8.
- Pérez-Medina, D. R. 2005. Biología reproductiva de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arciidae) en el estero santo domingo, B.C.S., México. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN, La Paz, B. C. S., México. 86 p.
- Philipp, E.; L. Kraemer; F. Melzner; A. J. Poustka; S. Thieme & U. Findeisen. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene

- repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. PLoS ONE. 2012; 7(3):e33091. doi: [10.1371/journal.pone.0033091](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033091) PMID: [22448234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448234/)
- Prado, S.; J.L. Romalde; J. Montes & J.L. Barja. 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. Dis. Aquat. Organ. 67(3): 209-15.
- Prado, S.; J. Dubert; J.L. Romalde; A.E. Toranzo & J.L. Barja. 2014. *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1641-1646.
- Prieto, A.S.; M. Vásquez & L. Ruiz. 1999. Dinámica energética en una población del mejillón *Perna perna* (Filibranchia: Mytilidae) en el noreste del Estado Sucre, Venezuela. Rev. Biol. Trop. 47: 499-410.
- Ramírez-Castillo, E.; M. Arellano-Martínez; B.P. Ceballos-Vázquez; H.A. González-Ocampo; G. Aguirre-Guzmán & A. Luna-González. 2011. Immune Response of Lion's paw Scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) Challenged with *Vibrio alginolyticus*. Thai. J. Vet. Med. 2011. 41(4):425-432.
- Ratcliffe, N.A.; A.F. Rowley; S.W. Fitzgerald & C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97, 183-350.
- Ren, Y.; H. Pan; B. Pan & W. Bu. Identification and functional characterization of three TLR signaling pathway genes in *Cyclina sinensis*. Fish Shellfish Immun (2016) 50:150–9.
- Magalí Rey-Campos, Rebeca Moreira, Marco Gerdol, Alberto Pallavicini, Beatriz Nova and Antonio Figueras. 2019. Immune Tolerance in *Mytilus galloprovincialis* Hemocytes After Repeated Contact With *Vibrio splendidus*. *Front. Immunol.* 10:1894.

- Riquelme, C.; G. Hayashida; R. Araya; A. Uchida; M. Satomi & Y. Ishida. 1996a. Isolation of native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.* 15(2): 369-374.
- Riquelme, C.E.; R. Araya; N. Vergara; A. Rojas; M. Guaita & M. Candia. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.* 154: 17-26.
- Rojas, R.; C.D. Miranda; R. Opazo & J. Romero. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal on Invertebrate Pathology.* 124: 61-69.
- Romalde, J.L. & J.L. Barja. 2010. Bacteria in molluscs: good and bad guys. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Mibrobial Biotechnology.* 136-147)
- Romero, A.; B. Novoa & A. Figueras. 2012. Genomics, immune studies and diseases in bivalve aquaculture. *ISJ* 9: 110-121.
- Royet, J.; D. Gupta & R. Dziarski. 2011. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 11(12):837-51.
- Ruddell, C.L. 1971. The fine structure of the granular amebocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.* 18, 296-275.
- Ruiz-Verdugo, C.A.; V. Koch; E. Félix-Pico; A.I. Beltrán-Lugo; C. Cáceres-Martínez; J.M. Mazón-Suástegui; M. Robles-Mungaray & J. Cáceres-Martinez. 2016. Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: Shunway, S., Pearson (Eds), *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries.* Third Edition, 1111-

1123.

SAGARPA-CONAPESCA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca), 2012, <<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb> >, Consultado el 26 octubre de 2016.

SAGARPA. (2001). Diario Oficial.

SAGARPA. (2013). Diario Oficial.

Sánchez-Ortiz, A.C. 2015. Evaluación del potencial probiótico de bacterias aisladas del tracto digestivo de la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa* en el cultivo de invertebrados marinos de importancia comercial. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Santamarina, M.A.; R.P. Pérez; M.S.H. Tomas; C.L. Enrique & A.G. Flores. 1999. The *Romanomermis oiyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. Rev. Panam. Salud Publ. 5:23-8.

Santoyo-Reyes, H. 1994. Fitoplancton y productividad. In: DE LA LANZA ESPINO G. y C. CÁCERES (Eds.). Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano. México. 525 p.

Sicard, M.T.; A.N. Maeda-Martínez; P. Ormart; T. Reynoso-Granados & L. Carvalho. 1999. Optimum temperatura for growth in the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842). J. Shellfish Res. 18:385-392.

Simudu, U. & K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family vibriónaceae. Appl. Environ. Microbiol. 50: 781-790.

- Schmieder, R. & R. Edwards. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6): 863-864.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish: diseases of marine shellfish. 2nd Ed., Vol. 2. Academic Press, San Diego, 516 pp.
- Söderhäll, K. y L. Cerenius (1992) Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*, 3-23.
- Sohn, S.; K. Markey Lundgren; K. Tammi; R. Smolowitz; D.R. Nelson; D.C. Rowley & M. Gómez-Chiarri. 2016. Efficacy of probiotics in preventing vibriosis in the larviculture of different species of bivalve shellfish. [Journal of Shellfish Research](#) 35(2): 319-328.
- Song, L.; L. Wang; H. Zhang & M. Wang. The immune system and its modulation mechanism in scallop. *Fish Shellfish Immun.* 2015;46:65–78.
- Song, L.; L. Wu; D. Ni; Y. Chang; W. Xu & K. Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck, 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish. Shellfish Immunol.* 21: 335-345.
- Song, X.; H. Zhang; L. Wang; J. Zhao; C. Mu; L. Song; L. Qiu & X. Liu. A galectin with quadruple-domain from bay scallop *Argopecten irradians* is involved in innate immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 2011;35:592–602.
- Soto-Rodríguez, S.A.; B. Gómez-Gil; R. Lozano-Olvera; M. Betancourt-Lozano & M.S. Morales-Covarrubias. 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1689–699.

- Sparks, A.K. & J.F. Morado. 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Pub.*18, 139-152.
- Su, J., D. Ni; L. Song; J. Zhao & L. Qiu. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein (CfPGRP-S1) cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immun.* 2007;23:646–656.
- Takeda, K.; T. Kaisho & S. Akira. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* (2003) 21(1):335–76.
- Tanguy, M.; P. McKenna; S. Gauthier-Clerc, J. Pellerin , J.M. Danger & A. Siah. 2013. Sequence analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain. *Results in Immunology* 3: 40–50.
- Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. Eds., *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thompson Publishing, New York. 434-465.
- Tatematsu, M.; K. Funami; T. Tsukasa & M. Matsumoto. 2018. Extracellular RNA Sensing by Pattern Recognition Receptors. *J Innate Immun* 2018;10:398–406.
- Teitelbaum, J.E. & W.A. Walker. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition* 22: 107-138.
- Tinwongger, S.; Y. Nochiri; J. Thawonsuwan; R. Nozaki; H. Kondo; S.P. Awasthi; A. Hinenoya; S. Yamasaki & I. Hirono. 2016. Virulence of acute hepatopancreatic

- necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *J. Appl. Microbiol.* 121(6), 1755-1765.
- Tiscar, P.G. & F. Mosca. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.* 28(1), 57-62.
- Tong Y; Y. Zhang; J. Huang; S. Xiao; Y. Zhang & J. Li. 2015. Transcriptomics analysis of *Crassostrea hongkongensis* for the discovery of reproduction-related genes. *PLoS ONE*. 10:e0134280. doi: [10.1371/journal.pone.0134280](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134280) PMID: [26258576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26258576/).
- Toubiana, M.; M. Gerdol; U. Rosani; A. Pallavicini; P. Venier & P. Roch. Toll-like receptors and MyD88 adaptors *in Mytilus*: complete cds and gene expression levels. *Dev Comp Immunol.* 2013; 40:158–66.
- Trckova, M.; L. Matlova; H. Hudcova; M. Faldyna; Z. Zraly; L. Dvorska; V. Beran and I. Pavlik. 2005. Peat as a feed supplement for animals: A review. *Vet. Med.* 50:361–377.
- Trevisan, R.; M. Arl; C. L. Sacchet; C. S. Engel; N. M. Danielli & D. F. Mello. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquat Toxicol.* 2012; 108:85–93.
- Turk, V.; V. Stoka; O. Vasiljeva; M. Renko; T. Sun & B. Turk. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824(1):68–88.
- Underhill, D. M. & H. S. Goodridge. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):492–502.

- Van Rensburg C. E. J.; A. Van Straten; J. Dekker; J.A. Kovacs; S. Vogel; J.M. Albert; J. Falloon & Davey. 2000. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 853-854.
- Vandesompele, J.; K. De Preter; F. Pattyn; B. Poppe & N. Van Roy. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: 1-12.
- Vargas-Albores, F. & M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, D.F. pp. 127-146.
- Vázquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala y E. Zenteno. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6): 344-348
- Velasco, L. A. 2013. Esfuerzo reproductivo en moluscos: una revisión. *Rev. Intropica*. Colombia. 87-97 p.
- Vélez, A. & E. Epifanio. 1981. Effects of temperature and ration on gametogenesis and growth in the tropical mussel *Perna perna* (L). *Aquac. Res.* 22: 21-26.
- Verschuere, L.; G. Rombaut; P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(4):655-671.
- Villalejo, F. M. & B. Ceballos. 1995. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Lab. de Morfofisiología. CICIMAR-IPN. Ree. 10-HI-1995. Rev.6-VI-1995. Ac. 21-VII-1995.*

- Villalejo-Fuerte, M. 1990. Fecundidad en *Argopecten circularis* (sowerby, 1835) (bivalvia: pectinidae) de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. Laboratorio de Morfofisiología, CICIMAR-IPN, A. P 592, La Paz Baja California Sur, c.p 23000, México.
- Wang, Z.; M. Gerstein & M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews, Genetics* 10: 57-63.
- Watson, F.L.; R. Puttmann-Holgado; F. Thomas; D. L. Lamar; M. Hughes; M. Kondo; V. I. Rebel & D. Schmucker. 2005. Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science* 309 (5742): 1874-1878.
- Wildish, D.J.; D.D. Kristmanson; R.L. Hoar; A.M. DeCoste; S.D. McCormick & A.W. White. 1987. Giant scallop feeding and growth responses to flow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 207-220.
- Xiang, Z.; F. Qu; F. Wang; J. Li; Y. Zhang & Z. Yu. 2014. Characteristic and functional analysis of a ficolin-like protein from the oyster *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 40: 514–23.
- Xue, Q.; M. E. Hellberg; K. Schey; N. Itoh; R. I. Eytan; R. K. Cooper & J. F. La Peyre. 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol. Biol.* 10: 213.
- Yang, J.; W. Wang; X. Wei; L. Qiu; L. Wang; H. Zhang & L. Song. 2010. Peptidoglycan recognition protein of *Chlamys farreri* (CfPGRP-S1) mediates immune defenses against bacterial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 34:1300–1307.

- Zhang, L.; L. Li & G. A. Zhang. 2011. *Crassostrea gigas* toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immun* 30(2): 653–60.
- Zhang, G.; X. Fang; X. Guo; L. Li; R. Luo & X. Xu. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*. 490: 49–54.
- Zhang, H.; Y. Zhai, L. Yao, Y. Jiang, F. and Li. 2017. Comparative transcriptomics reveals genes involved in metabolic and immune pathways in the digestive gland of scallop *Chlamys farreri* following cadmium exposure. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*.
- Zhang, L.; L. Li; Y. Zhu; G. Zhang & X. Guo. 2014. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar Biotechnol*. 16(1): 17–33.
- Zheng, L. P. 2011. Expression pattern of a gram-negative bacteria-binding protein in early embryonic development of *Artemia sinica* and after bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol*. 35: 35-43.

