



Inhibición del quórum sensing mediante el quórum quenching en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*

Inhibition of the quorum sensing by quorum quenching in postlarva of *Litopenaeus vannamei*

Autores: Jefferson Intriago Angulo¹⁻²⁻³
Juan Quimi Mujica²⁻³⁻⁴
Jordana López Parra²⁻³
David Villarreal de la Torre¹
Edmundo Matute¹
Jenny Risco Cunayque²⁻³
María Bermúdez Basan²
Emmerick Motte Darracau²⁻³⁻⁴
Virna Cedeño Escobar²⁻³⁻⁴
Eric Mialhe²⁻³⁻⁴

Dirección para correspondencia: ijeffersonjavier@gmail.com

Recibido: 28-12-2019

Aceptado: 10-04-2020

Resumen

El cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un recurso acuícola de gran importancia económica a nivel mundial; sin embargo, es severamente afectado por varios tipos de enfermedades infecciosas, principalmente virales y bacterianas. Sin embargo las pérdidas masivas reportadas durante los últimos años, están generalmente relacionadas a infecciones bacterianas en particular, el síndrome de mortalidad temprana (EMS) y más recientemente relacionada a la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) por sus siglas en ingles. Para asegurar la sostenibilidad de la industria del camarón, se debe

¹ Facultad Ciencias del Mar. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Ecuador.

² Biotecnología aplicada al cultivo sostenible de crustáceos. Concept azul S.A Guayaquil-Ecuador.

³ Aplicaciones biotecnológicas al cultivo de crustáceos. Inca Biotec SAC. Tumbes. Perú

mejorar la productividad en particular mediante el uso de consorcios de bacterias probióticas eficientes para la prevención de las enfermedades bacterianas. Dos consorcios de bacterias probióticas (consorcios comerciales y consorcio CA), fueron evaluados en pruebas in vitro y en tanques de producción de post-larvas de camarón *L. vannamei*, donde se realizó la determinación subsecuente del grado de inhibición del quórum sensing de las bacterias patogénicas mediante el quórum quenching de bacterias probióticas y paralelamente a los análisis de sobrevivencia. Como resultados el consorcio CA fue el que presentó mayor grado de inhibición del quorum sensing in vitro en paralelo a los mayores porcentajes de sobrevivencia en tanques de producción de post-larvas de camarón. El mejor efecto probiótico en post-larvas de *L. vannamei* resultaron en los tratamientos del consorcio CA, como los mejores supresores en la presencia de vibrios en el cultivo bacteriológico así como mayores porcentajes de sobrevivencia en tanques de producción de post-larvas de camarón.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*; quorum sensing; quorum quenching; bacterias patogénicas; bacterias probióticas

Abstract

The cultivation of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is an aquaculture resource of great economic importance worldwide; however, it is severely affected by several types of infectious diseases, mainly viral and bacterial. However, the massive losses reported in recent years are generally related to bacterial infections in particular, early mortality syndrome (EMS) and more recently related to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). To ensure the sustainability of the shrimp industry, productivity must be improved in particular by the use of efficient probiotic bacteria consortia for the prevention of bacterial diseases. Two consortia of probiotic bacteria (commercial consortia and CA consortium) were evaluated in in vitro tests and in post-larvae production tanks of *L. vannamei* shrimp, where the subsequent determination of the degree of inhibition of the quorum sensing of pathogenic bacteria was carried out. By the quenching quorum of probiotic bacteria and parallel to the survival analysis. As a result, the CA consortium showed the greatest degree of inhibition of in vitro quorum sensing in parallel to the higher survival rates in shrimp post-larval production tanks. The best probiotic effect in post-larvae of *L. vannamei* resulted in the CA consortia treatments, as the best suppressors in the presence of vibrios in the bacteriological culture as well as higher survival rates in post-larvae shrimp production tanks

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; quorum sensing; quorum quenching; pathogenic bacteria; probiotic bacteria

Introducción

El cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei* es un recurso acuícola de gran importancia a nivel mundial y nacional. Sin embargo el cultivo de camarón ha

sido afectado por enfermedades infecciosas, entre ellas las virales y bacterianas (Tandel et al., 2017; Lightner et al., 2012; Flegel TW, 2012).

