

Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada



*Estudio para evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos
hidrosolubles de *Microcystis pyrrifera* en la dieta del camarón blanco
*Litopenaeus vannamei**

TESIS

MAESTRIA EN CIENCIAS

CAROLINE GLADIS TORDOYA ROMERO

Ensenada, Baja California, México, Octubre de 2006

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
ORIENTACION EN BIOTECNOLOGIA MARINA**

**"Estudio para evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos
hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* en la dieta del camarón blanco
Litopenaeus vannamei"**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CAROLINE GLADIS TORDOYA ROMERO

Ensenada, Baja California, México, Octubre de 2008.

RESUMEN de la tesis de Caroline Gladis Tordoya Romero, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Octubre de 2008.

“Estudio para evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* en la dieta del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* “

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denise Re Araujo
Director de Tesis

En este estudio, se evaluó el efecto inmunomodulador de los polisacáridos hidrosolubles (PH) extraídos del alga café *Macrocystis pyrifera* adicionada a la dieta de los juveniles del camarón blanco *L. vannamei* al ser desafiados con el patógeno *V. campbellii*. Los camarones ($10.9 \pm 0.2\text{g}$) fueron alimentados durante 12 días con alimento suplementado con PH en dosis de 0, 2 y 3 g kg^{-1} . Posteriormente al 13avo día se hizo una prueba de desafío con la bacteria *Vibrio campbellii* ($\approx 4.6 \pm 0.15 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ de camarón) y se evaluó a las 2, 4, 6, 12 y 24 hs el efecto de los polisacáridos hidrosolubles (PH) en la respuestas fisiológicas Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), hematológica Conteo total de hemócitos CTH ($\times 10^6 \text{ células ml}^{-1}$) y hemocianina (mmol l^{-1}) y metabólica proteínas totales (mg ml^{-1}) y la razón Hc/P (%), glucosa (mg dl^{-1}) y lactato (mg dl^{-1}). El consumo de oxígeno, el CTH, el lactato y la hemocianina no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre los tratamientos con las diferentes concentraciones de PH, pero si influyo en las proteínas totales y en la razón Hc/Proteína. El tiempo de infección con *V. campbellii* solo afecto a la glucosa y a las proteínas totales ($p < 0.05$). Los resultados revelan que los PH influenciaron en la respuesta metabólica del camarón, y el proceso de la infección afecto principalmente a la glucosa y a las proteínas totales. No existió efecto interactivo entre los PH y la infección ($p > 0.05$). Se concluye que la mejor supervivencia y las respuestas fisiológicas, hematológicas y metabólicas mas estables en el camarón *L. vannamei* fue con los organismos alimentados con la dieta de 2 g kg^{-1} de PH, esta capacidad es atribuida a los polisacáridos hidrosolubles extraídos del alga *M. pyrifera* utilizados en la dieta y además a la concentración del inmunomodulador.

Palabras Clave: *Litopenaeus vannamei*, polisacáridos hidrosolubles, inmunomodulador, *Vibrio campbellii*, respuestas fisiológicas, hematológicas y metabólicas.

ABSTRACT of the Thesis by Caroline Gladis Tordoya Romero, presented as partial requirement to obtain the MASTER IN SCIENCES degree with the Orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California. October 2008.

“Study to evaluate the effect immunomodulator of the polysaccharides hydrosoluble of *Macrocystis pyrifera* into the diet of *Litopenaeus vannamei* “

Abstract

In this study, the effect of the immune water-soluble polysaccharide (PH) extracted from brown algae *Macrocystis pyrifera* added to the diet of juvenile white shrimp *L. vannamei* to be challenged with the pathogen *V. campbellii*. Shrimp ($10.9 \pm 0.2\text{g}$) were fed for 12 days with food supplemented with PH in doses of 0, 2 and 3 g kg⁻¹. Subsequently the 13th day was a test challenge with the bacterium *Vibrio campbellii* ($\approx 4.6 \pm 0.15 \times 10^4$ CFU g⁻¹ shrimp) and was evaluated at 2, 4, 6, 12 and 24 hours the effect of water-soluble polysaccharide (PH) in the physiological responses consumption of oxygen (O₂ mg kg⁻¹ h⁻¹), Total Count hemocytes THC (x 10⁶ cells ml⁻¹) and hemocyanine (mmol l⁻¹) and metabolic such as total protein (mg ml⁻¹) And the reason Hc / P (%), glucose (mg dl⁻¹) and lactate (mg dl⁻¹). The oxygen consumption, THC, lactate and hemocyanine were not significantly different ($p > 0.05$) between treatments with different concentrations of PH, but if influence on the total protein and the ratio of Hc/protein . The process of infection with *V. campbellii* only to glucose and total protein have an effect ($p < 0.05$). The results show that PH influenced the metabolic response of the shrimp; the process itself of infection affects mainly the total protein and glucose. There was no interactive effect between HP and infection ($p > 0.05$). We conclude that the best survival and physiological responses, hematological and metabolic were more stable in the shrimp *L. vannamei* with the organisms were fed the diet of 2g kg⁻¹ of PH, this capacity is attributed to the water-soluble polysaccharide extracted from seaweed *M. pyrifera* used in the diet and in addition to the concentration of immunomodulator.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, hydrosoluble polysaccharide Immunomodulator, *Vibrio campbellii*, physiological hematological and metabolic responses.

DEDICATORIA

A mi Padre Bueno....

Nunca me dejo sola, cada día me mostro su amor y misericordia. Fue su promesa y le creí.

A mi papito, Estenio...*En memoria*

Gracias por darme lo mejor de ti, te disfrute tan poco...siempre me hiciste falta...

A mi mamita hermosa, Emilda

Por tu amor, esfuerzo y ejemplo. Aun en los momentos difíciles me diste lo mejor de ti. Anhele honrarte como te mereces.

A mi hermanita, Roxy

Gracias por tu sacrificio y amor por todos nosotros, especialmente por mí, no imaginas lo mucho que te amo...

A mis hermanos Leonor y Pablo, Leito tu eres mas que mi hermana, mi amiga y te admiro por tu carácter y fuerza. Pablo, hermano bello, tus concejos siempre fueron fundamentales en mi vida, tienes un corazón puro, gracias por estar siempre pendiente de mí.

A mis amores chiquitos: Fabrizio, Anguie y Alexia.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores otorgada por el Gobierno de México.

A mi directora de tesis, Dra. Ana Denise Re Araujo, por su confianza, cuidado, cariño, consejos y su entrega en el desarrollo de este trabajo.

A todos y cada uno de los miembros del comité de tesis: Fernando Díaz Herrera, Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, M. en C. Eliseo Almanza Heredia, M. en C. Luis Humberto Mendoza Garcilazo por sus colaboraciones y observaciones realizadas durante la elaboración de esta tesis. De manera especial agradezco al Dr. Díaz por su apoyo académico, correcciones y estimulantes consejos.

Al Dr. Leonardo Lizárraga Partida, por haber proporcionado la cepa de *Vibrio*, materiales y equipos para la realización de toda la parte microbiológica de esta tesis. Gracias por sus enseñanzas y su paciencia.

Al M. en C. Maximiliano López Fisbri por su orientación en la crianza de los camarones y todo su apoyo.

Al laboratorio de producción Gloria S.A. de C.V. Tepic, Nayarit, México, por la donación de camarones.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por haberme brindado la oportunidad realizar mi postgrado.

Al Instituto Nacional de Becas del Ministerio de Educación de Perú (INABEC), por haberme seleccionado y dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

A la Técnico Guadalupe Vargas, por permitirme aprender a su lado.

A todos los maestros del DBEA que contribuyeron a mi formación académica.

A Dolores Carbajal, por su amistad sincera, su buena disposición y amabilidad permanente.

A Noemí y a Ricardo, por su colaboración en la etapa experimental y por sus valiosos tips durante el desarrollo de esta tesis.

A todos mis compañeros de generación; Abelardo, Abigail, Hayde, Amanda y Silvia, a los de micro, Alex, Aurora y Paulo. Con quienes compartí momentos importantes de mi vida. A quienes nunca olvidare.

Abigail y Abelardo gracias por ser mis amigos y tenerme la suficiente confianza y cariño para confiarme su casa. Por haber estado conmigo cuando mas lo necesite y ayudarme en todo momento, a las ricas comidas enchilosas de Abi y a las bromas de Abe.

Hayde, aprendí mucho de ti, tu simpatía, dinamismo y sinceridad hizo que te valore mucho. Eres más sensible de lo que aparentas y defiendes con tanta fuerza tus ideas, sentimientos y amistades.

Amanda, tan frágil, tan linda y buena, eres admirable. Cuando estudiábamos observe que tenías mas potencial que cualquiera.

Silvis, vivir contigo fue lo mejor que me paso, conocer a tu familia hizo que recordara a la mia. Tenemos mucho en común y al mismo tiempo tan diferentes pero aprendimos a convivir. Como cambiamos! de veras que nos ayudamos mutuamente, tantas horas de platica fueron mejor que muchas terapias, je,je Gracias por todo. Aun nos falta mucho por vivir y conocer, y que alegría que seas mi amiga y que pueda contar contigo para todo.

Cristy, donde quiera que estés, gracias por compartir muchos momentos conmigo.

Y a todos los amigos y compañeros del departamento de Biología Experimental y Aplicada, tanto en Biotecnología como Microbiología y Acuicultura.

Al Centro Educativo Renacimiento por ser una gran familia, a su Director Jorge Sánchez por acogerme y permitirme ser parte de ellos. A su esposa, Bety, y sus hijas Jassiel y Melisa.

A la familia Luna Armendariz por su amor y cuidado. Hector y Chelito, sus concejos fueron y serán importantes para mi, su amistad y cariño son una bendición de Dios en mi vida. Gracias por integrarme a su familia, y poder pasar momentos gratos al lado de Hectorin, Isai y Hanna.

A toda mi familia en Cristo, de Renacimiento por haber sido bondadosos conmigo: Juan y Lety, Jovis y Ernesto, Ruben y Priscila, Rigo y Tony, Miguel y Maruja, Angel y Cheli, Tito y Vane, Mary y Miguel, Raúl y Norma, Ninfa, Estelita. Los de nuevos principios: Silvia, Paula, Juan, Gerardo, Thelma, Lulú, Adriana y Gloria. También a los jóvenes: Alberto, Areli, Lisandra, Nabil, Eunice, Samuel, Moy, David, Linett, Alma, Sayda, Anita, Priscilita y las hermanas dinamita Janet y Jaky.....y a todos.

A Lulú y Angela. Lulú gracias por recibirme en tu casa y tratarme como a una hija. Angelita contigo mire atrás y recordé una etapa bonita de mi vida. Las dos hicieron que me sintiera en casa, las amo mucho.

A Hernán, por tu amistad incondicional. El tiempo que dedicaste para cuidarme es insustituible, nada ni nadie se puede comparar a ti. Muchas gracias a Dios porque permitió que siempre estuvieras conmigo.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
I. Introducción.....	1
II. Objetivo.....	8
III. Materiales y Métodos.....	9
IV. Resultados.....	18
IV.1 Supervivencia.....	18
IV.2 Consumo de Oxígeno.....	19
IV.3 Conteo total de hemocitos (CTH).....	21
IV.4 Hemocianina.....	22
IV.5 Metabólitos.....	23
V. Discusión.....	27
VI. Conclusiones.....	35
VII. Literatura citada.....	36

FECHA DE INGRESO

21 ENE. 2009

BIBLIOTECA CICESE

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Esquema de la preparación de las dietas experimentales	10
2	Distribución a las unidades experimentales	12
3	Respirómetro semiabierto con 21 cámaras de 1000 ml.	14
4	Supervivencia (%) de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼).	18
5	Consumo de oxígeno (mg O ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹) de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores del consumo de oxígeno representan las medianas de 6 camarones ± IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	20
6	Conteo total de hemocitos (CTH) (1x10 ⁶ células por ml ⁻¹) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores del CTH representan las medianas de 6 camarones ± IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	21
7	Concentración de hemocianina (mmol l ⁻¹) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de hemocianina representan las medianas de 6 camarones ± IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	22

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
8	Proteínas totales (mg ml^{-1}) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de proteínas totales representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	24
9	Niveles de glucosa (mg dl^{-1}) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de glucosa representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	25
10	Niveles de lactato (mg dl^{-1}) en la hemolinfa de <i>L. vannamei</i> después de la inyección con <i>V. campbellii</i> en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de lactato representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.	26

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Composición de las dietas experimentales	10
II	Niveles del consumo de oxígeno, CTH, hemocianina, proteínas totales, razón Hc/proteína, glucosa y lactato para <i>L. vannamei</i> alimentado con dietas suplementadas con polisacáridos hidrosolubles y desafiado con <i>V. campbellii</i> .	19

Introducción

Una de las especies de mayor interés comercial en la industria del cultivo de animales marinos es el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, que abarca el 30% de la producción de camarones peneidos en el mundo (Pérez-Farfante y Kensley, 1997). Es una especie nativa del Pacífico que se distribuye desde el golfo de California en México, hasta el norte de Perú, áreas donde la temperatura del agua es mayor a los 20°C a lo largo del año (Briggs *et al.*, 2005).