ANEXOS

Susceptibility and immune response of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) against *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND in shrimp

Gabriela B. Mendoza-Maldonado^a, Genaro Diarte-Plata^a, Antonio Luna-González^{a*}, Ruth Escamilla-Montes^a, Carmen Rodríguez-Jaramillo^b, César A. Ruiz-Verdugo^c, Jesús Arturo Fierro-Coronado^a, Miguel Robles-Mungaray^d

^aCentro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Instituto Politécnico Nacional, Juan de Dios Bátiz Paredes #250, San Joachín, 81101, Guasave, Sinaloa, Mexico

^bCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Instituto Politécnico Nacional #195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz 23096, Baja California Sur, Mexico

^cUniversidad Autónoma de Baja California Sur, Carretera al Sur km 5.5, 23080, La Paz, Baja California Sur, Mexico

^dAcuacultura Robles S.P.R. de R.I., Privada Quintana Roo #4120, 23098, La Paz, Baja California Sur, Mexico

*Corresponding author at: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Instituto Politécnico Nacional, Juan de Dios Bátiz Paredes #250, San Joachín, Guasave 81101, Sinaloa, Mexico

E-mail address: aluna@ipn.mx (aluna@ipn.mx).

ABSTRACT

Susceptibility and immune response of *Argopecten ventricosus* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* were determined. Mortality and median lethal concentration of *V. parahaemolyticus* were assessed in scallop seeds and adults challenged by immersion. Histopathological analysis was done in adults challenged by immersion. The immune response was analyzed in adults by injecting heat-inactivated bacteria in the adductor muscle. Hemolymph samples were taken at 0, 8, 24, 48, and 72 h. Time

zero corresponded to samples of scallop hemolymph before challenging with vibrio. In bioassays, scallops were fed with microalgae concentrate Shellfish Diet 1800[®]. Seeds and adults of *A. ventricosus* were susceptible to *V. parahaemolyticus* showing a LC₅₀ of 623 CFU mL⁻¹ and 62,853 CFU mL⁻¹, respectively. *V. parahaemolyticus* toxins caused lesions in digestive glands of adults analyzed. Significant variations were observed in hemocyte number, phenoloxidase activity, and lysosomal hydrolytic enzymes, mainly at 8 and 24 h, post infection. Results confirm that seeds and adults of *A. ventricosus* are susceptible to *V. parahaemolyticus* infection, but seeds are more susceptible than adults. In adults, the immune response of *A. ventricosus* was modulated by *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Argopecten ventricosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, immunology, AHPND.

1. Introduction

The Catarina scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), is an important fishery resource in Northwest Mexico, mainly in Baja California Sur (Ruiz-Verdugo et al., 2016). Because of this, efforts have been made to develop mariculture of this species with the final purpose of recovering populations in fishery areas (Medina et al., 2007). However, as in other bivalve mollusc species, diseases are the main issues that the pectinid culture is facing (Barbosa et al., 2001). The incidence of *Vibrio* genus, which causes massive mortalities in bivalve molluscs, is considered the most common sanitary problem affecting larvae, juveniles, and adults (Beaz-Garnier et al., 2007; Gómez-León et al., 2008; Hidalgo et al., 2010). Studies on the diversity of *Vibrio* species found that the predominating species associated with bivalve molluscs from different geographical locations were *V. splendidus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* (Beaz-Hidalgo et al., 2010). However, other vibrios like *V. parahaemolyticus* are virulent to small abalones (*Haliotis diversicolor supertexta*) (strain 880915) (Lee et al., 2003). In cultured molluscs, the severity of *Vibrio* attack is related to suboptimal culture conditions (high density, contaminated microalgae, residual gametes, high temperatures), which increase bacterial proliferation and compromise the immune response of infected organisms (Elston, 1984). In the case of crustaceans, *Litopenaeus vannamei* is severely affected by *Vibrio parahaemolyticus*, causing acute

hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). This bacterium becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses toxins (PirA and PirB), which induce cell death by membrane pore forming (Lee et al., 2015). In addition, *V. parahaemolyticus* has type III (T3SS1) and VI (T6SS1 and T6SS2) secretion systems that are important virulence factors (Cascales, 2008; Kongrueng et al., 2014). Nowadays, there are no reports about pathogenicity of *V. parahaemolyticus* in bivalve molluscs.

Compared to larvae, diseases caused by bacteria in juveniles and adults exist but are less frequent (Sinderman, 1990; Lane and Birkbeck, 2000), which indicates that a process of maturation of the immune system occurs during the ontogeny of these organisms (Bachère et al., 1995; Luna-González et al., 2003).

The internal immune defense is fundamental to protect animals against pathogens (Matozzo et al., 2016). In bivalves, internal defense relies solely on innate immune mechanisms, including cellular and molecular effectors. Hemocytes play a key role in the immune response, mainly through the phagocytosis of foreign particles, and the production of reactive oxygen intermediates, hydrolytic enzymes, and antimicrobial peptides (Carballal et al., 1997; Donaghy et al., 2012; Hine, 1999; Mitta et al., 2000). Because of the fact that hemocytes are a key element of internal defense, their concentration or size can provide information about cell division processes or pathologic states (Lambert et al., 2007; Ramírez-Castillo et al., 2011).

In this paper, we describe, for the first time, the effect of *Vibrio parahaemolyticus* (at different concentrations), pathogenic for penaeid shrimp, on the susceptibility and immune response of seeds and adults of *A. ventricosus*.

2. Materials and methods

2.1 Experimental animals

A. ventricosus seeds were obtained from Acuacultura Robles, S.P.R. de R.I. (La Paz, B.C.S., Mexico) and transported by plane in a wet sponge to the Immunology Laboratory of the Aquaculture Department at Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN) in Guasave, Sinaloa, Mexico. Although animals had a pathogen-free certificate, they were quarantined during 10 d and discharged water was chlorinated. Adult clams were collected by diving in El Caracol (Guasave, Sinaloa, Mexico)

(108°74'W 25°49'N) and transported in 250-L plastic tanks containing seawater and constant aeration to the laboratory facilities. In the laboratory, the organisms were acclimated for 3 d in 2 plastic tanks (1000 L) with filtered (20 µm) seawater at 30 psu and under constant aeration. The scallops were fed thrice a day with the microalgae concentrate Shellfish Diet 1800® (Reed Mariculture Inc., Campbell, CA, USA) composed of *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, and *Thalassiosira pseudonana*, according to Reed Mariculture's instructions. The tanks were cleaned daily by siphoning and the discarded water was recovered immediately.

2.2 Bioassays 1 and 2 (*A. ventricosus* susceptibility to *V. parahaemolyticus* and LC₅₀)

Two bioassays, one for seeds (height: 5.3 ± 1.1 mm) and one for adults (height: 4.3 ± 0.57 cm) were conducted for 5 and 10 d, respectively, in an open culture system, using glass tanks (4 L) for seeds and plastic tanks (60 L) for adults with filtered (20 µm) seawater and constant aeration. Ten seeds or adults were placed per tank and fed with the microalgae concentrate, Shellfish Diet 1800®. Seeds were fed twice a day with 4 × 10⁷ cells L⁻¹, 2 × 10⁷ cells L⁻¹ at 08 h and 2 × 10⁷ cells L⁻¹ at 17 h. Adults were fed twice a day with 5 × 10⁷ cells L⁻¹, 2.5 × 10⁷ cells L⁻¹ at 08 h and 2.5 × 10⁷ cells L⁻¹ at 17 h. *V. parahaemolyticus* strain was isolated, characterized, and tested in shrimp by López-León et al. (2016). Treatments in triplicate were as follows: I) Control, without *Vibrio*; II) *Vibrio* (1 × 10² CFU mL⁻¹); III) *Vibrio* (1 × 10³ CFU mL⁻¹); IV) *Vibrio* (1 × 10⁴ CFU mL⁻¹); V) *Vibrio* (1 × 10⁵ CFU mL⁻¹). Debris were removed by siphoning before feeding and water recovered. Survival was determined daily and dead animals were removed.

2.2.1 Determination of median lethal concentration

Cumulative mortality from bioassays were used to calculate the median lethal concentration (LC₅₀) by using Probit analysis (Finney, 1952) with StatPlus® 2009 professional 5.8.4.

2.3 Bioassay 3 (histological analysis in scallops infected with *V. parahaemolyticus*)

Two groups of scallops (height: 4.3 ± 0.57 cm) were used, one as control (4 scallops) and one for challenging (4 scallops) with *V. parahaemolyticus* (1 × 10⁶ CFU mL⁻¹) by immersion. Animals were fed twice a day with 1.2 × 10⁹ cells, 6 × 10⁸ cells at 08 h and 6 × 10⁸ cells at 17 h. All challenged scallops were moribund at 24 h

and were removed for histological analysis. Tissue samples (digestive glands) were previously fixed in 10% formaldehyde, neutralized with dibasic sodium phosphate (2 g L⁻¹) and monobasic sodium phosphate (4 g L⁻¹), and processed according to the histological techniques (Kim et al., 2006). Tissues were dehydrated in alcohols of ascending concentration (50 to 100%) and embedded in Paraplast-TX[®]. Samples were sectioned at 4 µm in a rotating microtome (Leica RM 2155). The histological sections were stained with hematoxylin and eosin (Humason, 1979). The slides were observed with a composite microscope (Olympus BX50) and the visual fields (10×, 20×, and 40× magnifications) were digitized with a digital camera (Nikon DS-Ri1) and the images processed with the Image Pro Premier[®] (version 9.0, Media Cybernetics, USA) software.

2.4 Bioassay 4 (immune system of *A. ventricosus*)

A 72-h bioassay was performed in which the effect of *V. parahaemolyticus* infection was evaluated in adult scallops. The culture system consisted of a 130-L plastic tank with 120 L of filtered (20 µm) seawater at 30 psu and constant aeration. Twenty-eight animals (height: 4.4 ± 0.51 cm) were placed in the tank and cultured under natural photoperiod. The feeding was done as in previous bioassays. Animals were challenged by injection into the adductor muscle with 1.5 × 10⁶ dead bacterial cells in 100 µL⁻¹ saline solution (2.5% NaCl). Bacterial cells were killed by heat at 60 °C for 10 min. The tank was cleaned daily by siphoning and the discarded water was recovered immediately. Physicochemical parameters, such as temperature, pH, salinity and dissolved oxygen, were determined daily. Hemolymph was withdrawn from 5 scallops randomly chosen per time (0, 8, 24, 48, and 72 h) for analysis of the immune system. Time zero corresponded to samples of scallop hemolymph before challenging with vibrio. Hemocytes were counted and measured (diameter) and the activity of phenoloxidase (PO) and lysosomal hydrolytic enzymes was determined. Total protein was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin for the standard curve.

2.4.1 Hemolymph extraction

One milliliter hemolymph was withdrawn from each adult scallop sampled from bioassay 4 by puncturing the hemolymphatic sinus of the adductor muscle with a

sterile 1-mL syringe (27 G x 13 mm needle). The hemolymph samples were individually stored in pre-cooled Eppendorf tubes to be used immediately.