Pero las grandes pérdidas masivas reportadas durante los últimos años, están generalmente relacionadas a infecciones bacterianas en particular, mortalidades el síndrome de mortalidad temprana (*Early Mortality Syndrome EMS*) y más recientemente relacionada con la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda EMS/AHPND (*early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease*) (Boonyawiwat et al., 2017).

Estudios epidemiológicos y datos moleculares se han realizado en algunos países afectados por el síndrome EMS/AHPND, donde *Vibrio parahaemolyticus* se caracterizó como causante de la mortal pandemia (Nunan et al., 2014; Gomez-Gil et al., 2014).

Los plásmidos involucrados en la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* fueron posteriormente detectados en otras especies de vibrios, sugiriendo que la transferencia interespecifica de plásmidos podría ocurrir en cultivos de camarones (Xiao et al., 2017)

En la patogenicidad de vibrio está involucrado el proceso de quórum sensing que es la comunicación bacteriana regulada por pequeñas moléculas de señalización difusibles *N-acylated homoserine lactones* (AHLs) incluyendo C6-HSL (*N-hexanoyl-L-homoserine lactone*, HHL) (Fuqua et al., 2001; Ng WL & Bassler BL, 2009; Kamruzzaman et al., 2010; Defoirdt et al., 2011; Fast & Tipton, 2012), las cuales activan la expresión de numerosos genes que controlan diversas funciones como luminiscencia, virulencia, formación de biofilm esporulación (Bhardwaj et al., 2013).

Sin embargo la inhibición del quórum sensing o quórum quenching ha sido propuesta como una nueva estrategia para atenuar la patogenicidad bacteriana, mediante el uso de bacterias probióticas que degraden la señal involucrada en la detección del quorum sensing (Tinh et al., 2007), así como de otros beneficios sobre el hospedero, mejorando la asimilación de alimento, valor nutricional y mejoramiento en la respuesta del huésped ante enfermedades (Zuo et al., 2018).

Varios estudios relacionados a la inhibición del quórum sensing mediante el quórum quenching han sido publicados. El equipo de Vinoj et al., (2014) evaluaron la actividad de quórum quenching de la AHL lactonasa de *Bacillus licheniformis* para inhibir la formación de biofilm de *Vibrio* in vitro y reducir la colonización intestinal y mortalidad del camarón. Sugiriendo que la actividad del quórum quenching de *B. licheniformis* puede ser desarrollado para su uso como un tratamiento profiláctico para inhibir o reducir la colonización vibrio y la mortalidad de los camarones en la acuicultura. Además de otros estudios como de Rayesh et al., (2014); Tang et al, (2015); Augustine et al., (2010).

En el presente estudio se analizó los efectos de consorcios de bacterias probióticas comerciales y el consorcio CA1 sobre el sobre el grado de inhibición

del quórum sensing de las bacterias patógenas y en tanques de producción de postlarvas de camarón blanco *L. vannamei* en paralelamente a los análisis de sobrevivencia

Metodología

Acondicionamiento y siembra de nauplios de *L. vannamei*

La inoculación de los consorcios de bacterias probióticas se llevó a cabo en el laboratorio de producción de post-larvas de *L. vannamei* BAMAR S.A Jama-Ecuador y en MITOLAB orgánico S.A Salinas-Ecuador. El proceso de acondicionamiento para el cultivo de post-larvas empezó con la aclimatación de los nauplios de 36 horas post eclosión (nauplio V) de varios orígenes de maduración, bajo condiciones adecuadas de temperatura, pH y oxígeno, posteriormente se realizó la siembra en tanques de 14 y 25 m³ de fibra de vidrio y recubiertas con geomembrana asegurando las condiciones de la calidad del agua, la temperatura se mantuvo en promedio de 32 °C durante todo el ciclo larvario, y la alimentación estuvo basada en el protocolo interno de producción de la empresa la cual se maneja por los porcentajes de biomasa, el recambio de agua fue del 20% diario a partir de los 6 días de iniciado el cultivo.