México ocupa el segundo lugar en el cultivo de camarón en el continente americano, y aún así, la producción no satisface la demanda de mercado (Pascual *et al.*, 2003a). El aumento en la producción de este recurso requiere resolver problemas asociados a las condiciones de cultivo, como la obtención de semilla de buena calidad (Pascual *et al.*, 2003a). Sin embargo son las enfermedades, las que han provocado importantes pérdidas económicas (Lightner, 1999).

Bachere (2000) refiere que la presencia de enfermedades en los peneidos en general esta ligada con su condición fisiológica, la cual depende de las condiciones ambientales y nutricionales (Kautsky *et al.*, 2000). En este contexto, establecer programas que permitan monitorear el estado fisiológico de los organismos se torna indispensable como una medida para conocer el estado de salud de los camarones en condiciones de cultivo, y con ello, proporcionar elementos de decisión que ayuden a mejorar la rentabilidad de esta actividad productiva. Otro aspecto relevante es la disponibilidad y la calidad de la energía exógena del medio; la cual es asimilada por los organismos a través de las proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Pascual *et al.*, 2003b).

La falta de criterios para la evaluación de la condición nutricional y/o de salud, generó que diversos grupos de investigación propusieran indicadores del estado fisiológico, nutricional e inmunológico de los animales en cultivo con la finalidad de contar con herramientas de diagnóstico. En este sentido, destacan los trabajos llevados a cabo por Díaz *et al.* (2004); Re *et al.* (2004); Medina (2006); González *et al.* (2006) y Flores *et al.* (2007) sobre el estudio de diversas respuestas fisiológicas como la capacidad osmorreguladora (CO), el consumo de oxígeno (VO₂), la excreción nitrogenada y la relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N), los cuales son indicadores del efecto de los factores ambientales sobre los requerimientos energéticos de los crustáceos. El consumo de oxígeno es un método que permite la evaluación de la respuesta fisiológica en los camarones expuestos a variaciones ambientales (Rosas *et al.*, 2001a; Re *et al.*, 2004; Spanopoulos-Hernandez *et al.*, 2005).

Rosas *et al.* (2001b, 2002a); Sánchez *et al.* (2001); Pascual *et al.* (2003b) y Flores (2007) proponen el seguimiento de ciertas variables metabólicas de la hemolinfa como: glucosa, colesterol, lactato y proteínas, y como variable hematológica a la hemocianina, estas moléculas son importantes para determinar el estado nutricional y de estrés en los organismos, mientras que las variables inmunológicas como el conteo total de hemocitos (CTH) y el sistema enzimático de la profenoloxidasasa (proPro) juegan un rol importante en el sistema de defensa (Rosas *et al.*, 2002a). Además, en la hemolinfa circulan moléculas importantes como la hemocianina, las inhibidoras de proteasas, las proteínas de reconocimiento y varias lipoproteínas, entre ellas el factor de coagulación y la proteína fijadora de beta glucanos BG interrelacionadas con los aspectos inmunológicos de los crustáceos (Maldonado *et al.*, 2003; Liu y Chen, 2004).

Estudios recientes han demostrado el uso de algunos metabolitos como indicadores de las respuestas fisiológicas; se observó que las proteínas sanguíneas y la glucosa fueron indicadores del tipo de dieta suministrada y de los diferentes niveles de inclusión de proteínas y carbohidratos en la dieta para juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus*, además estos organismos fueron expuestos a altas y bajas salinidades (Rosas *et al.* 2001a, 2001b; Gonzales, 2006; Flores, 2007). Así también, se ha reportado que la glucosa, el

lactato, los triacilglicéridos, el colesterol y las proteínas, pueden ser utilizados como indicadores de estrés en juveniles de *L. vannamei* (Racotta y Palacios 1998), y como indicadores del estado reproductivo y calidad de las larvas (Palacios, 1999). Para *Penaeus monodon* Van Ham y Hall (1998) reportaron como indicador de estrés agudo a la glucosa, ya que se incrementó su concentración cuando se disminuyó el oxígeno y se aumentó los niveles de dióxido de carbono disueltos.

Otro elemento presente en la hemolinfa que se ha utilizado como una herramienta para monitorear el estado fisiológico, es la hemocianina, polipéptido que tiene incorporado al cobre, el cual funciona como sitio activo acarreador de oxígeno y representa el 60-95% del total de proteínas en la hemolinfa de crustáceos (Djangmah, 1970), y resultó ser un indicador fisiológico en animales expuestos a diferentes condiciones ambientales, como altas concentraciones de amonio (Chen y Cheng, 1993a, Chen y Cheng, 1993b y Chen *et al.*, 1994) y nitrito (Cheng *et al.*, 1999), alta y baja salinidad (Gonzalez, 2006 y Flores, 2007), hipoxia (Hagerman, 1986), diferentes niveles de inclusión de carbohidratos y proteínas dietéticas (Rosas *et al.*, 2001a).

De tal forma que las variables metabólicas como la glucosa y el lactato han sido utilizadas como indicadores de estrés, mientras que la hemocianina y los metabolitos como proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos y colesterol pueden ser utilizados para medir la condición fisiológica de los camarones en condiciones de cultivo (Rosas *et al.*, 2002a; Pascual *et al.*, 2003b).

Para determinar la salud de los camarones se evalúan las respuestas inmunes a través del conteo total de hemocitos (CTH) y el estallido respiratorio, (Mercier *et al.* 2006). Los camarones Peneidos no poseen un sistema inmunológico específico ni con capacidad de memoria, lo que impide la utilización de vacunas (Beger, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Rendon y Balcazar, 2003), estos invertebrados solo poseen mecanismos de defensa frente a la invasión microbiana (Fu *et al.*, 2007). Estas respuestas lo realizan a través de los hemocitos, quienes constituyen el sistema de defensa en los crustáceos y por tanto, realizan

funciones como la melanización, activada por el sistema de la proPo, fagocitosis, encapsulación de material extraño, acción antimicrobiana, aglutinación, formación de nódulos y citotoxicidad (Maldonado *et al.*, 2003; Rendón y Balcazar, 2003; Liu y Chen, 2004; Liu *et al.*, 2006). Los hemocitos circulantes en la hemolinfa son clasificados generalmente en células hialinas, semigranulares y granulares. Ambas células semigranulares y granulares activan el sistema de la proPo, la fenoloxidasa es la enzima terminal en el sistema de la proPo y es activada por cantidades mínimas del componente de la pared celular microbiana (Fu *et al.* 2007).

El CTH en crustáceos varía en respuesta a infecciones, estrés ambiental, por la ablación unilateral del pedúnculo ocular en hembras y en la extirpación del espermatóforo en machos y en la actividad endocrina durante el ciclo de muda (Rodríguez y Le Moullac, 2000; Flores, 2007). Asimismo, Le Moullac *et al.* (1998) reportaron una disminución del CTH y con ello su resistencia a la infección con *Vibrio*, cuando el *L.stylirostris* fue sometido a hipoxia. Esto indica que el bajo número de hemocitos representa una mayor susceptibilidad de los organismos a enfermedades (Le Moullac y Haffner, 2000, Espinosa *et al.*, 2002).

Rodríguez y Le Moullac, (2000), mencionan que las investigaciones se han enfocado en conocer las condiciones fisiológicas de los organismos con la finalidad de establecer sus requerimientos nutricionales y ambientales necesarios para optimizar la producción centrados principalmente en el mejoramiento de los alimentos balanceados. Como parte de esta estrategia, se han modificado los niveles de vitaminas, minerales, pigmentos y se han incluido diversos tipos de inmunoestimulantes en un intento por mejorar el estado nutricional de los camarones y así aumentar la tolerancia a las enfermedades (Meyers y Latscha, 1990; Kontara *et al.*, 1995; Merchie *et al.*, 1998).

Las sustancias inmunoestimulantes son extraídas de las paredes celulares de microorganismos como las bacterias Gram negativas (lipopolisacaridos), bacterias Gram positivas (peptidoglicanos), hongos, levaduras y algas (β 1, 3 glucanos) (Fu *et al.*, 2007).

Muchos estudios han demostrado que algunos tipos de polisacáridos de origen algal pueden proveer o estimular la inmunidad y resistencia frente a las enfermedades en los animales en condiciones de cultivo (Castro *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007). Estos polisacáridos son obtenidos de algas marinas, las cuales presentan sustancias inmunológicas activas (Castro *et al.*, 2004). Zvyagintseva *et al.* (2003) manifiesta que el contenido de polisacáridos hidrosolubles en las algas pardas varía entre un 40 a 80% de su biomasa seca.

Se ha inmunoestimulado a *L. vannamei* con diversos extractos de algas marinas y se ha desafiado con *V. alginolyticus*; Hou y Chen (2005) inyectaron extractos de *Gracilaria tenuistipitata* y Yeh *et al.* (2006) utilizaron vía inmersión e inyección extracto caliente de *Sargassum duplicatum*; demostraron que hubo un aumento de la habilidad inmune al incrementarse el CTH, la actividad fenoloxidasa y el estallido respiratorio, estos indicadores del mecanismo de defensa se producen como resultado de la actividad fagocítica y microbicida, por tanto reportaron mayor resistencia del organismo frente a las infecciones.

La dosificación del inmunoestimulante por vía oral resulta más práctica que la inyección o inmersión (Huang, *et al.*, 2006). Varios polisacáridos suplementados en la dieta han sido reportados que potencian la actividad inmune y la resistencia frente a las enfermedades del camarón. Es así que Huang *et al.* (2006) utilizaron el extracto de *Sargassum fusiforme* en *Fenneropenaeus chinensis* desafiado con *V. harveyi*, reportando incremento en CTH, concentración de proteínas, actividad fenoloxidasa y lisozima, los polisacáridos con 0.5, 1.0% presentaron los mejores resultados. Mientras que Fu *et al.* (2007) suministrando extracto caliente de *Gelidium amansii* en *Litopenaneus vannamei* desafiado con *V. alginolyticus*, encontraron mejores resultados en cuanto a actividad fagocítica y eficiencia de depuración de la bacteria con la dosis de 2g kg⁻¹. De igual manera, Cheng *et al.* (2005) administrando alginato de sodio extraído de las algas *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia nigrescens* en *L. vannamei* desafiado con *V. alginolyticus* observaron una mayor actividad fagocítica y eficiencia de depuración del *Vibrio* en los organismos alimentados con la dosis

de 2.0 g kg^{-1} . Además la inclusión de alginatos de sodio puede modificar la expresión de genes inmunes del camarón *Penaeus monodon* (Liu *et al.*, 2006).

La macroalga, *Macrocystis pyrifera*, pertenece al orden de las laminarias, es un alga de gran tamaño que alcanza los 50 metros de longitud o más y habita la parte somera de la zona de mareas hasta los 40.3m en áreas de fondo rocosos. Se distribuye en muchas partes del mundo, encontrándose principalmente desde Baja California, México hasta el estado de Oregón en Estados Unidos, y también se encuentra en las costas del Perú, Chile, Argentina, Sudáfrica y Australia (Cruz-Suarez *et al.*, 2000; Latorre y Flores-Aguilar, 2004). Dependiendo de los procedimientos de extracción es posible obtener las fracciones A (laminarian y fucoidan) B (fucoidan) y C (ácido alginico), los cuales son los diferentes componentes de los polisacáridos solubles de *Macrocystis* como lo reportan los siguientes autores Zvyagintseva *et al* (1999) ; Zvyagintseva *et al* (2003); Riux *et al* (2007).

Desde 1998 *M. pyrifera* viene siendo utilizada en algunos alimentos comerciales para engorda de camarón como “agente aglutinante” y como “aditivo inmunoestimulante”. Cruz-Suarez *et al.* (2000) manifiestan que esta alga mejora las condiciones fisiológicas del camarón gracias a sus compuestos como alginato de sodio (18 - 26%) y fucoidan, polisacárido sulfatado, (5.2 - 5.4%). Estos dos compuestos poseen diversas actividades biológicas, como la de incrementar la actividad fagocítica, la actividad anticoagulante y antitrombotica, así como producir un efecto antiinflamatorio, antitumoral y antiviral (Zvyagintseva *et al.* 2003; Ponce *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004). Rivera *et al.* (2002) reportan un incremento en la capacidad de resistencia de los crustáceos frente a infecciones de microorganismos patógenos cuando la harina de *Macrocystis* fue adicionada en el alimento entre un 15 y 20%.