2.4.2 Hemocyte quantification and measurement

Hemolymph sample was diluted 1:3 (50 μ L:150 μ L) in a 6% formalin solution (Luna-González et al., 2004) to prevent hemocyte agglutination. Hemocytes were counted in a Neubauer's chamber and measured from digital photographs. Fifty hemocytes from each specimen were measured using the Sigma Scan Pro (V 5.0) software. The outline of each hemocyte was manually drawn and the lengths of the larger and smaller axes were measured. Hemocyte diameter was calculated as the average length of both axes (Ramírez-Castillo et al., 2011), then, the diameter measurement was used to calculate the hemocyte area.

2.4.3 Hemolymph lysate samples

Withdrawn hemolymph samples were subjected to two freezing-thawing cycles. The hemolymph lysate (HL) was obtained by centrifuging the samples in a refrigerated centrifuge at 15,000g for 30 min. The cellular debris pellet was discarded and then HL was placed in pre-cooled Eppendorf tubes to be used immediately.

2.4.4 Phenoloxidase activity (PO)

PO activity in HL was determined using the technique described by Hernández-López et al. (1996) and modified by Huang et al. (2010). The activity of PO present in hemolymph was quantified spectrophotometrically by the formation of dopachrome from L-dihydroxyphenylalanine (L-dopa). Fifty microliters of sample, 50 μ L Tris-HCl buffer, and 50 μ L L-DOPA (5 mM) were added and incubated for 70 min at 35 °C. The absorbance was determined at 492 nm on a microplate reader spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO). The total PO activity in each sample was calculated from the absorbances obtained.

2.4.5 Lysosomal hydrolytic enzyme activity

The activity of 19 lysosomal hydrolytic enzymes in HL was determined with the API ZYM kit (Biomerieux), following manufacturer's instructions. This method is semi-quantitative. A sampling pool per time was done from the hemolymph of five scallops. The samples were incubated at 37 °C for 4 h (Carballal et al., 1997, López et al., 1997, Luna-González et al., 2002, 2004). Sixty five microliters of the sample were

added to each well (including the control well) followed by incubation at 35 °C for 4 h. Afterwards, and once the strips reached room temperature, kit reagents A and B were added and readings were taken after 5-10 min under natural lighting. The intensity of the reaction was assessed based on the color scale provided by the manufacturer and transformed to nanomoles of hydrolyzed substrate. Enzymatic activity was expressed in units representing the amount of hydrolyzed substrate in nanomoles per milligram (nM mg^{-1}) of protein in the sample.

2.4.6 Lysozyme-like activity

Agarose plates were used to detect lysozyme-like activity in HL. A bacterial suspension with 4 mg mL^{-1} lyophilized *Micrococcus luteus* (Sigma) was prepared. A 1% agarose solution was prepared with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 5.2) and cooled to 40 °C. One milliliter of bacterial suspension was mixed with 14 mL of agarose and poured into Petri dishes (90 mm diameter, 15 mm depth). Once the agarose had solidified, 6-mm diameter wells were sunk in the substrate. Human saliva, diluted 1:9 in a 0.1% NaCl solution, was used as a positive control. Wells were filled with 30 μL of HL and controls (positive and negative). After 24 h incubation at room temperature, the diameter of the clear zone around the wells was measured. The diameter of each clear zone was obtained by measuring the total diameter minus the diameter of the well (6 mm). Results were expressed in units ($0.1 \text{ mm} = 1 \text{ U}$) per milligram of protein (U mg protein^{-1}) (Canicatti, 1990; Luna-González et al., 2004).

2.4.7 Protein concentration

Protein in HL was determined with Bradford's method, using a commercial reagent (Sigma) and bovine albumin serum (Sigma) as standard. The Bradford assay is a protein determination method that involves the binding of Coomassie Brilliant Blue G-250 dye to proteins. Coomassie Brilliant Blue G-250 shifts from 465 nm to 595 nm when binding to protein occurs. Both hydrophobic and ionic interactions stabilize the anionic form of the dye, causing a visible color change (Bradford, 1976).

2.5 Statistical analysis

For bioassay 4 with adult scallops, normality analyzed with Kolmogorov-Smirnov test and then confirmed with the Lavene test for homogeneity of variances. One-way variance (ANOVA) analysis was performed to examine the differences in

immune response and protein concentration among sampling times. Where significant ANOVA differences were found, a Tukey's HSD test was used to identify these differences among sampling times at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Bioassays 1 and 2 (*A. ventricosus* susceptibility to *V. parahaemolyticus* and LC_{50})

Scallop seeds and adults are susceptible to *V. parahaemolyticus* infection with an LC_{50} of 623 and 62,853 CFU mL^{-1} , respectively (Figs. 1,2). In *A. ventricosus* seeds the mortality occurred between 48 and 96 h post-infection and in adults, mortality occurred between 96 and 144 h post-infection. In seeds, mortality in control group was zero. In adults, mortality in control group and treatments II, III, and IV was zero.

3.2 Bioassay 3 (histological analysis in scallops infected with *V. parahaemolyticus*)

In the digestive gland of the control scallops, the morphology of tubules and ducts and the cell structure of the epithelium did not change, but in challenged scallops a desquamation of digestive cells and a change in the morphology of tubules was observed. In addition, hemocyte infiltration was observed in connective tissue and inside tubules (Fig. 3).

3.3 Bioassay 4 (immune system of *A. ventricosus*)

Total hemocyte count (cells mL^{-1}) showed significant differences ($P < 0.05$) among sampling times (Fig. 4). Hemocyte count significantly peaked ($P < 0.05$) at 24 h as compared to all other sampling times (Fig. 4).

Figure 5 summarizes the results of hemocyte area in the scallops challenged with *V. parahaemolyticus* where significant differences ($P < 0.05$) were found among times. Hemocyte area significantly decreased ($P < 0.05$) between 24 and 48 h as compared to the other sampling times.

Results of PO activity (absorbance at 492 nm) showed significant differences ($P < 0.05$) among times (Fig. 6). PO activity significantly peaked ($P < 0.05$) at 8 h as compared to 0 and 24 h (Fig. 6).

Table I depicts the results of the analysis of the activity of lysosomal hydrolytic enzymes in hemolymph of *A. ventricosus* challenged with *V. parahaemolyticus*. With the API ZYM kit, the activity of 18 enzymes at time 0 and 19 enzymes at 8, 24, 48, and 72 h was determined. At time 0 h, no α -mannosidase activity was detected.

Differences were observed in the activity of different types of enzymes as well as among sampling times. Enzymes that exhibited increased activity and variation were acid phosphatase, naphthol phosphohydrolase, esterase lyase, leucyl arylamidase, valyl arylamidase, β -galactosidase, β -glucosidase, and α -mannosidase. At 72 h post-challenge, the enzymatic activity was very similar to that of the control. At 8, 24, and 48 h there was a greater variation in the enzymatic activity, especially in the eight mentioned enzymes, as compared to time 0 and 72 h.

The lysozyme activity (Table 1) on the substrate was 230 ± 29 , 309 ± 29 , 202 ± 10 , 255 ± 16 and 202 ± 10 U mg protein⁻¹ at 0, 8, 24, 48, and 72 h, respectively. At 8 h, lysozyme activity was significantly higher than at 0, 24 h, 48, and 72 h ($P < 0.05$). At 24 h, lysozyme activity was significantly higher than at 8 and 48 h ($P < 0.05$). At 48 h, lysozyme activity was significantly higher than at 8, 24, and 72 h ($P < 0.05$). At 72 h, lysozyme activity was significantly higher than at 8 and 48 h ($P < 0.05$).

The amount of protein found in the hemolymph of *A. ventricosus* at 0, 8, 24, 48, and 72 h was 0.55 ± 0.04 , 0.41 ± 0.06 , 0.57 ± 0.007 , 0.51 ± 0.04 , and 0.57 ± 0.019 mg mL⁻¹, respectively. No significant differences were found among times ($P > 0.05$), but the lowest concentration was observed at 8 h, coinciding with a lowest number of hemocytes in that treatment (Fig. 7).

4. Discussion

This is the first report on the pathogenicity of *V. parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND in penaeid shrimp, in bivalve molluscs. Survival and mortalities were determined and the obtained LC₅₀ in seeds was 623 CFU mL⁻¹, whereas, in adults, the obtained LC₅₀ was 62,853 CFU mL⁻¹. On the other hand, in seeds the mortality occurred between 48 and 96 h post-infection and in adults, mortality occurred between 96 and 144 h post-infection. The symptoms of the disease included open valves, slow closing of valves, loose mantle, and stop feeding. There are many reports of massive mortalities caused by bacteria of the genus *Vibrio* in bivalve mollusc cultures. Lee et al. (2003) found that *V. parahaemolyticus* is pathogenic to small abalones *Haliotis diversicolor supertexta* (strain 880915). Gómez-León et al. (2005) demonstrated that *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* are

associated with massive mortalities in larvae of *Ruditapes decussatus*. Garnier et al. (2007) found that *V. aestuarianus* and *V. splendidus* are involved in "summer mortality" in adults of *C. gigas* grown in France. Gómez-León et al. (2008) challenged larvae and juveniles of *Crassostrea virginica* with pathogenic bacteria (*Vibrio* spp. and *Roseovarius crassostreae*) and observed that viable cells and extracellular products caused important mortalities. Abasolo-Pacheco et al. (2017) demonstrated that *Vibrio alginolyticus* is associated with massive mortalities in larvae and juveniles of *A. ventricosus*. Finally, Hasegawa et al. (2009) found that the metalloproteases produced by *V. tubiashii*, *V. cholerae*, and *V. splendidus* are one of the virulence factors that cause mortality in *C. gigas* larvae.

At tissue level, digestive gland of challenged scallops showed a noticeably difference from the un-challenged scallops that showed normal epithelium of ducts and tubules. In the challenged scallops, in the acute stage of the disease, the morphology and epithelium of tubules were damaged and hemocytic infiltration was observed in connective tissue and inside tubules. Similarly, Soto-Rodríguez et al. (2014) and Dabu et al. (2017) found desquamation of tubular epithelial cells of juvenile shrimp hepatopancreas in the acute stage of the disease. However, the time course of the disease was different, in shrimp, lesions and mortality occur at the initial hours post-infection (Soto-Rodríguez et al., 2014) and in adult scallop moribund animals were found at 72 h and the initial mortalities occurred at 96 h. In shrimp, the bacterial attack was faster than the activation of the immune system (Soto-Rodríguez et al., 2014), but in scallops immune system was defeated by *Vibrio* infection after some days of fighting.

In this work, *V. parahaemolyticus* cells were killed by heating at 60°C because it has been found that, in this species, the reduction of culturable cells to non-detectable levels occurs at 55 °C (OIE, 2013). However, endotoxins like LPS (Gorbet and Sefton, 2006) and exotoxins PirA and PirB (Tinwongger et al., 2016) are heat-stable and can activate the immune response.