Obtención y preparación de bacterias probióticas

Las bacterias probióticas del consorcio CA (6 cepas de *Bacillus* spp.) fueron aisladas a partir de muestras de intestino de camarón blanco nativo silvestre de acuerdo al protocolo del laboratorio de Biotecnología Concepto Azul S.A., las cuales fueron cultivadas en caldo Trypticase Soya (TCS) a 37 °C durante 24 h, con agitación. La concentración de bacterias en suspensión del género *Bacillus* fue obtenido usando una curva estándar de relación a una densidad óptica de 600 nm. Mientras que las bacterias del tratamiento control son mix de bacterias probióticas comerciales encontrados en el mercado acuícola listas para su inoculación en los tanques de producción de post-larvas de camarón

Extracción de ADN bacteriano

La suspensión bacteriana contenida en los microtubos, serán centrifugadas a 10 000 rpm durante 2 minutos; luego se eliminará el sobrenadante y se re-suspenderá el sedimento (pellet) en 500 µl de solución PBS 1X. Nuevamente se centrifugará a 10 000 rpm durante 2 minutos, se eliminará el sobrenadante y se adicionará 200 µl de solución TE. Las muestras serán llevadas a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente serán colocas en hielo durante 5 minutos. Luego serán centrifugas a 10 000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente se tomará 10 µl del sobrenadante y se colocará en un nuevo microtubo, y luego se le adicionará 90 µl de agua ultra pura.

Amplificación del gen AHL lactonosa y migración en gel de electroforesis

Se utilizaron primers para el gen AHL lactonasa, forward y reverse aiiAF2 (5'-CGGAATTCATGACAGTAAAGAAGCTTTA-3') y aiiAR2 (5'-CGCTCGAGTATATATTCAGGGAACACTT-3') (Huma et al., 2011). Las reacción

de amplificación fue realizada usando una taq ADN polimerasa; para reacciones de alta fidelidad. Las condiciones de los ciclos de PCR (*Polimerase chain reaction*) para la amplificación de la AHL lactonasa de los consorcios de bacterias probióticas normalmente incluido 95 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 53 °C por 45 s, 72 °C por 1 min, seguido de un solo ciclo de 72 °C por 8 min.

La migración electroforética de los amplicones (productos de la PCR) se realizará en geles de agarosa al 2% conteniendo 5 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), se utilizará como tampón de migración 120 ml de TAE 1X. Para la migración se tomará 10 µl de cada amplicon y se mezclará con 2 µl de tampón de depósito, también se migrará el marcador de peso molecular.

Ensayos in vitro de antagonismo de los consorcios de bacterias probióticas frente a bacterias patógenas

La prueba de antagonismo se realizó en medio TSA con 2% de ClNa. En cada placa se sembró 20 µl de cepas de vibrios por método de esparcimiento, se dejó secar por unos 20 min y luego se le colocaron los discos de papel filtro estériles y en cada papel filtro se colocó la misma cantidad 20 µl de los consorcios de bacterias probióticas; se procedió a sellarlas con cinta adhesiva y luego incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. La zona de inhibición se realizó un ponderado con la siguiente característica: * nivel leve, ** nivel medio, *** nivel fuerte de inhibición.

Inoculación de bacterias probióticas en tanques de producción de postlarva de camaron blanco *L. vannamei*

En la inoculación de bacterias probióticas en tanques de producción de postlarvas de camarón *L. vannamei*, el tratamiento control corresponde al protocolo de producción del laboratorio BAMAR S.A y MITOLAB S.A donde se aplican varios consorcios comerciales con una gran variedad de bacterias probióticas y a una concentración final en la columna de agua de 10⁵ UFC/ml. Sin embargo el tratamiento con el consorcio de bacterias probióticas CA corresponde a una concentración de 10⁴ UFC/ml, entonces 10 veces menos.