Las enfermedades infecciosas son un gran problema en la producción acuícola de muchos países. Existen muchos géneros bacterianos que causan epizootias en camarones cultivados, sin embargo, se ha observado que aproximadamente entre el 80 y 90% de las bacteria aisladas de mortalidades masivas de peneidos corresponden al genero *Vibrio*

(Lightner, 1999). Dentro de las especies de *Vibrio* que han sido identificadas en los sistemas de producción, se encuentran: *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. penaeicida*, *V. campbellii*, entre otros (Phuoc *et al.*, 2008).

La vibriosis usualmente ocurre durante el primer mes de cultivo y puede causar más del 50% de mortalidad. La vibriosis luminiscente es causada principalmente por *V. harveyi*, *V. campbellii* y ocasionalmente por *V. splendidus*, los cuales pueden causar infecciones en los estadios larval, juvenil y adulto de camarones peneidos (Soto-Rodríguez *et al.*, 2003; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a).

Muchos *Vibrios* patógenos fueron aislados a partir de camarones enfermos (Gómez-Gil *et al.*, 1998). Es así que Giffard (1999) identificó a *V. harveyi* (cepa Z2) como la principal bacteria luminiscente en los sistemas de producción larvaria en Sinaloa, México. Posteriormente, Gómez-Gil *et al.* (2004) identificó a ésta cepa mediante diversas técnicas moleculares como *V. campbellii* y fue corroborado por Lizarraga y Bartlett (2007) por medio de secuenciación.

V. campbellii es una bacteria gran negativa patógena en crustáceos (Scholnick *et al.*, 2006). Muchos trabajos confirman su patogenicidad, en larvas de *L. vannamei* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a; 2006b), en juveniles de *L. vannamei* (Burgents *et al.*, 2005; Scholnick *et al.*, 2006), en juveniles de *L. vannamei* y asociado al virus de la mancha blanca (WSSV) (Phuoc *et al.*, 2008).

La finalidad del presente trabajo es evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* suministrado en la dieta del camarón blanco *L. vannamei* cuando es desafiado con la bacteria *V. campbellii* a través de indicadores fisiológicos, metabólicos y hematológicos con el objeto de contar con las metodologías necesarias para el diagnóstico del estado de salud del camarón.

II. Objetivos

III. Objetivo General

Evaluar el efecto inmunomodulador de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera* adicionados en la dieta del camarón *L. vannamei*.

II.1.1 Objetivos específicos

- 1) Obtención de los polisacáridos hidrosolubles a partir del alga café *Macrocystis pyrifera*.
- 2) Determinar el efecto de la inclusión de dos concentraciones de polisacáridos hidrosolubles de *M. pyrifera* (2 y 3 g kg⁻¹) sobre la respuesta fisiológica, metabólica y hematológica de *L. vannamei* indicado por cambios en el consumo de oxígeno, CTH, hemocianina, proteínas totales, glucosa y lactato.
- 3) Realizar una prueba de desafío en juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con polisacáridos hidrosolubles de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii* para determinar supervivencia, consumo de oxígeno, CTH, hemocianina, proteínas totales, glucosa y lactato.
- 4) Determinar la dosis de extracto de *M. pyrifera* que presenta las mejores respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas en *L. vannamei*.

III. Materiales y métodos

III.1 Preparación de los polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera*

Para la preparación de los polisacáridos hidrosolubles (PH); se obtuvieron 40 kilos de *M. pyrifera*, recolectadas en Erendira, Baja California, se transportaron en hieleras para evitar su deterioro al laboratorio de Nutrición Funcional donde se seleccionaron principalmente las hojas, eliminando los neumatocistos y estipes (Bold y Wynne, 1978), posteriormente las hojas fueron lavadas y extendidas en un invernadero para su secado por deshidratación. Cuando las hojas estuvieron secas, fueron molidas para obtener la harina de *Macrocystis pyrifera*.

Los PH se obtuvieron al mezclar 10.0g de la harina de *M. pyrifera* con 300 ml de agua desionizada, ésta suspensión fue hervida por 3 horas a temperatura constante. Posteriormente se filtró con una malla de nylon de 70 micras y se liofilizó en un liofilizador marca LABCONCO según la metodología descrita por Yeh *et al.* (2006).

III.2 Preparación de las dietas experimentales

La formulación de las dietas experimentales se realizó de acuerdo al programa de balanceo MIXIT-WIN3 (Tabla I). Para la preparación de las dietas, los ingredientes secos fueron mezclados con 30% de agua hasta obtener una pasta homogénea, en una batidora semi-industrial, posteriormente fue pasada por un extrusor Marca UNIVEX formándose pellets de 3.0mm de diámetro de tamaño uniforme. El alimento se colocó en charolas y fue llevado a un invernadero para su secado, posteriormente, los pellets fueron almacenados a -4°C (Fig. 1).

Tabla I. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes	Polisacáridos hidrosolubles (PH) de <i>M. pyrifera</i> (g kg ⁻¹)		
	R0g	PH2g	PH3g
Rangen (g)	860	858	857
PH de <i>M. pyrifera</i> (g)	-	2	3
Aceite de pescado (ml)	50	50	50
Glúten de trigo (g)	90	90	90



Fig. 1. Esquema de la preparación de las dietas experimentales

III.3 Cultivo de la bacteria.

La cepa de *Vibrio campbellii* identificada como Z2, provienen de la colección de *Vibrios* del laboratorio de Ecología Marina de CICESE a cargo del Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida. Esta cepa fue identificada como *V. campbellii* por métodos moleculares (Gómez-Gil *et al.*, 2004), y se probó su patogenicidad con nauplios de *Artemia* y larvas de camarón (Soto-Rodríguez, 2002, 2003; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006a).

V. campbellii fue cultivado en medio agar Zobell (DIFCO 1984) e incubado a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. La bacteria fue cosechada y suspendida en suero fisiológico estéril (0.9% NaCl) hasta que se obtuvo una densidad óptica (DO) aproximada de 0.9 a 600 nm $\approx 10^7$ UFC ml⁻¹, leída en un espectrofotómetro Spectronic 20 Marca BAUSCH & LO, densidad utilizada para la prueba de desafío.

Para confirmar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenida, la suspensión bacteriana fue diluida seriadamente en suero fisiológico estéril y 0.1 ml fue inoculado en placas dobles conteniendo agar (Vargas y Lizárraga, 1993; Anguiano, 1996; Soto-Rodríguez *et al.*, 2003).

III.4 Obtención y mantenimiento de los organismos.

Se adquirieron 10,000 post larvas (Pl₁₂) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* provenientes del Laboratorio de producción Gloria S.A. de C.V. Tepic, Nayarit, México, los que fueron colocados en dos estanques de 0.4m³ y uno de 2m³ con flujo continuo de agua de mar, con un recambio diario del 100%, $28 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, salinidad de 35‰ y aireación constante. Se les proporcionó diariamente alimento balanceado Rangen con 40% de proteína, dos veces al día, en raciones equivalentes al 8% de su peso húmedo (p.h.). Cuando alcanzaron la talla de $10.93 \pm 0.17\text{g}$, se seleccionaron al azar 300 organismos y se colocaron en 7 estanques de 0.2 m³ con agua de mar del sistema de recirculación.

III.5 Selección y separación de los organismos experimentales.

Se colocaron 60 organismos de $10.93 \pm 0.17g$ en cada uno de los estanques de recirculación para cada una de las dietas experimentales: Rangen (R) (0g de PH), PH2g ($2g\ kg^{-1}$ de PH) y PH3g ($3g\ kg^{-1}$ de PH) desafiados con la bacteria y como control suero fisiológico (SF) sin desafío (Figura 2).

Los camarones de los tratamientos SF y R0g se les alimento con la dieta control Rangen (alimento comercial sin extracto de *M. pyrifera*).

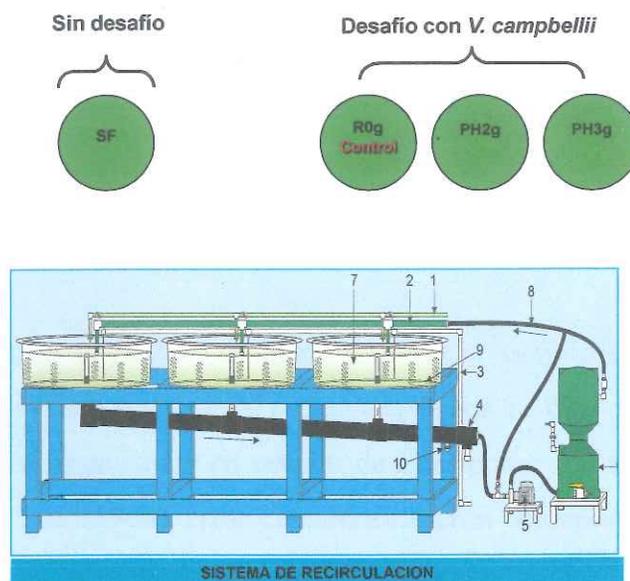


Fig. 2. Distribución a las unidades experimentales

III.6 Desafío bacterial

Después de un periodo de 12 días de alimentación con las dietas experimentales, al 13avo. se procedió a inyectar en el tercer segmento abdominal de los organismos experimentales, 50 μl de la suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^7 UFC ml^{-1} , obteniéndose una dosis final equivalente a $4.6 \pm 0.15 \times 10^4$ UFC g^{-1} de camarón. Se aplicó el mismo volumen de inyección en suero fisiológico (SF) para control. La dosis bacterial es aproximadamente un sexto del LD_{50} para *L. vannamei* (Mikulski *et al.*, 2000) y comparable en una base por peso a la mitad de la dosis utilizada en la evaluación del efecto de la exposición de la bacteria *V. campbellii* en el metabolismo de *L. vannamei* (Scholnick, *et al.*, 2006), la supervivencia se cuantificó a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 y 72 hs y se expreso en porcentaje.

III.7 Consumo de oxígeno de *Litopenaeus vannamei*

El consumo de oxígeno se midió después de la inyección con la solución de *Vibrio* y suero fisiológico a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas para cada condición experimental, los tratamientos fueron: R0g, PH2g, PH3g y SF. A estos mismos tratamientos se les evaluó el consumo de oxígeno en 2 y 4 horas antes de la infección con la bacteria para contrastar el efecto de los polisacáridos hidrosolubles.

Para medir el consumo de oxígeno se utilizó un sistema respirométrico semiabierto (Fig. 3) como el descrito por Díaz *et al.* (2007). Después de los 12 días del periodo experimental, se seleccionaron 20 organismos en estadio de intermuda, de acuerdo al procedimiento descrito por Chan *et al.* (1988), estos camarones fueron colocados en forma individual 24 horas antes de iniciar las mediciones en las 21 cámaras respirométricas de 1000 ml, 20 unidades experimentales, más uno del control para realizar las correcciones del consumo de oxígeno producido por los microorganismos presentes en el agua. Antes de cerrar el flujo de agua del sistema se tomo una muestra de agua de cada cámara, para medir la concentración inicial de oxígeno disuelto con un oxímetro YSI-50B provisto de un sensor polarográfico. Las cámaras permanecieron cerradas por un periodo de una hora, es el tiempo de incubación para evitar que la concentración de oxígeno en las cámaras no

disminuya por debajo del 30% y no produzca estrés en los organismos (Stern, 1984). Antes de restablecer el flujo de las cámaras se tomo nuevamente una muestra de agua de las cámaras para medir la concentración final del oxígeno disuelto.

Antes de introducir los camarones a las cámaras respirométricas se determinó el peso húmedo (p.h.) de los mismos con una balanza Ohaus Explorer EOG120 para expresar el consumo de oxígeno en $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ p.h.}$ por cada tratamiento.

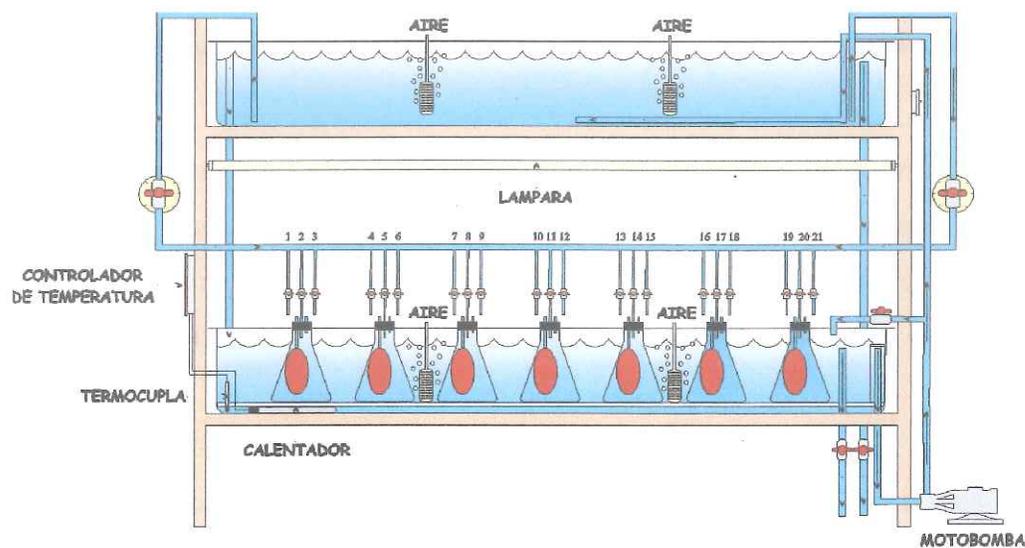


Fig. 3. Respirómetro semiabierto con 21 cámaras de 1000 ml.