To understand how bivalve molluscs defend themselves from pathogens, such as *V. parahaemolyticus*, it is necessary to understand the mechanisms of internal defense (cellular and humoral effectors). In these organisms, hemocytes play an

important role in internal defense and homeostasis (Hine, 1999), as well as in the detoxification of biotic and abiotic contaminants (Donaghy et al., 2009), and the variation in their numbers is an early sign of the immune response to aggression (Tiscar and Mosca, 2004; Hannam et al., 2010). In this work, variation in hemocyte number occurred in adult organisms, where at 8 h after challenging with dead *Vibrio* cells, the number of hemocytes decreased significantly with respect to time zero (non-challenged), possibly due to lysis of cells (Tiscar and Mosca, 2004; Buggé et al., 2007) or to their infiltration into tissues to repair potential damages (Tiscar and Mosca, 2004; Beaz-Hidalgo et al., 2010, Ramírez-Castillo et al., 2011). After their decrease at 8 h, the number of cells increased significantly at 24 h, even with respect to zero time, which is consistent with observations in other species infected with pathogens, such as *C. virginica* (Beaz-Hidalgo et al., 2010) and *Nodipecten subnodosus* (Ramírez-Castillo et al., 2011). The results suggest that the increase in the number of cells was due to the hypersynthesis of hemocytes after the challenge with the *Vibrio* since the area of the cells decreased, indicating an abundance of immature cells, as found in *N. subnodosus* challenged with *V. alginolyticus* (Ramírez-Castillo et al., 2011). At 72 h, the number and area of hemocytes was similar to time zero, indicating that the immune response returned to baseline and that most cells were mature.

Regarding phenoloxidase activity, significant differences were found by sampling times. It increased at 8 h in response to bacterial challenge but decreased at 24 h because most cells were immature. Luna-González et al. (2003) reported the presence of PO in adult plasma of four different bivalve species, including *A. ventricosus*. Le Bris et al. (2015) studied the changes in PO and superoxide dismutase (SOD) in two tissues (mantle and hemolymph) of the manila clam, *Venerupis philippinarum*, challenged with two *Vibrio tapetis* strains, CECT4600T, the causative agent of brown ring disease (BRD), and LP2 non-pathogenic to *V. philippinarum*. Bacterial infection in *V. philippinarum* resulted in modulation of PO and SOD activities that was both tissue- and time-dependent. A response at early times was detected in the mantle and was associated with significant increases in PO and SOD activities in LP2- and CECT4600T-challenged clams 36 h post-injection. In the

hemolymph, the response occurred at later times and was associated with an increase in PO activity and a decrease in SOD activity. As hemolymph is a circulating fluid, this response delay could be due to an “integration time” needed by the organism to counteract the infection.

Lysosomal hydrolytic enzymes are important internal defense mechanisms of molluscs as they participate in the death and degradation of phagocytosed material (Cheng et al., 1981; Ramírez-Castillo et al., 2011). In this work, we found differences in the activity of different types of enzymes, detected by API Zym kit, as well as among sampling times as found in *N. subnodosus* by Ramírez-Castillo et al. (2011). Our results are also in agreement with those obtained by Estrada et al. (2013), who report that some hemocytes were immunologically active because they phagocytosed *Escherichia coli* cells. Cytochemical assays showed activity of acid phosphatase, specific esterase and nonspecific esterase, enzymes commonly associated with lysosomes and immunological activity. In this work, lysozyme activity in hemolymph significantly increased, showing the highest value at 8 h post-challenge and a trend to decrease at 24, where a lot of cells were immature. Results do not agree with those found by Ramírez-Castillo et al. (2011) in *N. subnodosus* infected with *V. alginolyticus*, where no differences among times were observed.

In the protein analysis, no significant differences were found among times; however, a decrease was observed at 8 h. Protein concentration is important because many of them are immunoproteins (Campa-Córdova et al., 2004).

5. Conclusion

Our results confirm that seeds and adults of *A. ventricosus* are susceptible to *V. parahaemolyticus* infection, but seeds are more susceptible than adults. In adults, the immune response of *A. ventricosus* was modulated by *V. parahaemolyticus*, therefore, comparative studies on the immune response of larvae, seeds, and adults, infected with the same pathogen, are recommended. We also recommend using probiotics with antimicrobial and immunostimulant properties in scallop cultures to avoid antibiotics. By last, wild *A. ventricosus* may represent a natural reservoir for strains of *V. parahaemolyticus* that cause AHPND in shrimp.

Acknowledgments

Authors are grateful to *Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN)* for financial support and thank Eulalia Meza Chávez from CIBNOR for technical support during the tissue processing for histological analysis. Gabriela Berenice Mendoza Maldonado acknowledges support from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico)* and SIP-IPN for grants to pursue doctoral studies.

References

- Abasolo-Pacheco, F., Campa-Córdova, A.I., Mazón-Suástegui, J.M., Tovar-Ramírez, D., Araya, R., Saucedo, P.E., 2017. Enhancing growth and resistance to *Vibrio alginolyticus* disease in catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) with *Bacillus* and *Lactobacillus* probiotic strains during early development. *Aquacult. Res.*, 1-11.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodríguez, J., 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* 132, 17-32.
- Barbosa V., Luna-González, A., Aguirre-Guzmán, G., Riquelme, C., Ascencio-Valle, F., 2001. Enfermedades microbianas de pectínidos cultivados en Iberoamérica, In: Maeda-Martínez, A. N (Ed), *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuacultura*, Limusa. Mexico city, pp. 325-342.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, S., Figueras, J.L., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve mollusks. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 34-43.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Buggé, D.M., Hégaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B., 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 188-196.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., Philippis, R., Ascencio, F., 2004. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of

- American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 353-366.
- Canicatti, C., 1990. Distribution d'une activite lysozymiale dans un echinoderme holothuroide, *Holothuria polii*, et dans les oeufs et les larves d'un echinoderme echinoide, *Paracentrotus lividus*. *Eur. Arch. Biol.* 101, 309–318.
- Carballal, M.J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 96–105.
- Cascales, E., 2008. The type VI secretion tool kit. *EMBO Rep.* 9, 735–741.
- Cheng, T.C. 1981. Bivalves, In: *Invertebrates Blood Cells*, Vol. 2, (Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., (Eds.), Academic Press, London, pp. 231 – 300.
- Dabu, I.M., Lim, J.J., Arabit, P.M.T., Orense, S.J.A.B., Tabardillo, J.A., Corre, V.L., Maningas, M.B.B., 2017. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquac. Res.* 48, 792-799.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le-Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7, e46594.
- Elston, R.A., 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *J. World Mar. Soc.* 15, 284-300.
- Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C., Ascencio, F., 2013. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Immunobiology* 218(8), 1093-1103.
- Finney, D.J., 1952. *Probit Analysis*. Cambridge University, Cambridge, England.
- Garnier, M., Labreuche, Y., García, C., Robert M., Nicolas, J.L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* 53, 187-196.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B., 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 98-104.

- Gómez-León, J., Villamil, L., Salger, S.A., Sallum, R.H., Remacha-Triviño, A., Leavitt, D.F., Gómez-Chiarri, M., 2008. Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis. Aquat. Org.* 79, 95-105.
- Gorbet, M.B., Sefton, M.V., 2006. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials* 26, 6811-6817.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., Moody, A.J., Jones, M.B., 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78, 779-784.
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D.N., Lind, E.J., Häse, C.C., 2009. Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 85, 123-131.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol. C* 113, 61–66.
- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 367–385.
- Huang, J., Yang, Y., Wang, A., 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 240-244.
- Humason, G.L., 1979. *Animal Tissue Techniques*, fourth ed. W. H. Freeman & Co. San Francisco, USA.
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K.A., Powell, E.N., 2006. *Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update*, 27. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, Silver Spring, MD.
- Kongrueng, J., Yingkajorn, S., Bunpa, N., Sermwittayawong, K., Vuddhakul, V., 2014. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish Dis.* 38, 957-966.

- Lane, E., Birkbeck, T.C., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23, 275-279.
- Lambert, C., Soudan, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boundry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J.F., 2007. Haemocyte characteristics in families of oyster, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* 270, 276-288.
- Le Bris, C., Richard, G., Paillard, C., Lambert, C., Segueineau, C., Gauthier, O., Pernet, F., Guérard, F., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*-Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 16-24.
- Lee, K.K., Liu, P.C., Huang, C.Y., 2003. *Vibrio parahaemolyticus* infectious for both humans and edible mollusk abalone. *Microbes Infect.* 5, 481–485.
- Lee, C.T., Chen, I.T., Yang, Y.T., Ko, T.P., Huang, Y.T., Huang, J.Y., Huang, M.F., Lin, S.J., Chen, C.Y., Lin, S.S., Lightner, D.V., Wang, H.C., Wang, A.H.J., Wang, H.C., Hor, L.I., Loa, C.F., 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 112, 10798–10803.
- López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Morphological characterization of the haemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Inv. Pathol.* 69, 51–57.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M.C., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P., Diarte-Plata, G., 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.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Sainz, J.C., Ascencio-Valle, F., 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis. Aquat. Organ.* 49, 221-226.

- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A., Vargas –Albores, F., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 275-282.
- Luna-González, A., Maeda-Martínez, A.N., Ascencio-Valle, F., Robles-Mungaray, M., 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 287–294.
- Matozzo, V., Pagano, M., Spinelli, A., Caicci, F., Faggio, C., 2016. *Pinna nobilis*: A big bivalve with big haemocytes? *Fish Shellfish Immunol.* 55, 529-534.
- Medina, B., Guzman, H.M., Mair, J.M., 2007. Failed recovery of a collapsed scallop fishery in Las Perlas Archipelago, Panama. *J. Shellfish Res.* 26, 9-15.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P., 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954–12962.
- OIE., 2013. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Etiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/Aquatic_Commission/AHPND_DEC_2013.pdf.
- Ramírez–Castillo, E.R., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B.P., González-Ocampo, H.A., Aguirre-Guzmán, G., Luna-González, A., 2011. Immune response of the Lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Thai J. Vet. Med.* 41, 425-432.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Koch, V., Félix-Pico, E., Beltrán-Lugo, A.I., Cáceres-Martínez, C., Mazón-Suástegui, J.M., Robles-Mungaray, M., Cáceres-Martínez, J., 2016. Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: Shunway, S., Pearson (Eds), *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*. Third Edition, pp. 1111-1123.
- Sindermann, C.J., 1990. *Principal diseases of marine fish and shellfish*, Volume 2. Academic Press Inc., San Diego, California.
- Soto-Rodríguez, S.A., Gómez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., Morales-Covarrubias, M.S., 2015. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis

- disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1689–699.
- Tinwongger, S., Nochiri, Y., Thawonsuwan, J. Nozaki, R., Kondo, H., Awasthi, S.P., Hinenoya, A., Yamasaki, S., Hirono, I., 2016. Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease PirAB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1755-1765.
- Tiscar, P.G., Mosca, F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.* 28, 57-62.
- Tong Y; Y. Zhang; J. Huang; S. Xiao; Y. Zhang & J. Li. 2015. Transcriptomics analysis of *Crassostrea hongkongensis* for the discovery of reproduction-related genes. *PLoS ONE.* 10:e0134280. doi: [10.1371/journal.pone.0134280](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134280) PMID: [26258576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26258576/).
- Toubiana, M.; M. Gerdol; U. Rosani; A. Pallavicini; P. Venier & P. Roch. Toll-like receptors and MyD88 adaptors *in Mytilus*: complete cds and gene expression levels. *Dev Comp Immunol.* 2013; 40:158–66.
- Trckova, M.; L. Matlova; H. Hudcova; M. Faldyna; Z. Zraly; L. Dvorska; V. Beran and I. Pavlik. 2005. Peat as a feed supplement for animals: A review. *Vet. Med.* 50:361–377.
- Trevisan, R.; M. Arl; C. L. Sacchet; C. S. Engel; N. M. Danielli & D. F. Mello. Antioxidant deficit in gills of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to chlorodinitrobenzene increases menadione toxicity. *Aquat Toxicol.* 2012; 108:85–93.
- Turk, V.; V. Stoka; O. Vasiljeva; M. Renko; T. Sun & B. Turk. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1824(1):68–88.