Análisis estadístico

La representación de los datos de supervivencia en tanques de producción de postlarvas de camarón, se realizó con el software InfoStat, con análisis de varianza ANOVA de una sola vía para analizar las diferencias entre los dos tratamientos (P<0,05); asimismo, se comprobó las diferencias entre tratamientos con el test de Tukey y LSD.

Resultados

PCR del gen AHL lactonasa

La prueba de PCR fue realizada para el gen AHL lactonasa de los diferentes mix de bacterias probióticas, donde el consorcio CA dio positivo para AHL

lactonasa, mientras que los mix de bacterias comerciales dio positivo para algunos casos como se detalla en la tabla 1

Tabla 1.- PCR del gen AHL lactonasa. Consorcio de bacterias probióticas comerciales y el consorcio de bacterias probióticas CA

PCR de diferentes consorcios de bacterias probióticas						
Gen AHL lactonasa	Mix # 1	Mix # 2	Mix # 3	Mix # 4	Mix # 5	Mix CA
	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)

Fuente: Obtenido de la migración en gel de agarosa al 2% en el laboratorio Inca Biotec SAC

Pruebas de antagonismo entre consorcios de bacterias probióticas con bacterias patogénicas

En cuanto a los ensayos de antagonismo entre consorcio de bacterias probióticas con bacterias patógenas, el consorcio CA tuvo mejores niveles de inhibición, así teniendo los mayores halos de inhibición contra *V. harveyi*, *V. nigripluchritudo*, *V. parahaemolyticus* y el menor halo de inhibición contra *V. brasiliensis*. Mientras que los consorcios de bacterias probióticas comerciales tuvieron menores halos de inhibición en comparación al consorcio CA (tabla 2, figura 1).

Tabla 2.- Nivel de inhibición entre los consorcios de bacterias probióticas con vibrios patógenos. consorcio de bacterias probióticas comerciales encontrados en el mercado acuícola y el consorcio de bacterias probióticas CA. Nivel de inhibición leve (*), nivel de inhibición medio (**), nivel de inhibición fuerte (***)

	Mix # 1	Mix # 2	Mix # 3	Mix # 4	Mix # 5	Mix CA
<i>V. sinaloensis</i>	**			**		**
<i>V. harveyi</i>			*	*		***
<i>V. nigripulchritudo</i>	**		*		**	***
<i>V. brasiliensis</i>		*				*
<i>V. parahaemolyticus</i>	*	**		*	*	***
<i>V. alginolyticus</i>	***			**		**