III.8 Obtención de hemolinfa de los organismos experimentales.

Antes del desafío con la bacteria, se extrajo hemolinfa de 6 camarones por condición experimental: R0g, PH2g, PH3g y SF como control, en un solo tiempo de muestreo para contrastar el efecto de los polisacáridos hidrosolubles. Después de la inyección con *Vibrio* y SF, se extrajo hemolinfa de 24 camarones, 6 por cada tiempo de muestreo: 2, 6, 12 y 24 horas para cada condición experimental.

Para extraer la hemolinfa de los organismos provenientes de cada tratamiento se insertó una jeringa desechable hipodérmica (de 1 ml con aguja de 0.40 mm x 16 mm) a la altura de la base del quinto par de periópodos de los organismos. La jeringa contenía aproximadamente 200 μ l de solución anticoagulante fría (2-8°C), solución isotónica para camarón, SIC-EDTA (Vargas - Albores *et al.*, 1993). La dilución de la muestra fue 1:3 hemolinfa-anticoagulante. La cantidad de hemolinfa extraída fue de \approx 100 μ l y se tomaron submuestras para la determinación de las variables metabólicas y hematológicas.

Todos los camarones utilizados se encontraron en estadio de intermuda. Para reducir la actividad metabólica y el efecto de la manipulación, los camarones experimentales se colocaron 5 minutos antes de la extracción de la hemolinfa en recipientes de plástico de 4 l con agua pre-aireada y enfriada a 18 °C (Rosas *et al.*, 2002a, Pascual *et al.*, 2003a).

III.9 Conteo total de hemocitos

Para el conteo total de hemocitos (CTH), se tomó 10 μ l de la mezcla hemolinfa-anticoagulante de los organismos provenientes de cada condición experimental y se colocó en una cámara de NeuBauer, la cual fue observada en un microscopio marca ZEISS. El número de hemocitos fue determinado según la metodología de Stein (1973).

III.10 Medición de hemocianina

Para la cuantificación de la hemocianina (Hc), 10 μ l de hemolinfa fueron diluidos con 990 μ l de agua destilada en una cubeta para UV de 10.0 mm (1.0 ml; 1.0 cm de espesor), en donde se midió la absorbancia a 335.0 nm (Chen y Cheng 1993a).

La concentración de la Hc se determinó utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon = 17.26$ (Chen y Cheng 1993a), se aplicó la siguiente formula:

$$Hc = (\text{absorbancia}/17.26) \times FD \text{ (Pascual et al, 2003a)}$$

Donde FD es el factor de dilución.

La razón Hc/proteína fue calculada al dividir la concentración de hemocianina (mmol l^{-1}) por la de proteína (mmol l^{-1}) la cual fue convertida a partir de mg ml^{-1} a mmol l^{-1} al dividir por 66 (Chen y Cheng, 1993b).

III.11 Determinación de niveles metabólicos (proteínas totales, glucosa y lactato)

Para la medición de los metabolitos en la hemolinfa de los organismos de cada condición experimental, la muestra de la hemolinfa que fue diluida con anticoagulante frío (8°C , 1:3 hemolinfa-anticoagulante) fue centrifugada a 800g por 3 minutos a 4°C para separar el sobrenadante, se utilizó una centrifuga Biofuge fresco marca Heraeus, según la metodología descrita por Pascual *et al.* (2003a).

La determinación de proteínas totales, glucosa y lactato se realizó por medio de los kits comerciales marca POINTE SCIENTIFIC.

III.12 Desinfección

Al finalizar cada uno de los experimentos de desafío con la bacteria, se sustrajeron los camarones de cada unidad experimental y se llevaron a esterilizar en autoclave. Los estanques, el respirómetro completo (estanques y erlenmeyers) y todos los utensilios utilizados fueron desinfectados con cloro al 1%.

Para corroborar la ausencia de *Vibrio* en el agua, se tomaron muestras del agua 10 y 100 ml y se procedió a filtrar con bomba de vacío, posteriormente se sembró la membrana filtrante de 45μ en placas conteniendo agar TCBS y se incubó a 28°C por 24 horas. Confirmándose la ausencia total de *Vibrio* en el agua.

III.13 Análisis estadístico

Los datos de consumo de oxígeno, CTH, hemocianina, proteínas totales, glucosa y lactato, fueron sometidos a un análisis exploratorio de datos. Posteriormente, se realizaron análisis de varianza de dos vías (ANOVA), con el fin de identificar las diferencias significativas causadas por las concentraciones de los polisacáridos hidrosolubles del alga *Macrocystis pyrifera* y el tiempo de infección con la bacteria *Vibrio campbellii* (pre inyección y post inyección).

Para los datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal- Wallis (Zar, 1999). Se realizaron pruebas a posteriori; método Holm- Sidak, Dunnet y Student Newman-Keuls, para determinar cual de las dos concentraciones de los polisacáridos hidrosolubles del alga en la dieta ejerció un mayor efecto sobre *L. vannamei* al ser infectados con la bacteria.

El límite de aceptación y rechazo fue $\alpha p < 0.05$. Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico SIGMA Stat v.3 y se graficaron con el programa SIGMA Plot v.9.

IV. Resultados

IV.1 Supervivencia

La supervivencia de los juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas suplementadas con diferentes concentraciones (0, 2 y 3 g kg⁻¹) de polisacáridos hidrosolubles y desafiados con *V. campbellii* se muestra en la Fig. 4. Todos los camarones del grupo control, a quienes sólo se les inyectó suero fisiológico (SF) sobrevivieron. En contraste, la mortalidad ocurrió después de las 2 horas en los organismos alimentados con la dieta control (0g kg⁻¹ de PH) y los organismos que presentaron la menor supervivencia al final del experimento (72 horas) correspondieron al tratamiento con 3g kg⁻¹ PH.

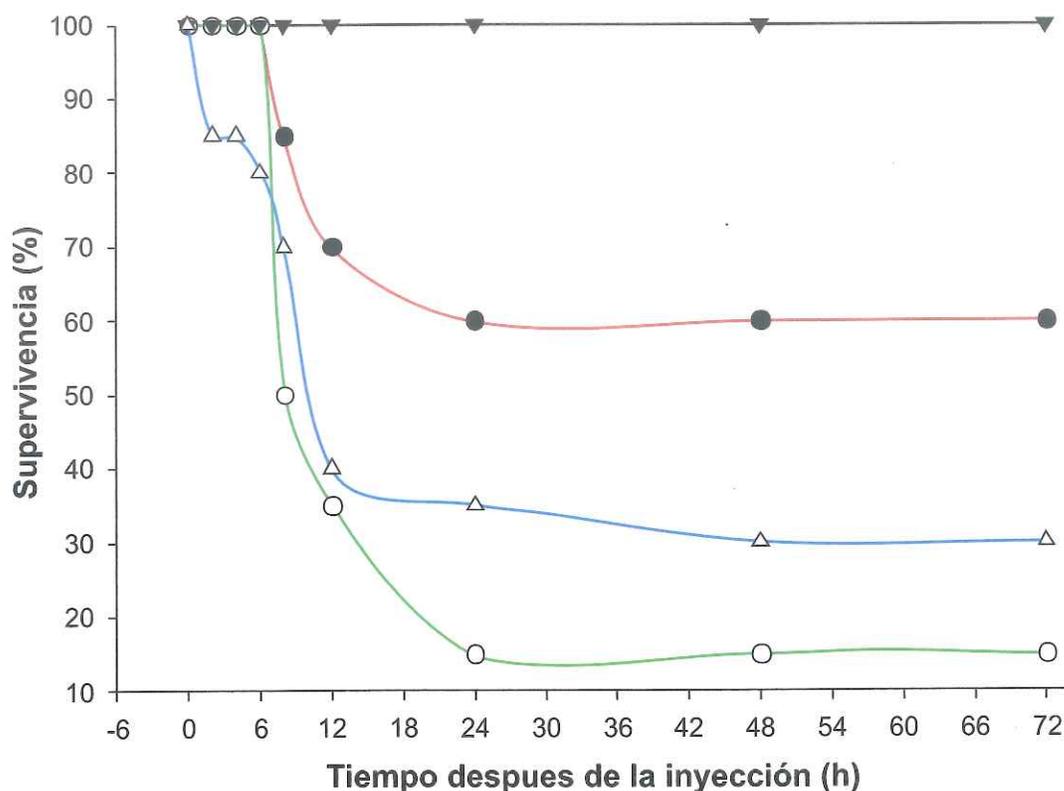


Fig. 4. Supervivencia (%) de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼).

Se pudo apreciar algunos signos de la vibriosis en camarones infectados con *V. campbellii*, estos fueron: nado errático, alctargamiento, heridas melanizadas (lugar de la inyección), flexibilidad del abdomen, opacidad de la musculatura abdominal, coloración rojiza y expansión de los cromatóforos en los apéndices.

IV.2 Consumo de oxígeno

Antes del desafío con la bacteria (pre inyección) se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) en el consumo de oxígeno entre los organismos alimentados con las diferentes concentraciones de PH (Fig. 5).

Tabla II. Niveles del consumo de oxígeno, CTH, hemocianina, proteínas totales, razón Hc/proteína, glucosa y lactato para *L. vannamei* alimentado con dietas suplementadas con polisacáridos hidrosolubles y desafiado con *V. campbellii*.

	Concentración de polisacáridos hidrosolubles (g kg^{-1})		
	R0g	PH2g	PH3g
Peso húmedo (g)	11.51 \pm 0.31	10.46 \pm 0.33	11.31 \pm 0.37
Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$)	49.01 \pm 8.13a - 85.36 \pm 3.64a	55.12 \pm 4.20a - 73.68 \pm 5.20a	40.00 \pm 5.49a - 72.42 \pm 3.53a
CTH ($\times 10^6$ células ml^{-1})	1.42 \pm 0.04a - 2.38 \pm 0.05a	1.97 \pm 0.03a - 4.50 \pm 0.31a	1.30 \pm 0.03a - 2.85 \pm 0.06a
Hemocianina (mmol l^{-1})	0.67 \pm 0.05a - 1.15 \pm 0.05a	0.60 \pm 0.03a - 1.29 \pm 0.03a	0.70 \pm 0.07a - 1.31 \pm 0.04a
Proteínas totales (mg ml^{-1})	75.23 \pm 4.54a - 127.14 \pm 4.42b	126.06 \pm 5.14b - 172.39 \pm 8.47c	127.5 \pm 6.82c - 164.32 \pm 5.79c
Razón Hc/ proteína (%)	48.8 \pm 3.6b - 93.3 \pm 8.8c	23.7 \pm 1.8a - 68.4 \pm 4.7b	28.6 \pm 3.1a - 55.1 \pm 3.1b
Glucosa (mg dl^{-1})	7.64 \pm 1.86a - 84.16 \pm 1.82b	10.45 \pm 2.89a - 25.37 \pm 2.55a	5.92 \pm 0.96a - 78.00 \pm 1.86b
Lactato (mg dl^{-1})	0.00 \pm 0.04a - 1.36 \pm 0.08a	0.08 \pm 0.01a - 1.03 \pm 0.07a	0.10 \pm 0.01a - 1.26 \pm 0.04a

Se muestran las medianas (\pm IC), donde IC es intervalo de confianza; R0g, PH2g y PH3g denotan las dietas: Rangen 0, 2.0 y 3.0 g kg^{-1} de polisacáridos hidrosolubles, respectivamente. Los datos en la misma línea con diferente letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se observó que la tasa de consumo de oxígeno en *L. vannamei* alimentado con dietas suplementadas con PH se redujo en todos los tratamientos después de la infección con *V.*

campbellii durante la cuarta y sexta hora (Fig. 5) y los organismos de la dieta control (0g kg^{-1} PH) presentaron los mayores consumos de oxígeno (49.01 ± 8.13 a 85.36 ± 3.64 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), mientras que los camarones del tratamiento con 3g kg^{-1} de PH presentaron los menores consumos de oxígeno (40.00 ± 5.49 - 72.42 ± 3.53 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Tabla II). El consumo de oxígeno no fue influenciado por la concentración de PH ni por el tiempo de infección con la bacteria.