- Underhill, D. M. & H. S. Goodridge. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):492–502.
- Van Rensburg C. E. J.; A. Van Straten; J. Dekker; J.A. Kovacs; S. Vogel; J.M. Albert; J. Falloon & Davey. 2000. An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 853-854.
- Vandesompele, J.; K. De Preter; F. Pattyn; B. Poppe & N. Van Roy. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: 1-12.
- Vargas-Albores, F. & M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* Editorial Limusa, D.F. pp. 127-146.
- Vázquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala y E. Zenteno (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6): 344-348
- Velasco, L. A. 2013. Esfuerzo reproductivo en moluscos: una revisión. *Rev. Intropica.* Colombia. 87-97 p.
- Vélez, A. & E. Epifanio. 1981. Effects of temperature and ration on gametogenesis and growth in the tropical mussel *Perna perna* (L). *Aquac. Res.* 22: 21-26.
- Verschuere, L.; G. Rombaut; P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(4):655-671.
- Villalejo, F. M. & B. Ceballos. 1995. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia:

- Pectinidae). Lab. de Morfofisiología. CICIMAR-IPN. Ree. 10-HI-1995. Rev.6-VI-1995. Ac. 21-VII-1995.
- Villalejo-Fuerte, M. 1990. Fecundidad en *Argopecten circularis* (sowerby, 1835) (bivalvia: pectinidae) de Bahía Concepción, Baja California Sur, México. Laboratorio de Morfofisiología, CICIMAR-IPN, A. P 592, La Paz Baja California Sur, c.p 23000, México.
- Wang, Z.; M. Gerstein & M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews, Genetics* 10: 57-63.
- Watson, F.L.; R. Puttmann-Holgado; F. Thomas; D. L. Lamar; M. Hughes; M. Kondo; V. I. Rebel & D. Schmucker. 2005. Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science* 309 (5742): 1874-1878.
- Wildish, D.J.; D.D. Kristmanson; R.L. Hoar; A.M. DeCoste; S.D. McCormick & A.W. White. 1987. Giant scallop feeding and growth responses to flow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113:207-220.
- Xiang, Z.; F. Qu; F. Wang; J. Li; Y. Zhang & Z. Yu. Characteristic and functional analysis of a ficolin-like protein from the oyster *Crassostrea hongkongensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014; 40:514–23.
- Xue, Q.; M. E. Hellberg; K. Schey; N. Itoh; R. I. Eytan; R. K. Cooper & J. F. La Peyre. 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol. Biol.* 10, 213.
- Yang, J.; W. Wang; X. Wei; L. Qiu; L. Wang; H. Zhang & L. Song. Peptidoglycan recognition protein of *Chlamys farreri* (CfPGRP-S1) mediates immune

defenses against bacterial infection. *Dev. Comp. Immunol.* 2010;34:1300–1307.

Zhang, L.; L. Li & G. A. Zhang. *Crassostrea gigas* toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immun* (2011) 30(2):653–60. doi:10.1016/j.fsi.2010.12.023

Zhang, G.; X. Fang; X. Guo; L. Li; R. Luo & X. Xu. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* 2012; 490:49–54.

Zhang, L.; L. Li; Y. Zhu; G. Zhang & X. Guo. Transcriptome analysis reveals a rich gene set related to innate immunity in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar Biotechnol.* 2014; 16(1):17–33. doi: [10.1007/s10126-013-9526-z](https://doi.org/10.1007/s10126-013-9526-z)
PMID: [23907648](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23907648/)

Zheng, L. P. Expression pattern of a gram-negative bacteria-binding protein in early embryonic development of *Artemia sinica* and after bacterial challenge. 2011. *Dev. Comp. Immunol*

Probiotic bacilli improve growth of the scallop *Argopecten ventricosus*

Gabriela Berenice Mendoza-Maldonado¹, Antonio Luna-González¹, Genaro Diarte-Plata^{1*}, Ruth Escamilla-Montes¹, Jesús A. Fierro-Coronado¹, Viridiana Peraza-Gómez² & Ma. del Carmen Flores-Miranda³

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México

²Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Universidad Autónoma de Nayarit
San Blas, Nayarit, México

³Departamento de Estudios para el Desarrollo Sustentable de Zonas Costeras, CUCSUR. Universidad de Guadalajara. San Patricio Melaque, Jalisco, Mexico

Corresponding author: Genaro Diarte-Plata (gdiarte@ipn.mx)

RESUMEN

Se determinó el crecimiento de semillas y adultos de *Argopecten ventricosus* tratadas con aditivos naturales. Las almejas se alimentaron con un concentrado de microalgas Shellfish Diet 1800[®]. El crecimiento fue evaluado en semillas de *A. ventricosus*, adicionando en el agua una mezcla de probióticos de almeja catarina (MPAC), inulina y ácido fúlvico. Los aditivos mejoraron significativamente el crecimiento en peso, longitud, altura y ancho. Por lo tanto, se necesita más investigación sobre el efecto de los aditivos naturales en los laboratorios de larvas.

Palabras clave: *Argopecten ventricosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, inmunología, AHPND.

El cultivo de moluscos bivalvos contribuye significativamente a la producción mundial y nacional de mariscos. La producción mundial de moluscos fue de 15.6 millones toneladas métricas en 2014 (FAO, 2014). En México existen más de 54 especies nativas de moluscos (Baqueiro, 1984), sin embargo, la acuicultura de moluscos bivalvos se basa principalmente en el cultivo del ostión (*Crassostrea gigas* y *C. virginica*), de tal manera que en 2013, la producción total del país fue de 38,699 toneladas (SAGARPA, 2013). México ocupa el cuarto lugar en América Latina en el cultivo de moluscos bivalvos y las almejas ocupan el segundo lugar a nivel nacional (SAGARPA, 2013).

Las bacterias forman parte de la flora autóctona de los organismos marinos y de su ecosistema, y llegan a representar hasta un 60% de la población de microorganismos totales en algunas lagunas costeras (Simudu y Tsukamoto, 1985). En el medio marino, las bacterias son importantes actores en los procesos ecológicos ya que realizan distintas funciones vitales para el buen funcionamiento de los ecosistemas, pero también tienen un importante rol metabólico como simbioses

que conforman la microbiota residente y transitoria en el tracto digestivo (TD) de moluscos y otras especies de invertebrados. De manera general, la microbiota contribuye a la degradación del alimento, participa en procesos oxidativos y proporciona diversos beneficios al hospedero, que le permiten desarrollarse en diferentes ambientes, por ejemplo, de alta salinidad o de baja concentración de oxígeno (Harris, 1993).

Los beneficios (crecimiento, fisiología y resistencia a patógenos) que tiene la aplicación de una o de varias cepas bacterianas en el alimento o el agua de cultivo de especies de interés comercial, ha llevado a la introducción del concepto de “probiótico” (Parker, 1974), cuya definición aún se encuentra en debate (Fuller, 1989; Gismondo *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Se ha distinguido el término de “probiótico” para separar a los microorganismos que actuarán en el TD del hospedero, de aquellos empleados en la investigación enfocada hacia la biorremediación de agua y suelos en las estanquerías de cultivo mediante el uso de clusters o consorcios microbianos que incluyen cepas bacterianas con capacidad para remover nitrógeno amoniacal. Debido a lo anterior, Gatesoupe (1999) propone catalogar el uso de las preparaciones microbianas en acuicultura reservando el término “probiótico” a bacterias transitorias o residentes en el tracto digestivo (Tannock, 1997), el término “biocontrol” para las cepas antagónicas a patógenos (Maeda *et al.*, 1997) y “biorremediación” para los microorganismos empleados para eliminar residuos contaminantes en el agua de cultivo.

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de la ONU (FAO, 2006) se considera probióticos a aquellos “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero”. Debido a sus potenciales beneficios, el uso de probióticos se ha extendido a diversas especies de cultivo tanto en ambiente marino como dulceacuícola.

Otra estrategia que ha cobrado gran importancia para mantener la salud de los organismos acuáticos es el uso de prebióticos, los cuáles son polisacáridos no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando el crecimiento

selectivo y/o la actividad metabólica de un número limitado de bacterias promotoras de la salud en el tracto intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Algunos ejemplos de prebióticos son la lactosa, la inulina y sus derivados (Teitelbaum y Walker, 2002). La inulina es un extracto natural de la raíz de algunas plantas y forma parte del grupo de los oligosacáridos con la composición de un hidrato de carbono de cadena larga. Forma parte de la fibra alimentaria y su incorporación a la dieta diaria es de gran importancia pues llega al intestino casi sin digerir por lo que aumenta el desarrollo de las bacterias. La inulina tiene diversas propiedades, entre ellas están la estimulación del crecimiento de la flora bacteriana y su actividad prebiótica pues promueve el crecimiento de microorganismos beneficiosos para la salud (Madrigal y Sangronis, 2007).

El ácido fúlvico es otro compuesto que puede ser incorporado al agua de cultivo y se forma a partir de materia orgánica en descomposición y tiene la propiedad de formar compuestos de bajo peso molecular con iones de carga positiva, un proceso conocido como quelación. El ácido fúlvico adicionado al agua de cultivo mejora el crecimiento y la respuesta inmune en peces, también promueve una curación más rápida de los peces infectados con ectoparásitos y la eliminación de metales y sustancias químicas en el agua (Meinelt *et al.*, 2004).

Por lo anterior, en este trabajo se estudió el crecimiento de semillas de almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratadas con productos naturales (probióticos, prebióticos y ácido fúlvico)

Se obtuvieron semillas de almeja y ostión en el Laboratorio Acuicultura Robles S.A. de C. V. (La Paz, B.C.S). Aunque los organismos traían un certificado de libre de patógenos, se aclimataron y depuraron por 10 días colocándolos en tinajas de plástico (1000 L) previamente montadas con agua filtrada a 30 ups y aeración constante. Las almejas adultas se recolectaron por buceo en El Caracol (Guasave, Sinaloa, México) (108 ° 74'W 25 ° 49'N) y los ostiones de cultivos comerciales. Los animales se transportaron en tanques de plástico de 250 L con agua de mar y aeración constante a las instalaciones del laboratorio.

En el laboratorio, los organismos se aclimataron durante 3 días colocándolos en 2 tinas de plástico (1000 L) con agua de mar filtrada (20 μm) a 30 ‰ y bajo aeración constante. Las almejas se alimentaron con un concentrado de microalgas Shellfish Diet 1800[®] (Reed Mariculture Inc., Campbell, CA, USA) compuesto por *Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*. Se hizo una limpieza y recambio de agua. En el bioensayo se usó agua de mar (30 ups). Posteriormente se puso aeración con piedras difusoras por 24 h para eliminar el cloro presente por volatilización. El agua se preparó en un tinaco con agua de mar filtrada con una malla de algodón de 20 μm y se ajustó la salinidad con agua dulce libre de cloro. Para el cultivo se utilizaron tinas de plástico con 80 L de agua de mar a 30 ppm. Se colocaron mangueras y piedras difusoras previamente lavadas en una solución diluida de ácido muriático. Durante los bioensayos se registraron las variables fisicoquímicas del agua: temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto. Además, los organismos estuvieron sujetos a fotoperiodo natural.