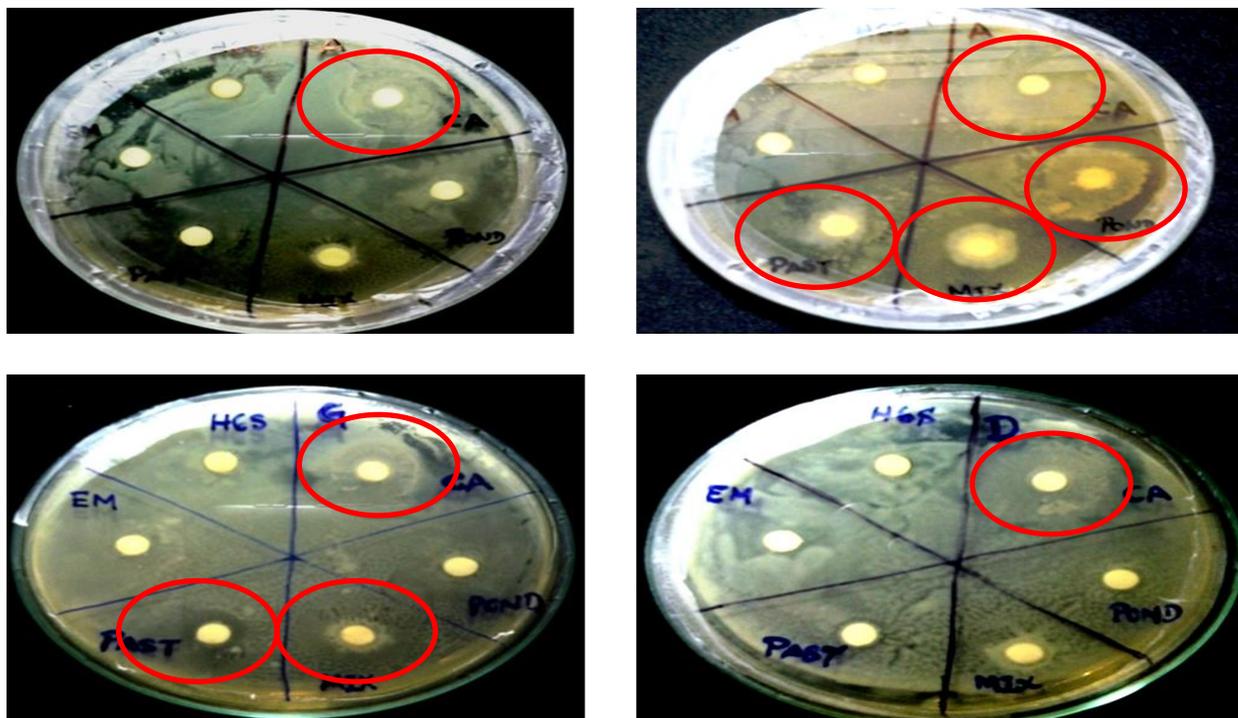


Figura 1.- Inhibición entre los consorcios de bacterias probióticas contra vibrios patógenos. Cultivo en placas en medio TSA de los consorcios de bacterias probióticas comerciales encontrados en el mercado acuícola y el consorcio de bacterias probióticas CA

Porcentaje de supervivencia de postlarvas en tanques de producción de postlarvas de *L. vannamei*

El ensayo en la empresa BAMAR S.A el tratamiento CA, fue el que presentó mayores porcentajes de supervivencia en tanques de producción de post-larvas de camarón *L. vannamei*, siendo en el mes de septiembre con nauplios de origen del laboratorio de maduración BAMAR S.A, con el mayor porcentaje de supervivencia, donde se obtuvo una diferencia del 14% en comparación con el grupo control como se puede observar en la figura 2. Sin embargo la inoculación del consorcio CA no tuvo diferencias significativas en comparación al tratamiento control

Mientras que en la empresa MITOLAB S.A el tratamiento CA, fue quien mostró mayores porcentajes de supervivencia siendo en el mes de octubre con nauplios de origen del laboratorio de maduración # 3 con el mayor porcentaje de supervivencia, donde se obtuvo una diferencia significativa del 18% en comparación con el grupo control y la menor supervivencia en el mes de septiembre con los nauplios de origen del laboratorio de maduración # 1, esto último se debió a la variación de temperatura que origino un estrés en el cultivo larvario teniendo, el tratamiento con CA presentó una mejor supervivencia con una diferencia del 5% en comparación con el tratamiento control (figura 2)

Además debemos señalar que se realizó la prueba de supervivencia a cambios bruscos de salinidad de 30 a 0 ppt, teniendo como resultado obtenido que las

larvas inoculadas con el consorcio de bacterias probióticas CA tuvo menos porcentajes de mortalidad en comparación al grupo control.