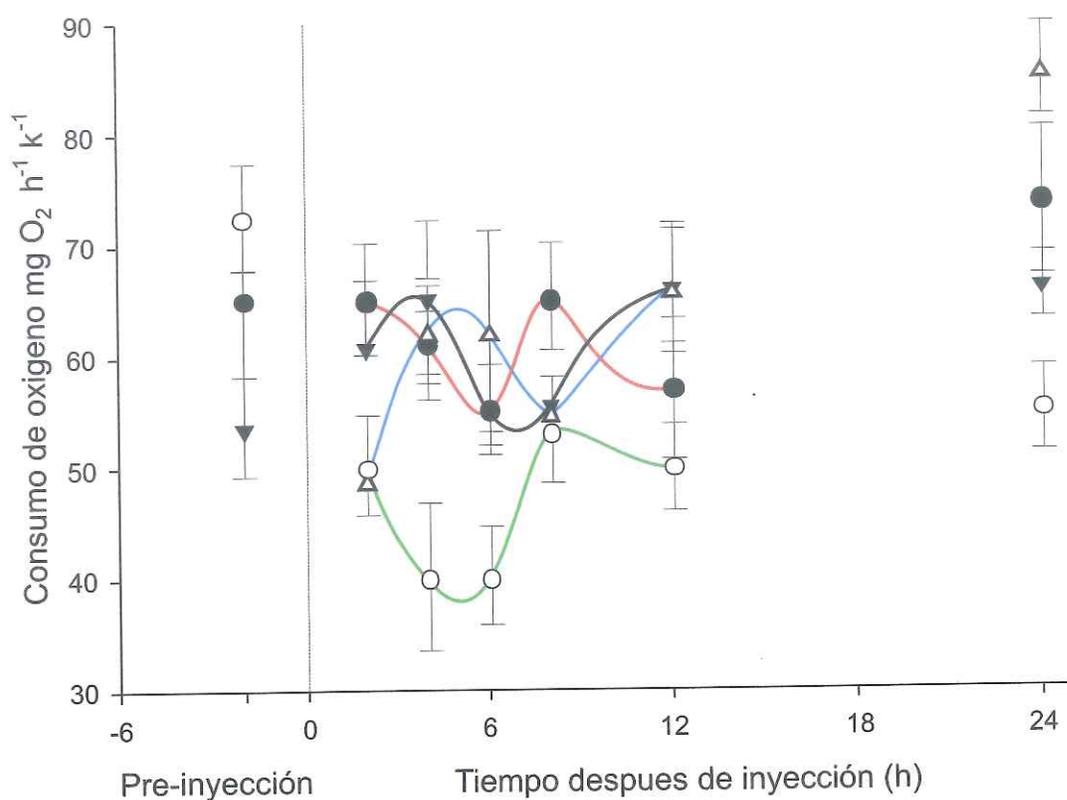


Fig. 5. Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gr}^{-1}$) de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (△) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores del consumo de oxígeno representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

IV.3 Conteo Total de Hemocitos

El conteo total de hemocitos (CTH) fue progresivamente elevándose en relación a la concentración de los polisacáridos hidrosolubles en la dieta desde 0.0 a 3g kg⁻¹ durante la preinyección, sin embargo, los tratamientos no son diferentes estadísticamente (Fig. 6). Después de la inyección con *Vibrio* el CTH de los camarones provenientes de la dieta con el tratamiento de 2g kg⁻¹ de PH fue mas alto que los organismos con la dieta control y los organismos con la dieta de 3g k⁻¹ PH, presentando valores entre 1.97 ± 0.03 - 4.50 ± 0.31 x 10⁶ cel. ml⁻¹ (Tabla II). Se observó que el impacto por la inyección de SF a los camarones afectó el CTH y presentó el mayor número de hemocitos (7.2 ± 0.05 x10⁶ cel. ml⁻¹) a las 2 horas y se redujo a las 24 horas (0.4 ± 0.01 x10⁶ cel. ml⁻¹).

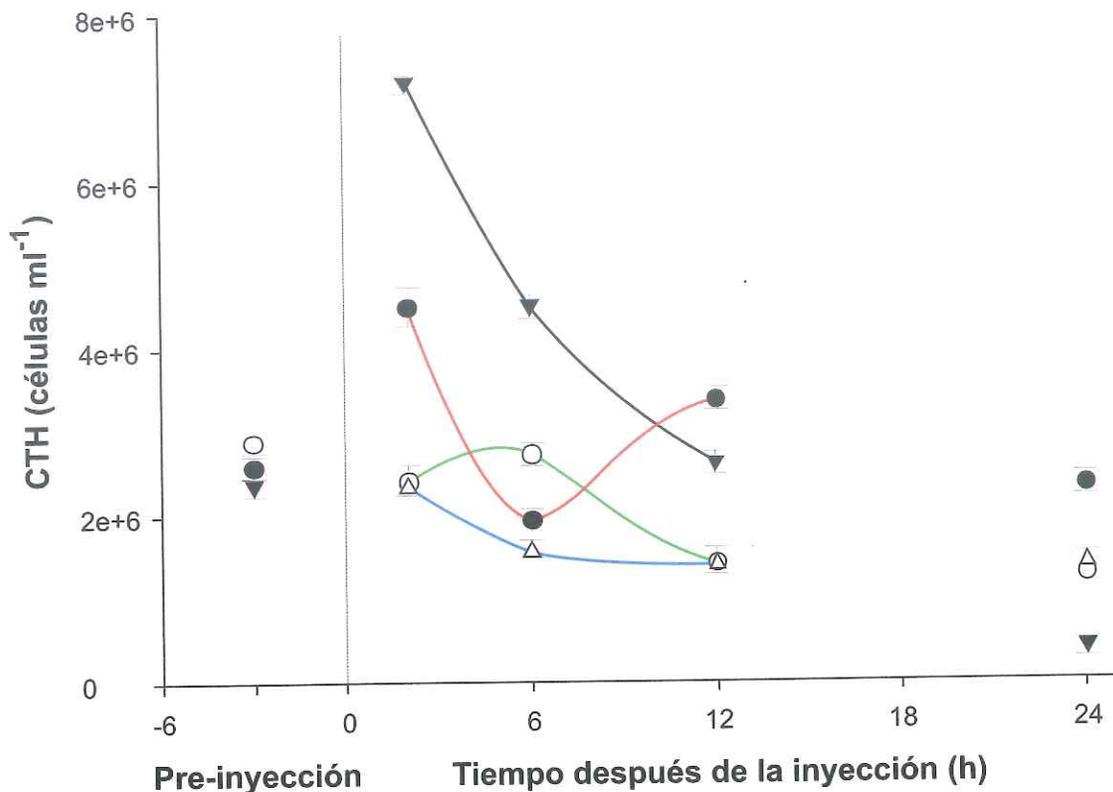


Fig. 6. Conteo total de hemocitos (CTH) (1×10^6 células por ml^{-1}) en la hemolinfa de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (△) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores del CTH representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

No existieron diferencias significativas durante el tiempo de infección ni entre las concentraciones de polisacáridos hidrosolubles ($p < 0.05$). Durante el conteo del número de hemocitos, se pudo observar que todos los tratamientos infectados con la bacteria presentaban plasmólisis de los hemocitos, mayormente en los organismos provenientes de los tratamientos con la dieta control (0g kg^{-1} PH) y 3g kg^{-1} PH.

IV.4 Hemocianina

La concentración mínima de hemocianina en la hemolinfa de *L. vannamei* fue de 0.600 mmol l^{-1} para los organismos alimentados con la dieta de 2g kg^{-1} de PH durante la pre inyección, no mostrando diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$) (Fig.7).

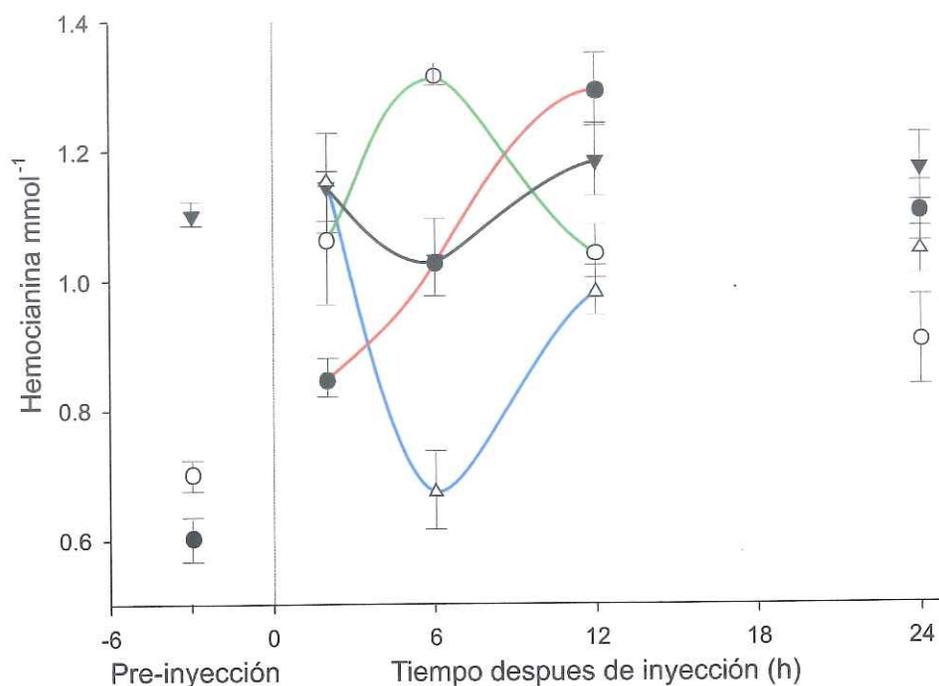


Fig. 7. Concentración de hemocianina (mmol l^{-1}) en la hemolinfa de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de hemocianina representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

Los máximos valores de hemocianina en la hemolinfa de los camarones después de la inyección con la bacteria los presentan el tratamiento con 3g kg^{-1} de PH ($0.70 \pm 0.07 - 1.31$

$\pm 0.04 \text{ mmol l}^{-1}$) (Tabla II), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las dietas, ni durante el tiempo de exposición a la bacteria ($P>0.05$).

IV.5 Metabólitos

4.1 Proteínas totales

La menor concentración de proteínas en la hemolinfa de *L. vannamei* fue para los organismos provenientes de la dieta control ($75.23 \pm 4.54 - 127.14 \pm 4.42 \text{ mg ml}^{-1}$) y es significativamente menor que los camarones con los otros tratamientos ($p<0.05$) (Fig. 8 y Tabla II).

Después de la infección, los niveles de proteínas para todos los organismos experimentales se vieron reducidos entre las horas 6 y 12, y se fue incrementando hasta la hora 24 (Fig. 8). Los organismos del tratamiento con 3 g kg^{-1} de PH presentaron los mayores niveles de proteínas ($127.5 \pm 6.82 - 164.32 \pm 5.79 \text{ mg ml}^{-1}$).

La variación de la concentración de proteínas de los camarones estuvo influenciada por el tiempo de infección y las diferentes concentraciones de polisacáridos hidrosolubles ($p<0.05$).

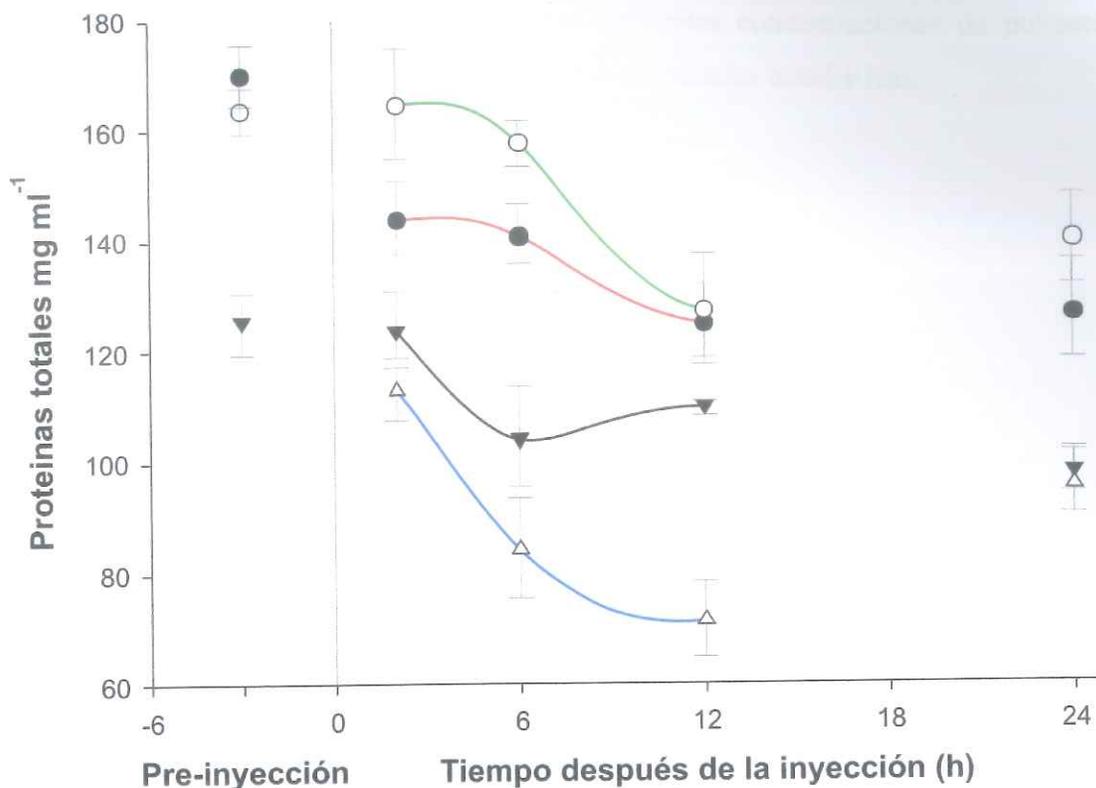


Fig. 8. Proteínas totales (mg ml^{-1}) en la hemolinfa de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de proteínas totales representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

4.2 Glucosa

Los niveles de glucosa en la hemolinfa de los camarones durante la pre inyección presento valores entre 15.17 ± 0.73 a 20.51 ± 0.61 mg dl^{-1} (Fig. 9), presentando diferencias significativas entre los organismos provenientes de las unidades experimentales ($p < 0.05$). Cuando se realizo el desafío con *V. campbellii*, se produjo un incremento de estos niveles, siendo los camarones alimentados con la dieta control y 3g kg^{-1} los que presentaron valores máximos de glucosa a la hora 2 con 84.16 ± 1.82 y 78.00 ± 1.90 mg dl^{-1} , respectivamente. Posteriormente, a la hora sexta todos los organismos de los grupos experimentales presentaron una reducción de sus niveles de glucosa, y se incrementaron gradualmente hasta las 24 horas.