El experimento tuvo una duración de 20 d y se utilizaron semillas de catarina de 0.4-0.8 cm. En cada tina se colocaron 35 semillas. El bioensayo consistió en cuatro tratamientos, cada uno por triplicado: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC c/3 d; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) c/3 d y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) c/3 d. MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Las semillas se alimentaron todos los días con el concentrado de microalgas anteriormente mencionado. La limpieza de heces se hizo diariamente. Los probióticos se inocularon en el agua cada tres días, después de la limpieza y recambio de agua (50%). Semanalmente se registró la talla (altura, longitud, grosor de las valvas) y peso total del organismo. Además, se realizó un análisis microbiológico del intestino al inicio y al final del bioensayo. Se realizó un conteo de bacterias totales (medio tripticasa de soya), bacilos totales (medio tripticasa de soya), vibrios totales (medio TCBS), acidolácticas totales (medio MRS) y levaduras totales (medio YPD). También se realizó un análisis microbiológico del

agua al inicio y al final del bioensayo, al inicio para verificar que esté libre de vibrios totales y al final para comprobar que los probióticos estuvieran en el agua.

The specific growth rate (SGR) was determined using the following equation:

$$SGR = (LN W_t - LN W_0) \times 100/t$$

Where t is the culture period in days, LN W₀ is the natural logarithm of the weight of the clam at the beginning of the bioassay and LN W_t is the natural logarithm of the weight of the clam at day t (W₀ and W_t are in grams).

Los resultados de crecimiento en porcentaje se transformaron por medio de arcoseno $\sqrt{\%/100}$ para normalizar su distribución (Ostle, 1965). Posteriormente, se realizó un ANDEVA de una vía para detectar diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$) y una prueba de Tukey para identificar la naturaleza de esas diferencias ($P < 0.05$).

En la figura 1 se muestra el promedio del peso final durante los 20 d del bioensayo, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

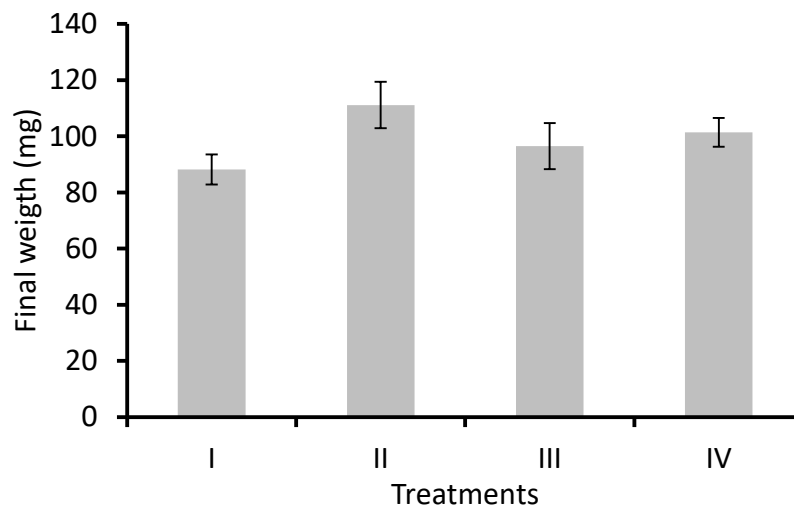


Figura 1. Peso de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina).

Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 2 se muestra la tasa de crecimiento específico (TCE) durante los 20 días que duró el bioensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

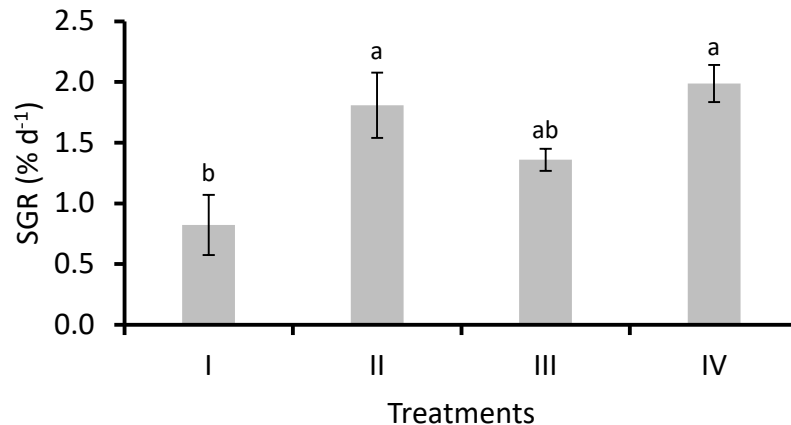
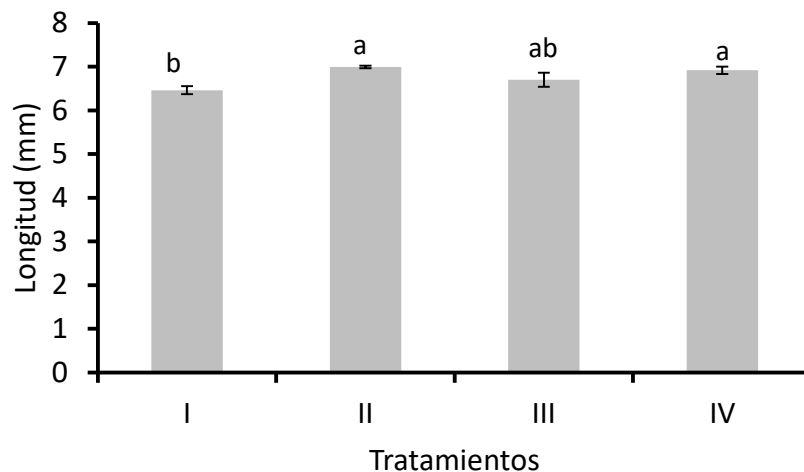


Figura 2. Tasa de crecimiento específico de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fólvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fólvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 3 se muestra el promedio de la longitud durante el bioensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0013$). El tratamiento I mostro diferencias significativas con el tratamiento II ($p = 0.0020$) y con el tratamiento IV



(p=0.0061).

Figura 3. Longitud de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 4 se muestra el promedio en cuanto a la altura de *A. ventricosus* durante el bioensayo. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0233$). El tratamiento I mostro diferencia significativa con el tratamiento II ($p = 0.0109$).

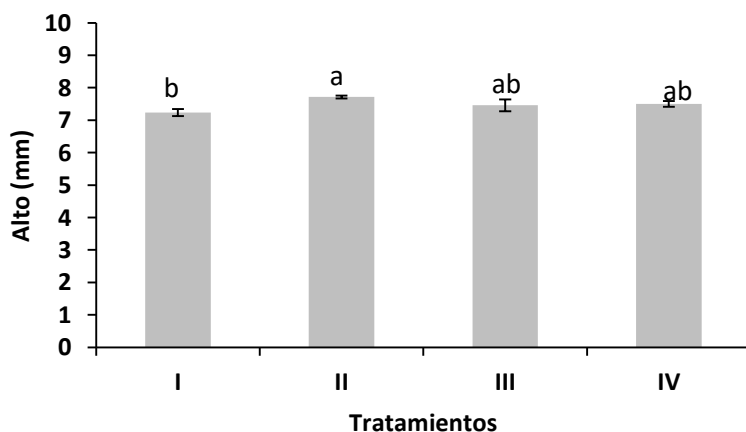


Figura 4. Alto de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC=

mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 5 se muestra el promedio en cuanto al ancho de *A. ventricosus*. Los resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.0132$). El tratamiento I fue significativamente diferente al tratamiento II ($p = 0.0348$) y el tratamiento II fue significativamente diferente al tratamiento III ($p = 0.0239$).

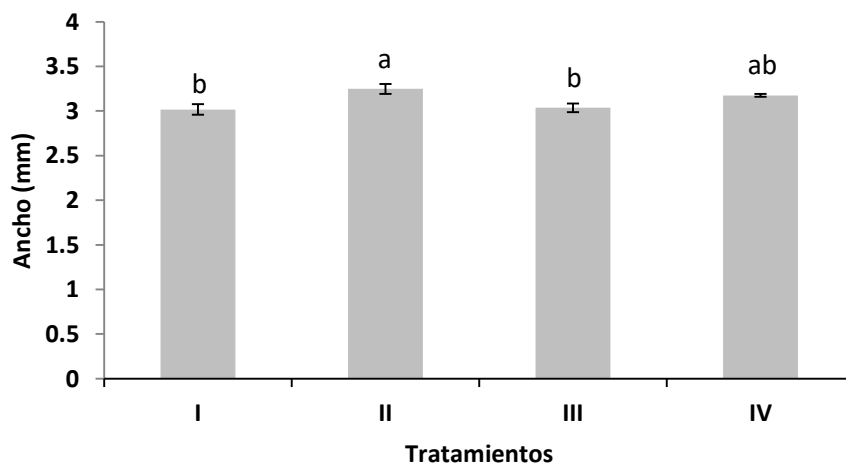


Figura 5. Ancho de *A. ventricosus*: I) Control, sin probióticos; II) Almejas tratadas MPAC; III) Almejas tratadas con inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L) y IV), Almejas tratadas con MPAC + inulina (2 mg/L) y ácido fúlvico (5 mg/L). MPAC= mezcla de probióticos de almeja catarina (1×10^6 UFC/L, 8×10^7 UFC/tina). Columnas y barras indican la media \pm EE. Diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

El peso final no presentó diferencias significativas. Sin embargo, en la TCE y en los datos registrados por las biometrías finales (peso, alto, largo y ancho) si mostraron diferencias significativas entre tratamientos, por ejemplo, en cuanto a las variables peso, alto y ancho el mejor tratamiento fue el tratamiento II (MPAC). En cuanto a longitud los mejores tratamientos fueron el II (MPAC) y el IV (MPAC más inulina y ácido fúlvico). Por lo tanto, el adicionar los productos naturales mejora el crecimiento de la almeja *A. ventricosus*. Esto coincide con lo reportado por Aguilar-

Macías *et al.* (2010), en donde se probó el uso de cepas de *Lactobacillus sp.*, *Burkholderia cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura marina *Yarrowia lipolytica* en el cultivo de juveniles de *P. mazatlanica*, encontrando que al administrar los microorganismos, se presentó una mayor supervivencia y crecimiento a diferencia del grupo control no tratado con ningún aditivo probiótico. Campa-Córdova *et al.* (2011) probaron el potencial probiótico de una bacteria ácido láctica y una mezcla de bacilos en la supervivencia y crecimiento larvario de *C. corteziensis*, encontrando mayor supervivencia con la mezcla de bacilos que con la bacteria ácido láctica, y que ambos tratamientos fueron mejores que los obtenidos en el grupo control, al cual no se le administró ningún probiótico.

Respecto al uso de inulina y ácido fólvico no existen reportes de su uso en cultivo de moluscos sin embargo, Gutiérrez-Dagnino *et al.* (2015) estudiaron el efecto del prebiótico inulina y ácido fólvico, adicionados en el alimento, en el crecimiento de *Litopenaeus vannamei*, encontrando que los aditivos no afectan negativamente el crecimiento.