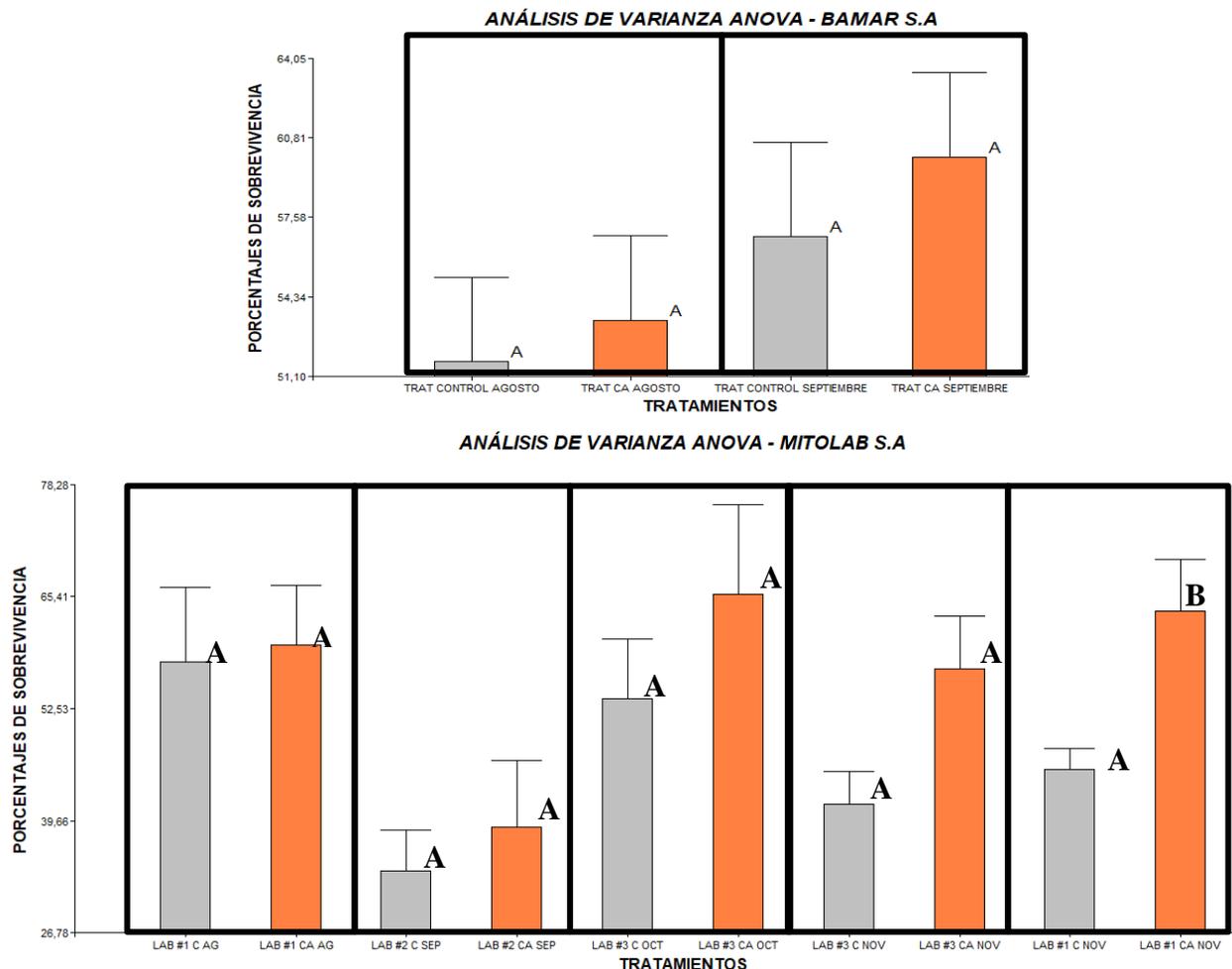


Figura 2.- Porcentaje de supervivencia de postlarvas de *L. vannamei* en tanques de producción del laboratorio BAMAR y MITOLAB. - Barras estadísticas en InfoSTAT con porcentajes de producción de postlarvas de camarón con diferentes orígenes de nauplio y con la inoculación del consorcio CA y grupo control en diferentes meses del año. Prueba de comparación de medias utilizando el método de Tukey (valor $p > 0,05$)

Discusión

Los agentes patógenos dependen del quórum sensing, pequeñas moléculas de señalización que activan la expresión de numerosos genes que controlan diversas funciones como luminiscencia, virulencia, formación de biofilm esporulación. La inhibición del quórum sensing o quórum quenching puede ser usado como una nueva estrategia para atenuar la virulencia bacteriana (Bhardwaj et al., 2013).