Se encontró diferencias significativas con respecto al tiempo de infección (2, 6, 12 y 24) de este metabolito ($p < 0.05$), mientras que las diferentes concentraciones de polisacáridos hidrosolubles (2g kg^{-1} y 3g kg^{-1}) no presentaron diferencias estadísticas.

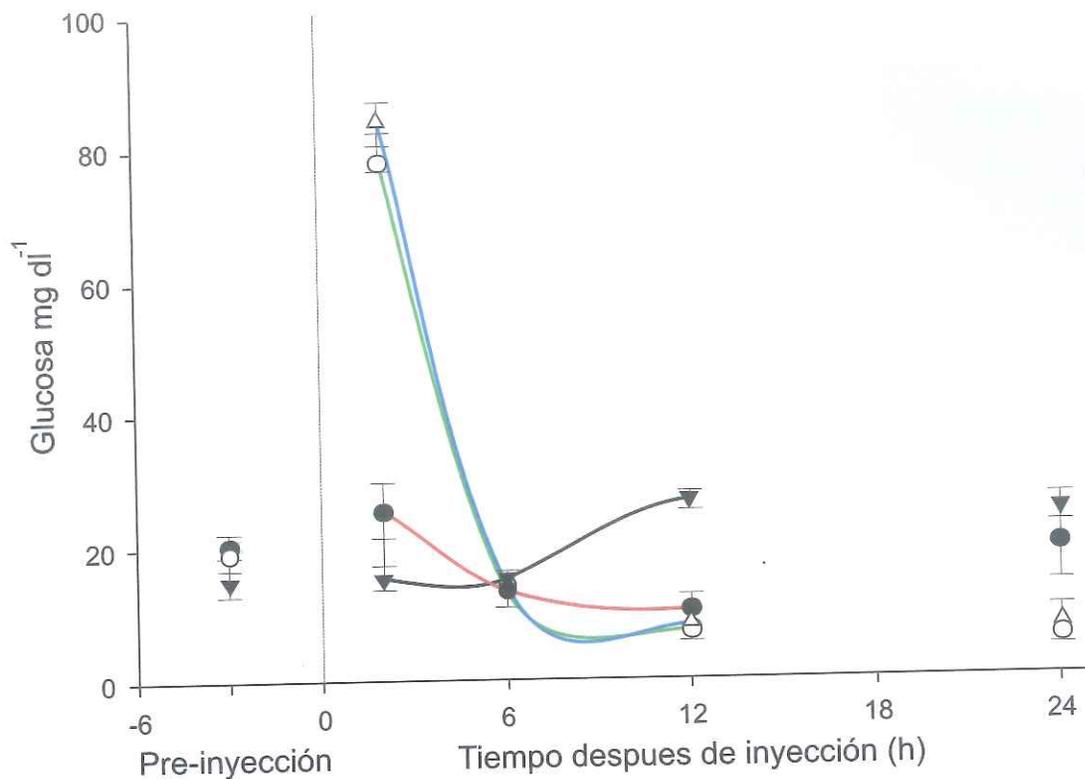


Fig. 9. Niveles de glucosa (mg dl^{-1}) en la hemolinfa de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de glucosa representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

4.3 Lactato

La concentración de lactato en la hemolinfa de *L. vannamei* durante la pre inyección mostro diferencias entre los organismos control y los otros tratamientos ($p < 0.001$) ver Fig. 10. Después del desafío con *V. campbellii* los niveles de lactato en los camarones no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de polisacáridos hidrosoluble ni durante el tiempo después de la inyección con la bacteria ($p > 0.05$).

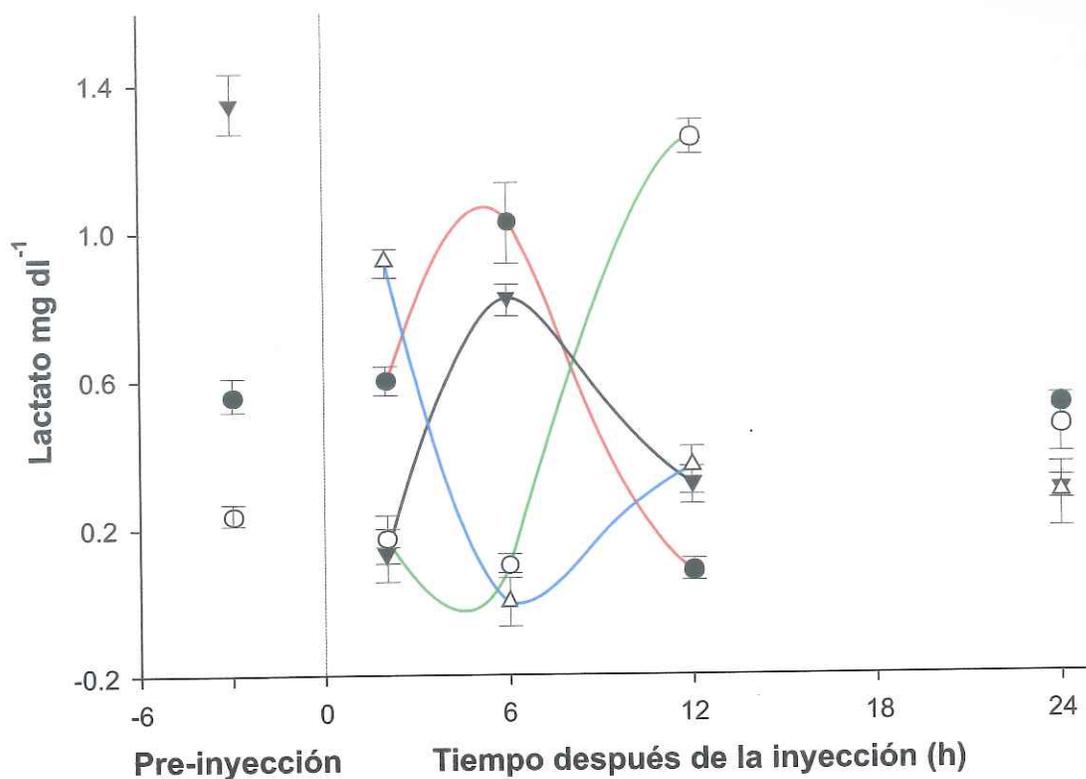


Fig. 10. Niveles de lactato (mg dl^{-1}) en la hemolinfa de *L. vannamei* después de la inyección con *V. campbellii* en las dietas PH2g (●) y PH3g (○), y como control a R0g (Δ) y SF (▼). La línea punteada indica el tiempo de la inyección. Los valores de la concentración de lactato representan las medianas de 6 camarones \pm IC (95%). Los valores de pre inyección corresponden a tres horas antes de la inyección.

V. Discusión

Se ha demostrado que algunos tipos de polisacáridos de origen algal pueden proveer o estimular la inmunidad y resistencia frente a las enfermedades en los animales en cultivo (Castro *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007). En este trabajo, se extrajeron los polisacáridos hidrosolubles a partir del alga marina *Macrocystis pyrifera* y fueron suministrados a los camarones a través de la dieta en dosis de 2 y 3 g kg⁻¹; posteriormente fueron desafiados con *V. campbellii* ($4.6 \pm 0.15 \times 10^4$ UFC g⁻¹) y se observó que los organismos alimentados con la dieta de 2g kg⁻¹PH presentaron mayor supervivencia (60%) que los organismos control (30%) y los de 3g kg⁻¹PH (15%) al final del experimento. Efectos similares fueron reportados por Cheng *et al.* (2005) para *L. vannamei* desafiado con *V. alginolyticus* (1.6×10^5 UFC g⁻¹) e inmunoestimulado con alginato de sodio suministrado por vía oral en dosis de 0, 0.5, 1.0 y 2.0 g kg⁻¹ encontrando supervivencias de 13.3, 30, 30 y 43%, respectivamente, concluyendo que la administración de 2.0 g kg⁻¹ o menos de alginato de sodio en la dieta puede potenciar la capacidad inmune del camarón e incrementar su resistencia frente al *Vibrio*. De igual manera, Huang *et al.* (2006) encontraron supervivencias de 22.2, 37.8, 36.4 y 20% para *Fenneropenaeus chinensis* alimentado con polisacáridos extraídos de *Sargassum fusiforme* en concentraciones de 0, 0.5, 1.0 y 2.0 % y desafiados con *V. harveyi* (1.3×10^6 UFC g⁻¹), concluyeron que la dosis de 0.5 y 1.0% mejoró la resistencia a la vibriosis y potencializó la actividad inmune. En nuestro estudio, los camarones alimentados con 2g kg⁻¹ de PH incrementaron su resistencia al obtenerse una mayor sobrevivencia cuando fueron desafiados con *V. campbellii*.

En crustáceos, una reducción de la resistencia frente a patógenos está correlacionada con el bajo número de hemocitos ya que éstos juegan un rol importante en la defensa celular (Le Moullac y Haffner, 2000). Los hemocitos circulantes, son responsables de la remoción de partículas extrañas de la hemolinfa. Estudios *in vivo* y *in vitro* han mostrado que los hemocitos rápidamente se unen a las partículas extrañas para formar nódulos y estos nódulos llegan a alojarse en las branquias por un proceso mecánico (Martin *et al.*, 1998).

Los valores de CTH encontrados en este estudio para juveniles de *L. vannamei* inmunoestimulados con PH y desafiados con *V. campbellii* (1.3 ± 0.03 a $4.5 \pm 0.31 \times 10^6$ cel. ml^{-1}) son semejantes a los reportados por Cheng *et al.* (2005) de 3.9 a 5.3×10^6 cel. ml^{-1} para la misma especie y desafiados con *V. alginolyticus*, estos autores observaron que a medida que se incrementa la concentración del inmunoestimulante (alginato de sodio) también se incrementa el número de hemocitos. Sin embargo, Wang y Chen (2005) obtuvieron valores superiores de 9.92 ± 1.6 a $10.14 \pm 3.5 \times 10^6$ cel. ml^{-1} para juveniles de *L. vannamei* retado con *V. alginolyticus* y bajo diferentes concentraciones de salinidad, concluyendo que la combinación de la vibriosis y las bajas concentraciones de salinidad afectan la respuesta inmunológica. Montero-Rocha *et al.* (2006) encontraron valores menores de 1×10^5 cel. ml^{-1} para *L. vannamei* alimentado con Ergosan (ácido algínico al 0.5%). En el presente estudio el valor encontrado por Montero-Rocha *et al.* (2006) esta por debajo del CTH hallado para camarones inmunoestimulados con PH antes de la infección ($2.7 \pm 0.05 \times 10^6$ cel. ml^{-1}), esto nos confirma que el número total de hemocitos en crustáceos es afectado por varios factores, tales como una vibriosis, estrés ambiental y la variabilidad interespecifica de la población (Liu *et al.*, 2004).