Conclusiones

Los aditivos naturales mejoran el crecimiento de semillas de *A. ventricosus*.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Macías, O.L., J.J. Ojeda-Ramírez, A.I. Campa-Córdova & P.E. Saucedo. 2010. Evaluation of natural and comercial probiotics for improving growth and survival of the Pearl oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *Journal of the WAS* 41(3): 447-454.
- Baqueiro, C.E., R.I. Peña & J. Massó. 1984. Análisis de una población sobreexplotada de *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en la Ensenada de la Paz, B. C. S., México. *Cienc. Pesq.* 1(2): 57-65.
- Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, G. Aguirre-Guzmán, F. Ascencio & H.A. González-Ocampo. 2011. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión del placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Rev. Biol. Trop.* 59(1): 183-191.

- Canicatti, C. 1990. Distribution d'une activite lysozymiale dans un echinoderme holothuroide, *Holothuria polii*, et dans les oeufs et les larves d'un echinoderme echinoide, *Paracentrotus lividus*. Eur. Arch. Biol. 101, 309–318.
- FAO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Nutrition Paper. 85:1-50.
- FAO. 2014. Fishery information (year book of fishery statistics).
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. The J. of Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquac. Res. 180, 147–165.
- Gibson, G.R. & M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.
- Gismondo, M.R., L. Drago & A. Lombardi. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. Int. J. Antimicrob. Ag. 12:287-292.
- Gutiérrez-Dagnino, A., A. Luna-González, J.A. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, M. Flores-Miranda, S. Miranda-Saucedo, V. Medina-Beltrán & R. Escamilla-Montes. (2015). Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. Lat. Am. J. Aquac. Res., 43(5), 912-921. <https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-11>
- Harris, J.M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. Microbial Ecology 25: 195-231.
- Kesarcodi-Watson, I., M.M. Shivu, S.K. Girisha, G. Krohne & I. Karunasagar. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquac. Res. 274:1-14.
- Madrigal, L. & E. Sangronis. 2007. La inulina y derivados como ingredientes clave en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 57(4):387-396.
- Maeda, M., K. Nogami, S. Kanematsu & Y. Kotani. 1997. Manipulation of microbial communities for improving the aquaculture environment. UJNR Technical Report. 24:125-130.

- Meinelt, T., K. Chreckenbach, K. Knopf, A. Wienke, A. Stuber & C.E.W. Steinberg. 2004. Humic substances affect constitution and sex ratio of *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848). *Aquat. Sci.*, 66: 239-245.
- Ostle, B. 1965. *Estadística aplicada*. Limusa-Wiley, México. 629 pp.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Feed Techn.* 29:4-8.
- SAGARPA. (2013). *Diario Oficial*.
- Simudu, U. & K. Tsukamoto. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family vibronaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 781-790.
- Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. In: Mackie, R.I., White, B.A., Isaacson, R.E. Eds., *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 2, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*. Chapman and Hall Microbiology Series, International Thompson Publishing, New York. 434-465.
- Teitelbaum, J.E. & W.A. Walker. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition* 22: 107-138.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(4):655-671.

Expresión de genes relacionados con el sistema inmune en la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*) tratada con bacterias probióticas

Gabriela Berenice Mendoza Maldonado¹, Antonio Luna González¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Guasave, Sinaloa

ABSTRACT. Pathogens, mainly vibrios, cause great mortalities in larvae and seed hatcheries of mollusks and antibiotics generate bacterial resistance, so probiotics and

other additives are an alternative to increase production. CIIDIR Sinaloa has several strains of spore-forming bacteria, already pre-characterized and with probiotic potential, that were isolated from seeds of the catarina scallop *Argopecten ventricosus*. It was determined whether inoculating the isolates in the water improves the growth of the clam and cause immunostimulation. Therefore, isolates were identified at the molecular level and inoculated in water to determine the expression of genes related to the immune system. Bacterial isolates were identified as *Bacillus horikoshii*, *Bacillus aerius*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp., *Bacillus* sp. and *Bacillus* sp. The addition of probiotic bacilli in the water of the culture system of *A. ventricosus* improves its immune response.

Key words: *Argopecten ventricosus*, probiotics, immunology, gene expression.

In Sinaloa, there are several species of bivalves subject to fishing for the local market, which are the only source of income for many families in the fishing fields located on the margins of the bays. Among the exploited bivalves, *Anadara* spp. (Arcidae), *Dosinia* spp. (Veneridae), *Chione* spp. (Veneridae), *Megapitaria* spp. (Veneridae) and *Argopecten* spp. (Pectinidae). However, natural populations have gradually decreased as a result of immoderate extraction, coupled with the little interest that has been given to the knowledge of their biology and ecology, which undoubtedly are the bases for their exploitation and sustainable cultivation (Contreras-Espinosa, 1993 ; Santoyo-Reyes, 1994). An example of this is the clam catarina (*Argopecten ventricosus*), which was an important fishing resource in Mexico, mainly in Baja California Sur (Ruiz-Verdugo et al., 2016) until 1993, when overfishing collapsed natural populations (Santamaría et al. al., 1999). Due to this, efforts have been made to develop the mariculture of this species with the final purpose of recovering populations in fishing areas (Medina et al., 2007).

Despite the dominance over the culture of the catarina clam, as in other bivalves, diseases are an important bottleneck causing significant losses in production (Romero et al., 2012). This is due to the fact that when cultivating the molluscs in the culture tanks, an artificial environment is created that favors the proliferation of opportunistic bacteria such as vibrios, which are often pathogenic (Sindermann,

1990). The severity of its attack is related to the suboptimal conditions of the crop (high density, contaminated microalgae, residual gametes, high temperatures), which increases bacterial proliferation and compromises the immune response of infected organisms (Elston, 1984).

Molluscs, like all invertebrates, have a defense system called innate immunity or natural that protects them against pathogens. This immune system is represented mainly by hemocytes, plasma proteins and integrated reactions in multimeric systems that involve both components, cell and humoral (Vargas and Barracco, 2001). Because the bivalve molluscs have an open circulatory system composed of sinuses, the hemolymph bathes all tissues and allows the hemocytes and humoral components to be distributed evenly, favoring the encounter with the particles (biotic and abiotic) (Allam and Paillard, 1998).

The immune system of cultivated species can be stimulated by various natural products, including probiotics, which, in addition to the above benefit, improve water quality, produce antimicrobial compounds, increase host nutrition and compete with pathogenic bacteria (Kesarcodei-Watson et al., 2008, Romalde and Barja, 2010).

Therefore, the immune response was studied by means of gene expression in *A. ventricosus* in cultures in the laboratory, where they were fed with probiotics in water. Knowledge of the immune response at the genetic level is aimed at the design, in the future, of strategies for the prevention (prophylaxis) of diseases, mainly bacterial and viral, in larvae and seed production laboratories.

The adult clams () were collected by diving in El Caracol (Guasave, Sinaloa, Mexico) (108 ° 74'W 25 ° 49'N) and transported in 250 L plastic tanks with sea water and constant aeration to the facilities of the laboratory. In the laboratory, the organisms were acclimated for 3 days by placing them in a plastic tubs (120 L) with filtered seawater (20 µm) at 30 ups and under constant aeration. The bioassay lasted 48 hours and adults were 4.0-5.0 cm long. 12 clams were placed in a 120 L tub with filtered water (20 µ) and constant aeration was applied. The effect of the addition of six probiotic bacteria isolated from the catarina clam was evaluated.

The organisms were fed every day with a concentrate of microalgae (*Isochrysis*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira pseudonana*). The stool was cleaned daily and

the water lost was replaced. At zero hours (before the inoculation of the bacillus) and at 48 h, 6 clams were taken, 12 in total. The hemolymph of the adductor muscle of the organisms was extracted with an insulin syringe and this was placed in an ice-cold Eppendorf tube. The samples were centrifuged in a refrigerated centrifuge (Sigma) at 800 x g for 10 min and 300 μ L of RNALater was added to the hemocyte pellet for the analysis of the expression of genes related to the immune system by means of the RT-qPCR.

There were six isolates of spore-forming bacteria obtained from catarina clam seeds that have already been partially characterized, so in this work they were only identified at the molecular level. 50 μ L of each isolate was inoculated, individually, in 100 mL of broth soya medium trypticase contained in a 250 mL Erlenmeyer flask. It was incubated at 35 ° C for 18-24 h. The cells were collected by centrifugation at 3,000 x g for 15 min. For total DNA extraction, between 100-300 mg of sample was placed in an eppendorf tube and 200 μ L of 3% CTAB buffer was added, previously heated to a temperature of 60 ° C with 0.2% β -mercaptoethanol. Subsequently, the tissue was perfectly macerated using a sterile pistil and 600 μ L more of the 3% CTAB buffer was added. It was homogenized and incubated at 60 ° C for 10 minutes with inversion shaking every two minutes. Then 600 μ L cold chloroform: isoamyl alcohol (-20 ° C) (24: 1) was added, vigorously stirred and centrifuged for 10 minutes at 13,000 g. The upper phase (approximately 400 μ L) was transferred to a clean eppendorf tube and 400 μ L of cold 100% isopropanol (-20%) was added by inversion and centrifuged immediately for 8 minutes at 13,000 g. It was observed that a tablet formed at the bottom of the tube, the supernatant was decanted while preserving the tablet. Subsequently, 250 μ L of cold 70% ethanol (-20 ° C) was added, it was shaken gently and centrifuged for 3 minutes at 13,000 g, the supernatant was decanted while keeping the tablet in the tube. The tablet was allowed to dry and resuspended in 30 μ L of ultrapure water. The identification of the isolates was carried out by amplifying the 16S gene of the ribosomal DNA. The primers used in the PCR will be the following: 27 F (5'-agagtttgatcctggctcag-3 ') and 1525 R (5'-ggctacctgttacgactt-3') (Lane, 1991). The size of the fragment was approximately 1500 bp. The reaction mixture for the PCR

will be carried out in 0.2 mL Eppendorf tubes, in a total volume of 25 μ L: 18.75 μ L of H₂O; 2.5 μ L of 10X reaction buffer (Dream Taq Buffer, Fermentas); 0.5 μ L of dNTPs (10 μ M; Bioline); 0.5 μ L of each oligo (20 μ M each, IBT-UNAM), 0.25 μ L of Taq polymerase (5 U/ μ L, Dream Taq) and 1 μ L of DNA. The amplification was carried out in a thermal cycler (Tpersonal, Biometra) using the following program: initial denaturation at 94 ° C for 5 min, 30 cycles of 94 ° C, for 1 min, 55 ° C, for 1 min, for the alignment, 72 ° C for 1.5 min for the extension and 72 ° C, for 10 min, for the final extension. The amplified fragments were visualized (including a molecular weight marker of 1 kb) on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide, under UV light. Purification of the PCR product was carried out with the QIAquick PCR Purification Kit (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. The DNA obtained was stored at -20 ° C.

The purified PCR product was sent to the sequencing laboratory of CINVESTAV Irapuato. Finally, the sequence obtained was compared with the nucleotide sequences reported in the genomic bank (GeneBank database) using the NCBI BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Three bacterial isolates were identified at the species level and three at the genus level. As expected, the 6 isolates belong to the genus *Bacillus* (Table 1).

Table 1. Molecular identification of the isolates tested as probiotics in the catarina clam (*A. ventricosus*).