En nuestros datos el consorcio de bacterias probióticas CA tuvo fuertes niveles de inhibición contra vibrios. Siendo el género *Vibrio* un patógeno potencial para el camarón, y en brotes son causantes de vibriosis dando lugar a grandes pérdidas económicas para el sector camaronero (Hong et al., 2016; Xiao et al.,

2017; Moreno et al., 2017). Este estudio contrasta con los resultados obtenidos por Voino et al., (2014) y Rayesh et al., (2014).

Además la determinación de la relación huésped-microbiota de las bacterias intestinales ayuda a identificar microorganismos de posibles desempeño como agentes probióticos, los cuales son utilizados cada vez más como un medio alternativo para prevenir el uso de antibióticos en la crianza de animales acuáticos (Nayak SK, 2010; Chai et al., 2016).

En cuanto los probióticos de *Bacillus* han atraído una mayor atención científica y comercial; Recientemente, se añaden rutinariamente a alimentos funcionales que promueven la salud como suplementos terapéuticos, profilácticos y de crecimiento. Algunas de sus ventajas potenciales incluyen la colonización de microorganismos específicos en el intestino para restaurar el equilibrio microbiano intestinal (Schryver & Vadstein, 2014), ejerciendo numerosos efectos beneficiosos en el huésped de los cuales ayuda promover el crecimiento y la respuesta inmune del huésped.

Siendo la supervivencia es uno de los factores más importantes en la industria acuícola del camarón y está estrechamente ligada en la determinación de la calidad y potencial de los probióticos.

Sin embargo, en el análisis estadístico de las tasas de supervivencia del ensayo de inoculación del consorcio de bacterias probióticas CA en tanque de producción de postlarvas de los laboratorio BAMAR y MITOLAB orgánico S.A, no existió diferencias significativas en comparación al tratamiento control del mismo origen del nauplio y mes de producción, No obstante, existió diferencias significativas en el número de bacterias probióticas inoculadas en el cultivo larvario ya que las empresas BAMAR y MITOLAB utilizan varios productos comerciales con gran variedad de bacterias probióticas mientras que el consorcio CA solo es de 6 cepas de *Bacillus* spp. sugiriendo que el consorcio CA tiene fuertes actividades probióticas.

Estos datos tienen relación con los resultados de Sánchez-Ortiz et al., (2016), quienes aislaron y mezclaron especies del géneros de *Bacillus* obtenidos de *Anadara tuberculosa* para ser evaluados en la influencia en el crecimiento, supervivencia, prevalencia y expresión de genes relacionados a la inmunidad en el camarón blanco *L. vannamei* Liu et al., (2015), quienes aislaron y caracterizaron *Bacillus* spp. antagonistas a *Vibrios* spp. para su uso como probióticos en acuicultura.

Conclusiones

El mejor efecto probiótico en post-larvas de *L. vannamei* resultaron en los tratamientos del mix de bacterias probióticas CA, como los mejores supresores en la presencia de vibrios en el cultivo bacteriológico así como mayores porcentajes de sobrevivencia en tanques de producción de post-larvas de camarón. Sugiriendo que puede ser usado como agente de bio-control contra las infecciones por vibrios.