El incremento de hemocitos por la presencia de inmunoestimulantes trae como consecuencia el incremento en el número de células efectoras que serán las encargadas de eliminar al antígeno como respuesta de su mecanismo de inmunidad innata (Espinosa *et al.*, 2002). La eficiencia de un inmunoestimulante se establece en función de la capacidad de alertar al sistema de defensa sin desgastarlo, induciendo una respuesta persistente, tal como una mayor proliferación de células que participen en el sistema de defensa de manera más activas, sin embargo esta reacción puede generar un desgaste energético y con ello menor resistencia frente al patógeno (Rodríguez, 2005). Al respecto, Espinosa *et al.* (2002) manifiesta que la aplicación de altas dosis de lipopolisacáridos (inmunoestimulante) pueden provocar en los hemocitos mas que una proliferación, la diferenciación a células efectoras y con ello a una reducción del número de hemocitos debida a la desgranulación de los mismos y con esto su salida del ciclo mitótico. Sin embargo, la causa de la

reducción del número de hemocitos es aun controversial. Maldonado *et al.* (2003) evaluaron el comportamiento hemocitario en 6 familias de *L. vannamei*, encontraron amplias diferencias en el CTH antes (3.47 a 21.3×10^6 cel.ml⁻¹) y después del desafío con el virus de la mancha blanca (WSSV) (16.3 a 22.1×10^6 cel.ml⁻¹), consideraron que el virus fue el responsable de la disminución de los hemocitos, posiblemente debido a la explosión de las células (plasmólisis) o por apoptosis (muerte programada) inducida por el virus, dando como resultado un rebrote del virus. En este estudio, después del desafío con la bacteria, se observó que el número de hemocitos se incremento en las dos primeras horas y posteriormente, a las seis horas se produjo una reducción del número de hemocitos en todos los organismos experimentales observándose una gran cantidad de células hemocíticas destruidas, sobre todo en los organismos provenientes de los tratamientos con 0 y 3 g kg^{-1} del PH a diferencia de los organismos del tratamiento con suero fisiológico que presentó mayor número de hemocitos. Consideramos que esta plasmólisis se produjo en respuesta a la infección con la bacteria y que la concentración de 3 g kg^{-1} de inmunoestimulante disminuyó las defensas del camarón en relación al número de hemocitos en la hemolinfa durante el tiempo de infección y por lo tanto resistió en menor grado la vibriosis. Esto nos mostró que la resistencia del camarón a la vibriosis puede ser mejorada por la inclusión en la dieta de 2 g kg^{-1} PH, pero no por 3 g kg^{-1} PH.

Se examinó la respuesta metabólica de *L. vannamei* expuesto a la bacteria *V. campbellii* y se observó que la infección bacteriana redujo la tasa de consumo de oxígeno en los organismo expuestos a los diferentes tratamientos. Esta depresión metabólica seguida de la inyección con *Vibrio campbellii* es reportada por Scholnick *et al.* (2006) quienes indicaron una disminución de 27% del consumo de oxígeno de *L. vannamei* después de 4 hs de la infección y su persistencia hasta las 24 hs.

Los camarones como otros crustáceos, rápidamente eliminan las dosis de la inyección bacteriana (Burgents *et al.*, 2005a). Al respecto, Burnett *et al.* (2006) reportaron que la inyección de *V. campbellii* en *Callinectes sapidus* disminuyó en un 19% la presión parcial

post-branquial de oxígeno, indicando una significativa reducción interna de los niveles de oxígeno asociada con la inyección bacteriana, además manifestaron que la infección pudo limitar el flujo normal de la hemolinfa a través de las branquias e impedir su función respiratoria, produciéndose una hipoxia interna. Las branquias de los crustáceos son importantes porque contribuyen en la defensa inmune ya que el sistema circulatorio abierto de los crustáceos permite que las partículas extrañas así como las bacterias sean rápidamente removidas de la hemolinfa y encapsuladas y acumuladas eventualmente en las branquias (Martin *et al.*, 1998, 2000) a pesar de que esto aún no está totalmente dilucidado, se ha podido comparar que las bacterias son retenidas más en las branquias y en el hepatopáncreas hasta por 240 min posteriores a la infección que el corazón y el órgano linfoide (Burgents *et al.*, 2005b). En el presente trabajo, después de aplicar la inyección con *V. campbellii* se produjo una reducción de la tasa metabólica entre las 2 y las 8 horas debida al proceso mecánico indicado por Martin *et al.* (1998) en donde las bacterias son llevadas hacia las branquias en forma de nódulos y acumuladas en las lamelas branquiales, generando una disminución de su función respiratoria. Posteriormente, entre las 12 y 24 horas, se observó una tendencia a aumentar el consumo de oxígeno, lo que indicó que el proceso de depuración se llevó a cabo gradualmente y permitió liberar a las bacterias de la hemolinfa a través de la separación y secuestro de las mismas, las cuales se eliminarán completamente en la siguiente muda (Martin *et al.*, 2000). Al final del experimento se observó que *L. vannamei* buscó restablecer su metabolismo a los valores iniciales (pre inyección), mostrando que los organismos alimentados con la dieta de 2g kg⁻¹PH presentaron una tasa metabólica más estable durante la infección que los tratamientos con 0 y 3g kg⁻¹PH.

Las proteínas son un nutriente esencial para los camarones peneidos dado que son básicas para el crecimiento, la regulación de la presión osmótica del medio interno, la gluconeogénesis y el sistema inmune (Rosas *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003a). Por estas razones, su variación en la hemolinfa es importante porque indica el estado nutricional de los organismos. Se ha señalado que la hemocianina es un almacén de proteínas que alcanza proporciones entre un 60 y 90% de las proteínas totales en la hemolinfa. Evidentemente la

hemocianina junto con la proteína proporcionan elementos que permiten evaluar el estado general de los camarones ya que esto se refleja tanto en el estado fisiológico así como de la calidad de la dieta en general (Rosas *et al.*, 2002). La hemocianina no es sólo una proteína responsable de la respiración en crustáceos, se ha demostrado que varias moléculas relacionadas al sistema inmune de los crustáceos son generadas por fragmentos de hemocianina; como algunos péptidos antifúngicos que se generan por la porción C terminal, en respuesta a un estímulo antigénico (Destomieux-Garzon, 2001 en Alpuche-Osorno *et al.*, 2005). Asimismo, componentes de los hemocitos pueden convertir fragmentos de la hemocianina en una enzima parecida a la fenol oxidasa (sistema proPo). La hemocianina tiene homología con varias proteínas del sistema inmune y es posible que estímulos antigénicos desencadenen reacciones donde la hemocianina genera moléculas inmunoreactivas a través de mecanismos hasta ahora desconocidos. Con ello se pone de manifiesto la importancia de la hemocianina en el sistema inmune (Alpuche-Osorno *et al.*, 2005).

Chen y Cheng (1993b) consideran un índice que toma en cuenta a las proteínas y a la hemocianina simultáneamente dada su interrelación e importancia en el sistema inmune, es así que una mejor interpretación de su valor metabólico es la razón Hc/proteína. Yoganandhan *et al.* (2003) reportaron valores de Hc/proteína para *P. indicus* en un estado fisiológico óptimo de 63.12 y para organismos desafiados con WSSV en un intervalo de 12 a 36 horas de la infección viral se obtuvo valores de 73.4 a 49.6 y finalmente a las 96 horas de 36.42; con ello muestran que a medida que los camarones son más vulnerables debido a la infección esta razón disminuye. Los resultados obtenidos en el presente estudio entre las 0 a 24 horas de infección con *V. campbellii* fueron de 24.0 a 73.0 para todos los organismos experimentales; organismos de la dieta con 2g kg⁻¹PH presentaron un mayor incremento de la razón (35%), mientras que los organismos del grupo control y 3g kg⁻¹ PH presentaron valores menores en el mismo intervalo de tiempo (15 y 16%), indicándonos que la concentración de 2g kg⁻¹ de PH propicio de manera más efectiva el incremento en la razón (Hc/proteína) en respuesta a una mayor capacidad inmune frente a la vibriosis, es

decir que conforme transcurrió el tiempo de infección, la adición en la dieta de 2g kg^{-1} de PH permitieron contrarrestar los efectos de la vibriosis contrario a lo que Yoganandhan *et al.* (2003) reportaron sin la adición de ningún inmunomodulador.

Los niveles de glucosa en la hemolinfa de *L. vananmei* en condiciones normales de laboratorio se han reportado en un rango de 14 a 28.0 mg dl^{-1} (Racota y Palacios, 1998, Rosas *et al.*, 2002 y Flores, 2007) en este estudio los valores obtenidos de glucosa fueron similares solamente en aquellos organismos que se encontraban sin el desafío bacteriano; tanto en la dieta control como en las dietas experimentales. Sin embargo, dado que la glucosa es un indicador de estrés, se pudo observar un incremento hasta de 58 mg dl^{-1} en las concentraciones de glucosa cuando el camarón fue sometido a estrés por repetidas extracciones de hemolinfa como lo reporta Racota y Palacios (1998). Yoganandhan *et al.* (2003) evaluaron las respuestas metabólicas de *Penaeus indicus* frente al virus de la mancha blanca (WSSV) y reportaron valores de glucosa de 88.14 hasta 110.86 mg dl^{-1} . Por otra parte Burnett *et al.* (2006) manifiestan que los lipopolisacáridos, componentes de la membrana de las bacterias gram negativas, puede provocar hemocitopenia, que es la disminución de los hemocitos y además inducir a la liberación de la hormona hiperglicémica (CHH) de la glándula del seno. En este estudio, cuando los organismos experimentales fueron desafiados con *V. campbellii*, los niveles de glucosa se incrementaron abruptamente en las dos primeras horas de la infección para los organismos provenientes de los tratamientos con 0 y 3g kg^{-1} PH en un 450 y 310% , respectivamente, mientras que los organismos con el tratamiento de 2g kg^{-1} sólo incrementaron un 20% , lo cual nos indica que los tratamientos sin el polisacárido y el que tenía la concentración más alta requirieron una demanda energética más elevada para combatir la infección y restablecer sus funciones normales que los camarones provenientes del tratamiento con 2g kg^{-1} PH. Esto nos permite deducir que la glucosa es el sustrato que permitió al organismo enfrentar la infección en una forma rápida pero con un alto costo energético. Cuando el inmunomodulador está presente en una forma óptima (2g kg^{-1}) la demanda energética es menor y es utilizada con mayor eficiencia durante la infección.

La concentración de lactato para organismos alimentados con la dieta control durante la preinyección fue semejante a la reportada por Racotta y Palacios (1998) con valores de 1.5 mg dl⁻¹ para *L. vannamei* en condiciones normales, y fue menor que la encontrada por Flores *et al.* (2007) para la misma especie en organismos mantenidos en baja salinidad. Los organismos inmunoestimulados con PH después de la infección presentaron un ligero incremento en los niveles de lactato en la sexta hora; pero este efecto no fue correlacionado con la concentración del inmunoestimulante ni por la infección bacteriana ($p < 0.05$) pero si se pudo encontrar una relación con las disminuciones del consumo de oxígeno y de la glucosa, esta condición metabólica podría indicar que los organismos incrementaron la concentración de lactato en la hemolinfa para cubrir la demanda energética ocasionada por la infección.

Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que los PH presentan diferentes efectos tanto en el tiempo como en los diferentes metabolitos evaluados debido a que el sistema de defensa innato se vio favorecido en el tratamiento que tenía la concentración de 2g permitiéndole una mayor estabilidad en las respuesta fisiológicas pero en el caso de 3g los organismos mostraron inestabilidad al utilizar sus recursos energéticos llevándonos a inducir un efecto inmunomodulador por parte de los componentes del extracto algal. A pesar de todas estas evidencias tanto de las respuestas fisiológicas, hematológicas y metabólicas es importante decir que la resistencia de los organismos frente a la vibriosis requiere el probar otros umbrales tanto bajos como altos del efecto inmunoestimulante del extracto de *M. pyrifera*.

Se concluye que es necesaria una óptima estimulación de la respuesta inmune del camarón aquella que le permita obtener una ventaja fisiológica adicional para resistir a las enfermedades bacterianas. Este estudio permitió evidenciar que la dieta de 2g kg⁻¹ de PH fue la que ofreció mayor estabilidad y le proporciono al organismo la capacidad de volver a un estado fisiológico cercano a sus valores hematológicos y metabólicos normales en un tiempo relativamente corto. Aunque no fue el propósito de este estudio, se reconoce que es importante definir cuales fueron las contribuciones de cada una de las fracciones del

extracto algal (ácido alginico, laminarian y fucoidan) que influyeron en la respuesta inmune del camarón blanco *L. vannamei* y esto requiere llevar a cabo estudios mas finos que puedan responder a estas interrogantes asi como conocer en una forma mas clara como los organismos no nada mas contrarrestan el efecto de la vibriosis sino que son capaces obtener una depuración sistémica y adquirir un estado saludable.

VI. Conclusiones

Los polisacáridos hidrosolubles del alga *M. pyrifera* son inmunomoduladores capaces de estabilizar de manera significativa las respuestas fisiológicas, hematológicas y metabólicas de *L. vannamei* en pruebas de desafío con *V. campbellii* y mostrar mayor resistencia frente a la infección.