Isolate	Specie	GeneBank Identity (99%)
---------	--------	-------------------------

1	<i>Bacillus horikoshii</i>	99
2	<i>Bacillus aerius</i>	99
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
4	<i>Bacillus subtilis</i>	97
5	<i>Bacillus pumillis</i>	97
6	<i>Bacillus</i> sp.	96

The addition of the bacillus mixture in the culture water of *A. ventricosus* significantly increased the expression of the HSP70, PEL and qPUP genes at 48 h compared to zero hours (control) (Fig. 1).

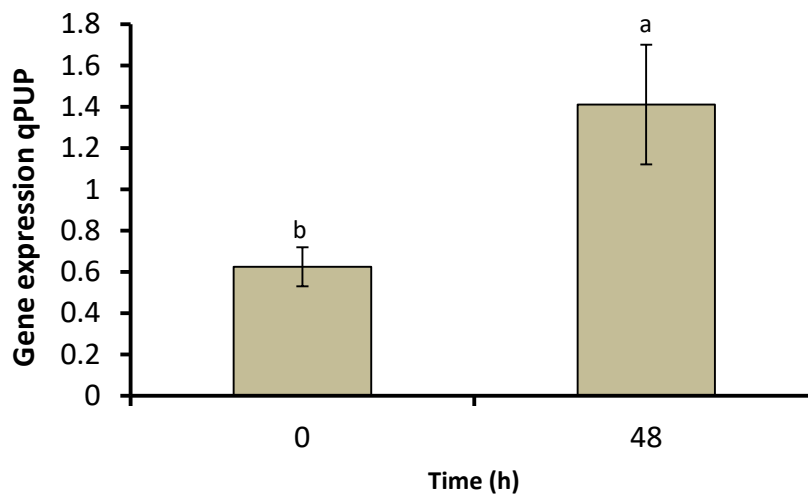
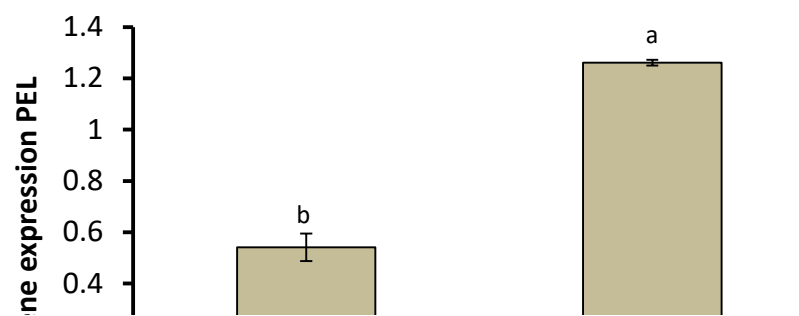
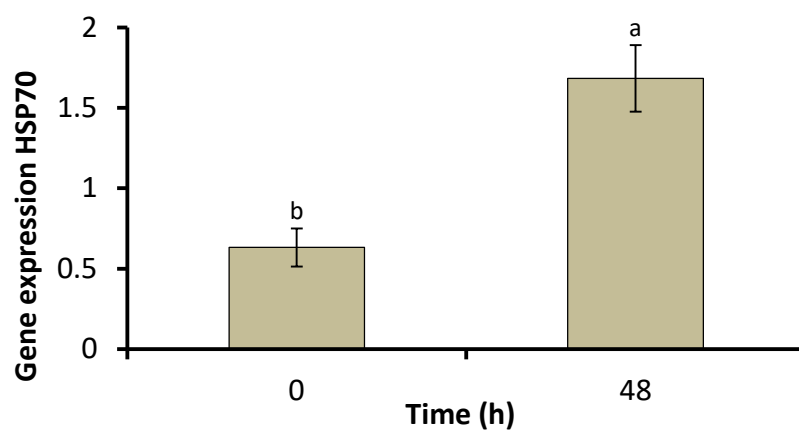


Figure 1. Relative expression of the genes related to the immune system: HSP70, PEL and qPUP, at 0 and 48 h in *A. ventricosus* treated with the bacillus mixture (1×10^6 CFU/L). Columns and bars indicate the mean \pm EE. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

The study of the immune system of cultivated organisms, generates basic knowledge that allows the implementation of strategies to prevent diseases in farming systems. Therefore, in this work, an increase in the expression of three genes related to the immune system of the catarina clam was demonstrated for the first time in a bivalve mollusc. HSP proteins are expressed during heat stress, oxidative stress, malnutrition, viral and bacterial infections, among other stimulating conditions (Asea et al., 2007, Hickey & Singer, 2004, Multhoff, 2007), but it has also been observed that they have a role in the immune response as chaperones (Spagnolo et al., 2007). Lacoste in 2001 said that Expression of heat shock proteins (hsp) is a homeostatic mechanism induced in both prokaryotic and eukaryotic cells in response to metabolic and environmental insults. In his study, he examined the effect of noradrenaline (NA) on the hsp70 response in mollusc immune cells (oyster and abalone). The results demonstrate that exposure to NA leads to the induction of the hsp70 gene promoter in both gastropod and bivalve immune cells. De Silva in 2017 demonstrated the inducibility of *Biomphalaria glabrata* HSP70 by cadmium, a relevant environmental contaminant, at non-lethal levels, providing evidences that the assessment of HSP70 in *B. glabrata* can be regarded as a suitable biomarker for ecotoxicological studies. Laranja et al. in 2017 they carried out a study on postlarvae of shrimp *P. monodon*, where they fed the organisms with Artemia enriched with *Bacillus* sp. JL47, later challenged the shrimp with *V. campbelli*. They found that before the challenge there

were no significant differences regarding the expression of HSP70 with respect to the control (without *Bacillus sp.*JL47), however after the challenge it was shown a significant positive regulation and an increase in the expression of HSP70 was observed. both in the control treatment and in the treatment with *Bacillus sp.*, this differs with this work, since if we found significant differences in the expression of HSP70 between the control and the treatment in which we added *Bacillus* mixture, in the present study we did not challenge , therefore we can not compare that part of the experiment of Laranja et al. 2017. Werner and Hinton (1999) found that both the increase and the decrease in the regulation of HSP70 proteins can be an indicator of stress in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*). Sánchez *et al.* 2015 found a subexpression of the HSP70 gene in *L. vannamei* in treatments in which it added potentially probiotic bacteria, which suggests a lower level of stress, but also a response derived from the immunostimulatory effect of the bacterial mixture, which also differs from the results obtained in this work.

The qPUP is a peptidoglycan-binding protein-like molecule that is involved in the innate immune response by the degradation of the wall formed by peptidoglycans in the bacterial ones. In the fish *Oplegnathus fasciatus*, PUP, it has a very important function in the agglutination of Gram (-) and Gram (+) bacteria and promotes phagocytosis in leukocytes (Choi et al., 2018). Regarding the PEL molecule, it was discovered in 2015 that it is involved in the proliferation of lymphocytes in humans; however, in fish, crustaceans and molluscs there is no work, so this would be the first report on invertebrates.

REFERENCES

- Allam, B. & C. Paillard. 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aquat. Org.* 33:123-128.
- Asea, A. 2007. Mechanisms of HSP72 release. *Journal of Biosciences* 32: 579–584.
- Choi, K.M.; M.S. Joo; D.H. Cho; J.S. Bae; J.M. Jeong; W.S. Woo; H.J. Han; D.C. Lee; M.Y. Cho; S.H. Jung; D.H. Kim; C. Park. 2019. Molecular characterization, expression and functional analysis of peptidoglycan recognition protein-SC2

- from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. Fish and Shellfish Immunology 77: 286–293.
- Contreras-Espinosa, F. 1993. Ecosistemas Costeros Mexicanos. UAM-CONABIO. México, D.F. 415 pp.
- Elston, R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. Journal of the WAS, 15 (1-4): 284-300.
- Hickey, D. & G. Single. 2004. Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. Genome Biol. 5:117.
- Kesarcodi-Watson, I.; M.M. Shivu; S.K. Girisha; G. Krohne & I. Karunasagar. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquac. Res. 274:1-14.
- Lacoste, A.; M.C. De Cian; A. Cueff & S.A. Poulet. 2001. Noradrenaline and alpha-adrenergic signaling induce the hsp70 gene promoter in mollusc immune cells. J Cell Sci. 2001 Oct. 114 (Pt 19): 3557-64.
- Laranja, J. L. Q., Amar, E. C., Ludevese-Pascual, G. L., Niu, Y., Geaga, M. J., De Schryver, P., and Bossier, P. A probiotic *Bacillus* strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of *Penaeus monodon* postlarvae. Fish Shellfish Immunol., 68: 202–210 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.023>
- Medina, B.; H.M. Guzman & J.M. Mair. 2007. Failed recovery of a collapsed scallop fishery in Las Perlas Archipelago, Panama. J. Shellfisheries Res. 26, 9-15.
- Meng, X.; M. Liu; K. Jiang; B. Wang & X. Tian. 2013. De Novo Characterization of Japanese Scallop *Mizuhopecten yessoensis* Transcriptome and Analysis of Its Gene Expression following Cadmium Exposure. PLoS ONE 8(5): e64485. doi:10.1371/journal.pone.0064485
- Multhoff, G. 2007. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. Methods 43: 229–237.
- Romalde, J.L. & J.L. Barja. 2010. Bacteria in molluscs: good and bad guys. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Mibrobial Biotechnology. 136-147)

- Romero, A.; B. Novoa & A. Figueras. 2012. Genomics, immune studies and diseases in bivalve aquaculture. ISJ 9: 110-121.
- Ruiz-Verdugo, C.A.; V. Koch; E. Félix-Pico; A.I. Beltrán-Lugo; C. Cáceres-Martínez; J.M. Mazón-Suástegui; M. Robles-Mungaray & J. Cáceres-Martínez. 2016. Scallop Fisheries and Aquaculture in Mexico. In: Shunway, S., Pearson (Eds), Scallops.
- Sánchez, A.C.; A. Luna; A.I. Campa; R. Escamilla; M.C. Flores & J.M. Mazón. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin american journal of aquatic research*, 43(1), 123-136. <https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue1-fulltext-11>
- Santamarina, M.A.; R.P. Pérez; M.S.H. Tomas; C.L. Enrique & A.G. Flores. 1999. The *Romanormis oiyengari* parasite for *Anopheles pseudopunctipennis* suppression in natural habitats in Oaxaca State, Mexico. *Rev. Panam. Salud Publ.* 5:23-8.
- Santoyo-Reyes, H. 1994. Fitoplancton y productividad. In: DE LA LANZA ESPINO G. y C. CÁCERES (Eds.). *Lagunas Costeras y el Litoral Mexicano*. México. 525 p.
- Sindermann, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish: diseases of marine shellfish. 2nd Ed., Vol. 2. Academic Press, San Diego, 516 pp.
- Spagnolo, P.; H. Sato; S.E. Marshall; K.M. Antoniou; T. Ahmad; A.U. Wells; M.A. Ahad; S. Lightman; R.M. du Bois & K.I. Welsh. 2007. Association between heat shock protein 70/hom genetic polymorphisms and uveitis in patients with sarcoidosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 3019–3025.
- Vargas-Albores, F. & M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. En: A.N. Maeda-Martínez (ed.). *Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, D.F. pp. 127-146.

Werner, I. y D.E. Hinton. 1999. Field validation of HSP70 stress proteins as biomarkers in Asian clam (*Potamocorbula amurensis*): is downregulation an indicator of stress? *Biomarkers*. 4(6):473-484.