Referencias bibliográficas

- Augustine N, Kumar P, Thomas S (2010). Inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm by AiiA enzyme produced from *Bacillus* spp. *Arch Microbiol*, 1019-1022.
- Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N (2013). Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *BETHAN SCIENCE*, doi: 10.2174/1574891X11308010012.
- Boonyawiwat V, Patanasatienkul T, Kasornchandra J, Poolkhet C, Yaemkasem S, Hammell, Davidson J (2017). Impact of farm management on expression of early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease (EMS/AHPND) on penaeid shrimp farms in Thailand. *J Fish Dis*, 649-659.
- Chai PC, Song XL, Chen GF, Xu H, Huang J (2016). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 602-61.
- Flegel TW (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J Invertebr Pathol*, 166-73.
- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 439-468.
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Lozano R, Betancourt-Lozano M (2014). Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. *Genome Announc*, doi: 10.1128/genomeA.00055-14.
- Hong XP, Xu D, Zhuo Y, Liu HQ, Lu LQ (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). *J Fish Dis*, doi: 10.1111/jfd.12441.
- Huma N, Shankar P, Kushwah J, Bhushan A, Joshi J, Mukherjee T, Raju S, Purohit HJ, Kalia VC (2011). Diversity and polymorphism in AHL-lactonase gene (*aiiA*) of *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol*, 1001-1011.
- Kamruzzaman M1, Udden SM, Cameron DE, Calderwood SB, Nair GB, Mekalanos JJ, Faruque SM (2010). Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholera*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1588-1593.
- Lightner DV, Redman RM, Pantoja CR, Tang KF, Noble BL, Schofield P, Mohny LL, Nunan LM, Navarro SA (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J Invertebr Pathol*, 174-83.
- Liu XF, Li Y, Li JR, Cai LY, Li XX, Chen JR, Lyu SX (2015). Isolation and characterization of *Bacillus* spp. antagonistic to *Vibrio parahaemolyticus* for use as probiotics in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol*, doi 10.1007/s11274-015-1833-2.
- Moreno E, Parks M, Pinnell LJ, Tallman JJ, Turner JW (2017). Draft Genome Sequence of a *Vibrio harveyi* Strain Associated with Vibriosis in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Genome Announc*, doi: 10.1128/genomeA.01662-16.
- Nayak SK (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immun*, 2-14.
- Ng WL & Bassler BL (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* , 197-222.
- Nunan L, Lightner D, Pantoja C, Gomez-Jimenez S (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis Aquat Organ*, 81-6.

Rajesh PS & Ravishankar Rai V (2014). Quorum quenching activity in cell-free lysate of endophytic bacteria isolated from *Pterocarpus santalinus* Linn., and its effect on quorum sensing regulated biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiol Res*, 561-569.

Schryver P & Vadstein O (2014). Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME Journal*, 2360-2368.

Sánchez-Ortiz AC, Angulo C, Luna-González A, Álvarez-Ruiz P, Mazón-Suástegui JM, Campa-Córdova ÁI (2016). Effect of mixed-Bacillus spp. isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 95-102.

Tandel GM, John KR, Rosalind George M, Prince Jeyaseelan MJ (2017). Current status of viral diseases in Indian shrimp aquaculture. *Acta Virol*, 131-137.

Tang K, Su Y, Brackman G, Cui F, Zhang Y, Shi X, Coenye T, Zhang XH (2015). MomL, a novel marine-derived A-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*. *Appl Environ Microbiol*, 774-782.

Tinh NTN, Asanka Gunasekara RAYS, Boon N, Dierckens K, Sorgeloos P & Bossier P (2007). N-acyl homoserine lactone-degrading microbial enrichment cultures isolated from *Penaeus vannamei* shrimp gut and their probiotic properties in *Brachionus plicatilis* cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 43-53.

Tom Defoirdt, Loan Doan Thanh, BartVan Delsen, Peter De Schryver, Patrick Sorgeloos, Nico Boon, Peter Bossier (2011). N-acylhomoserine lactone-degrading Bacillus strains isolated from aquaculture animals. *Aquaculture*, 258-260 .

Vinoj G, Vaseeharan B, Thomas S, Spiers AJ, Shanthi S (2014). Quorum-quenching activity of the AHL-lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits vibrio biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Mar Biotechnol*, 707-715.

Walter Fast & Peter A. Tipton (2012). The enzymes of bacterial census and censorship. *Trends Biochem Sci*, 7-14.

Xiao J, Liu L, Ke Y, Li X, Liu Y, Pan Y, Yan S, Wang Y (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Sci Rep*, doi: 10.1038/srep42177.

Zuo Z, Shang B, Shao Y, Li W, & Sun J (2018). Screening of intestinal probiotics and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, doi:10.1016/j.fsi.2018.11.003.