Los PH adicionados a la dieta de *L. vannamei* mostraron un efecto inmunomodulador en la resistencia del camarón frente a la vibriosis, al mejorar la supervivencia del camarón con la concentración de 2g y de reducirla con la concentración de 3g.

La glucosa así como la proteína y la hemocianina fueron los sustratos que le permitieron a *L. vannamei* reaccionar con rapidez a la infección bacteriana sin embargo es el efecto del inmunomodulador el que le hace utilizarlos de una forma óptima que se traduzca en un ahorro energético y una mayor capacidad inmune.

VIII. Literatura citada.

- Alpuche-Osorno, J., M. Pereyra, L. Vazquez, C. Agundis, C. Rosas, E. Zenteno. 2005. Análisis proteómico de la subunidad LsL1 de la lectina del camarón blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus*. Revista electrónica de veterinaria. REDVET. Vol. VI, N°2. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020205.html>
- Anguiano, B. C. 1996. Patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* sobre larvas del mejillón Europeo *Mytilus galloprovincialis* y larvas y postlarvas del abulón rojo *Haliostis rufescens*. Tesis de Maestría. CICESE. 48 pp.
- Bachere, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191:3-11.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmunostimulación de Camarones peneidos. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. Mexico. 102-110 p.
- Briggs, M., S. Funge-Smith, R.P. Subasinghe, M. Phillips, 2005. Introducciones y movimiento de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 476. Roma, FAO. 86 pp.
- Bold C.H. and M. J. Wynne. 1978. Introduction to the algae structure and reproduction. Prentice-hall, inc. New Jersey, Englewood. USA. 335-339 p.
- Burgents, J.E., K.G. Burnett, L.E. Burnett. 2005a. Effects of hipoxia and hypercapnic hipoxia on the localization and the elimination of *Vibrio campbellii* in *Litopenaeus vannamei*, the pacific White shrimp. *Biol. Bull.* 208:159-168.
- Burgents, J.E., L.E. Burnett, E. V. Stabb, K. G. Burnett. 2005b. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 29:681-691.
- Burnett, L.E., J.D. Holman, D.D. Jorgensen, J.L. Ikerd, K.G. Burnett. 2006. Immune defense reduces respiratory fitness in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab. *Biol. Bull.* 211:50-57.
- Castro, R., I. Zarra, J. Lamas. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture* 229: 67-78.

- Chan, S. M., S.M. Rankin and L.L. Keeley. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. *Biol. Bull.* 175: 185-192.
- Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993a. Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology.* 27: 281-292.
- Chen, J.C. and S.Y. Cheng. 1993b. Studies on haemocyanin and haemolymph protein level of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:293-296.
- Chen, J.C., C.T. Chen., S.Y. Cheng. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110: 85-94.
- Cheng, Sha-Y and J-Chu Chen. 1999. Hemocyanin oxygen affinity, and the of fractionation oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology* 45: 35-46.
- Cheng W., Liu C., Kuo C.M., Chen J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaneus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology.* 18:1-12.
- Citarasu, T., V. Sivaram, G. Immanuel, N. Rout, V.Murugan. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to hematological, biochemical and immunological changes. *Fish & Shellfish Immunology* 21:372-384.
- Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, C. Guajardo-Barbosa. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. Mexico. 227-266 p.
- Djangmah, J. S., 1970. The effectys of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopáncreas, and on blood proteins of *Cragon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 32:709-731.

- Díaz, H. F., A. D. Re, R. A. González, L. N. Sánchez, G. A. Leyva, F. Valenzuela. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*. 38(13): 1387-1394.
- Díaz, F., A. D. Re., E. Sierra y E. Díaz-Iglesias. 2004. Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). *J. Shell. Research*. 23:1-8.
- Espinosa, G., T. Rodríguez, J. Marrero, L. Ramos, Y. Borrell, U. Bécquer, F. Nodas y N. Hernández. 2002. Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 765- 777 p.
- Flores, I. M. 2007. Efecto de astaxantina sobre respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* aclimatado a baja salinidad. Tesis de doctorado. CICESE. 53 pp.
- Flores, M., F. Díaz, R. Medina, A. D. Re, A. Licea. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. *Aquaculture Research* 38:740-747.
- Fu, Y. W., W. Y. Hou, S.T. Yeh. C.H. Li, J.C. Chen. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 22:673-685.
- Giffard Mena, I. 1999. Incidencia de bacterias luminiscentes en cultivos larvarios de *Penaeus stylirostris* Tesis de Maestría, Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México. 71 pp.
- Gomez-Gil, B., Herrera-Vega M.A., Abreu-Grobois F.A., Roque A. 1998 Bioencapsulation of two different *Vibrios* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl Environ Microbiol* 64:2318-2322
- Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juárez, R., Thompson, F.L., Swings, J., 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150:1769-1777.

- González, H. J. P. 2006. Crecimiento, Supervivencia, consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y acumulación de astaxantina en el tejido del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mantenido a diferentes salinidades y alimentado con diferentes concentraciones de astaxantina en la dieta. Tesis maestría. CICESE. 61 pp.
- Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration on *Cragon cragon* after exposure to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A:721-724.
- Hou, W. Y. and J. C. Chen. 2005. The immunostimulatory effect of hot water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunol.* 19:127-138.
- Huang, X., H. Zhou, H. Zhang. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on Vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 20:750-757.
- Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tadengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.
- Kontara, E. K. M., Merchie, G., Lavens, P., Nelis, H., Leenheer, A., Sorgeloos, P. 1995. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *European Aquaculture Society Special Publication.* 24:230-233.
- Latorre, P. y R. Flores-Aguilar. 2004. El mercado internacional de algas para consumo humano, caso del "Huiro" o "Sargazo" (*Macrocystis spp.*) y la "carola" (*Callophyllis spp.*). *Panorama Acuícola Magazine.* 10:62-66.
- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191:121-131.
- Le Moullac, G., C. Soyez, D. Saulnier, D. Ansquer, J.C. Avarre y P. Levy. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to Vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Imm.* 8: 621-629.
- Lightner, D. V. 1999. The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV y YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. *J. Aquaculture.* 9:2-10.

Liu C.H., S.P.Yeh, C.M. Kuo, W. Cheng, C.H. Chou. 2006. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: Activity and gene transcription. *Fish & Shellfish Immunology* 21:442-452.

Liu, C.H. y J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Imm.* 16:321-334.

Lizarraga-Partida M.L. y D. Bartlett. 2007. Virulencia de mutantes por transposición de *Vibrio harveyi* en larvas de crustáceos. Reporte final del Programa de Colaboración Científica US MEXUS-CONACYT 2005.

Maldonado, M., J. Rodriguez, I. de Blas y F. Echeverria. 2003. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas a WSSV. *CIVA*. 891-899 p.

Martín, G. G., J. Kay, D. Poole, and C. Poole. 1998. *In vitro* nodule formation in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Zoology* 117:155-168.

Martín, G. G., M. Quintero, M. Quigley, and H. Khosrovian. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapods crustaceans. *J. Crustac. Biol.* 20:209-217.

Medina, Z. R. 2006. Metabolismo respiratorio, excreción nitrogenada, relación O:N, capacidad osmoreguladora, crecimiento, frecuencia de muda y sobrevivencia en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja salinidad y alimentado con diferentes dosis de astaxantina. Tesis maestría. CICESE. 59 pp.

Merchie, G., E. Kontara, P. Lavens, R. Robles, K. Kurmali y P. Zorruelos. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricus). *Aquac. Res.* 29:579-585.

Mercier, L., E. Palacios, A. I. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera y I.S. Raccota, 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258:633-640.

Meyers, P. S. y T. Latscha. 1990. Carotenoids. *Advances in Aquaculture*. World Aquaculture Society 6:164-193.

- Mikulski, C. M., L.E. Burnett, and K.G. Burnett. 2000. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Shellfish Res.* 19:301-311.
- Montero-Rocha, A., D. McIntosh, R. Sanchez-Merino, I. Flores. 2006. Immunoestimulation of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. *Journal of Invertebrate Pathology.* 91:188-194.
- Palacios, E.M. 1999. Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la producción del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) Tesis Doctoral. CIBNOR. México. 60 pp.
- Pascual, C., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac and C. Rosas. 2003a. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218: 637-650.
- Pascual, C., A. Sanchez, C. Rosas. 2003b. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones Peneidos. Laboratorio de Ecología y biología Marina experimental. Fac. de Ciencias UNAM. Campeche, México, 26 pp.
- Pérez-Farfante, I. P. and B. Kensley. 1997. Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the World: keys and diagnosis. *Memories du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris.* 287 pp.
- Ponce, N.M.A., C. A. Pujol, E. b. Damonte, M. L. Flores, C. A. Stortz. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction method, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* 338:153-165.
- Phuoc L.H., M. Corteel, H.J. Nauwynck, M.B. Pensaert, V. Alday-Sanz, W. Van den Broeck, P. Sorgeloos y P. Bossier. 2008. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Appl Environmental Microbiology.* 10 pp.
- Racotta, I.S. y E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aqua. Soc.* 29: 351-356.
- Re, A. D., F. Díaz, E. Sierra y S. Gómez- Jiménez. 2004. Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas.* 30:443-453.

- Rendón, L. and J.L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *Aquatic*. 19:27-33.
- Riux, L.E., S.L. Turgeon, M. Beaulieu. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. 69:530-537.
- Rivera G., F. Yoong, G. Riofrío, B. Reinoso, F. Hurtado, P. Massuh. 2002. Inclusión de harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para camarón. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>). 2002:244-252.
- Rodríguez, J. y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119.
- Rodríguez, J. 2005. Información sobre el uso de inmunoestimulante en cultivo de camarón con particular referencia a los β -glucanos. *Bol. Inf.* 129. CENAIM. Ecuador.
- Rosas C., Cuzon, G. Gaxiola, G. Y. Le Prior, C. Pascual, J. Rossigniol, F. Contreras, A. Sanchez, A. Van Wormhoudt. 2001b. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259: 1-22.
- Rosas C., C. Pascual, N. López y A. Sánchez. 2002a. Metabólitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Córtex y N. Simoes. (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Q.R., México 54-72 p.
- Rosas, C., Cuzon, G. Taboada, G. Pascual, C. Gaxiola, G. and A. Van Wormhoudt. 2001a. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32:1-20.
- Sánchez A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. y Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198:13-28.
- Scholnick D.A., K. G. Burnett, L. E. Burnett. 2006. Impact of exposure to bacteria on metabolism in the Penaeid shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biol. Bull.* 211:44-49

- Soto-Rodriguez, S. A., 2002. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis de Doctorado en Ciencias. Ensenada, Mexico, 278 pp.
- Soto-Rodriguez, S. A., Roque, A., Lizarraga Partida, M.L., Guerra Flores, A. L., Gomez Gil, B., 2003. Virulence of luminous *Vibrios* to *Artemia franciscana* Kellog, 1906, nauplii. Dis. Aquat. Org. 53:231-240.
- Soto-Rodriguez, S., A.R. Nuno Simoes, B. Gomez-Gil. 2006a. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent *Vibrios*. Aquaculture 258:109-115
- Soto-Rodriguez, S., M. Armenta, B. Gomez-Gil. 2006b. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 255: 48-54.
- Spanopoulos-Hernandez, M., C. A. Martinez-Palacios; R.C. Vanegas-Pérez, C. Rosas, y L.G. Ross 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). Aquaculture 244: 341-348.
- Stein, J. R. 1973. Handbook of physiological methods. Culture methods and growth measurement. Cambridge University Press, New York. 321-343 p.
- Stern, S., A. Borut y D. Cohen. 1984. The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 79A:271-274.
- Yeh, S.T., C. S. Lee, J.C. Chen. 2006. Administration of water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 20:332-345.
- Yoganandhan, K., S. Thirupathi, A. S. S. Hameed. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture 221:1-11.
- Van Ham E.H. and M.R. Hall. 1998. The effects of prophylactic formalin bath treatment on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World Aqua. Soc. 29:357-364.
- Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán y J.L. Ochoa, 1993. An anticoagulant solution for

haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:299-303 p.

Vargas - Cárdenas, M. G. y M. L. Lizárraga - Partida. 1993. Manual de prácticas de laboratorio del curso Bacteriología Marina. CICESE. Ensenada, México. 35 pp.

Wang, L.U and J.C. Chen. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. 18:269-278.

Zar H.J., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. Cuarta Edición. New Jersey. USA. 663 pp.

Zvyagintseva T. N., N. M. Shevchenko, I.B. Popivnich, V.V. Isakov, A. S. Scobun, E. V. Sundukova, L. A. Elyakova. 1999. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydrate Research* 322:32-39.

Zvyagintseva T.N., N. M. Shevchenko, A. O. Chizhov, T. N. Krupnova, E. V. Sundukova, V. V. Isakov. 2003. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern Brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *Journal of Experimental Marine biology and Ecology* 294:1-13.