

TESIS DEFENDIDA POR
Liliana Noemi Sánchez Campos
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Fernando Díaz Herrera
Codirector del Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Codirector del Comité

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Miembro del Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Miembro del Comité

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias de la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

23 de Marzo del 2011.

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Efecto de la inmersión e inyección del extracto de *Macrocystis pyrifera*
sobre las respuestas fisiológicas, metabólicas e inmunológicas en el
camarón blanco *Litopenaeus vannamei* desafiado con *Vibrio campbellii***

TESIS

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

Presenta:

LILIANA NOEMI SÁNCHEZ CAMPOS

Ensenada, Baja California, México, Marzo 2011.

RESUMEN de la tesis de **Liliana Noemi Sánchez Campos**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Marzo 2011.

Efecto de la inmersión e inyección del extracto de *Macrocystis pyrifera* sobre las respuestas fisiológicas, metabólicas e inmunológicas en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* desafiado con *Vibrio campbellii*

Resumen aprobado por:

Dr. Fernando Díaz Herrera

Codirector

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Codirector

Se inmunoestimularon adultos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, de 23-32 g de peso húmedo (p.h.), vía inyección (10 mg) o inmersión (350 mg/l), con un extracto de *Macrocystis pyrifera* y fueron infectados con *Vibrio campbellii* (1×10^6 ufc camarón⁻¹). Los organismos control fueron inyectados con solución salina o *V. campbellii* y otro grupo de organismos, se mantuvo en condiciones normales, y fue utilizado como control de pre-inyección (CPI). Se midió la tasa de consumo de oxígeno y los metabolitos presentes en la hemolinfa (glucosa, lactato y proteínas), de las 2 a las 24 horas post infección (p.i.), se midió la hemocianina, el conteo total de hemocitos (CTH) y se evaluó la tasa de depuración y la actividad antimicrobiana de las muestras de hemolinfa de 270 organismos, de las 2 a las 72 horas p.i.

La infección disminuyó la tasa de consumo de oxígeno, de 46 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h. a 24 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h., en los organismos del grupo control inyectados con *V. campbellii* (P>0.05). Los camarones inmunoestimulados, no disminuyeron su tasa de consumo de oxígeno a ninguna hora p.i., manteniéndola similar a la del CPI (P<0.05).

La concentración de glucosa en la hemolinfa de los organismos del control *V. campbellii* a las 2 horas p.i., fue significativamente más alta (P>0.05), que la del CPI (10 mg dL⁻¹). Los organismos inyectados con el extracto, disminuyeron significativamente sus niveles de glucosa a las 12 horas p.i. (2.3 mg dL⁻¹), pero a las 24 horas p.i. volvió a los niveles normales (P>0.05). Los camarones sumergidos en el extracto, no mostraron ninguna diferencia significativa (P<0.05), en sus niveles de glucosa a lo largo de las 24 horas p.i.

La concentración de lactato del CPI fue de 11.4 mg dL⁻¹, los organismos inyectados con el extracto, tuvieron los niveles más bajos de lactato a lo largo de todo el experimento y los camarones sumergidos en el extracto, disminuyeron significativamente sus niveles a las 6 y 12 horas p.i. (P>0.05), pero a las 24 horas p.i., sus niveles de lactato volvieron a lo normal (9 mg dL⁻¹).

La concentración de proteínas totales del CPI fue de 115.3 mg mL^{-1} , los organismos del control salino, no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), comparados con el CPI, los organismos del control *V. campbellii*, tuvieron los valores más bajos ($P > 0.05$), durante todo el experimento y los organismos inmunoestimulados con el extracto, presentaron los valores más altos de proteínas totales en hemolinfa a las 24 horas p.i. ($P > 0.05$).

La concentración de hemocianina en los camarones del CPI fue de 1 mmol L^{-1} , los organismos del control salino, no mostraron diferencias significativas respecto al CPI ($P < 0.05$) hasta las 24 horas p.i., pero el control *V. campbellii* si mostró diferencias significativas respecto al CPI a las 2, 6, 48 y 72 horas p.i. y los camarones inmunoestimulados con el extracto, tuvieron diferencias significativas durante las 72 horas p.i. ($P > 0.05$).

Los camarones inmunoestimulados mediante inyección o inmersión, tuvieron un CTH similar, a las 24 horas p.i. (1.63 y 1.59 millones mL^{-1} , respectivamente), pero a las 72 horas p.i. los camarones inyectados con el extracto presentaron el mayor CTH, comparados con los organismos sumergidos en el extracto (2.59 y 0.56 millones mL^{-1} , respectivamente).

Para analizar la tasa de depuración, se extrajo el DNA bacteriano, se amplificó por PCR y se cargó en geles de agarosa al 2%. La hemolinfa de los camarones inyectados con el extracto de *M. pyrifera* (10 mg), fue eficiente para eliminar la bacteria, ya que el 82% de los camarones, sobrevivió después de las 72 horas p.i., por lo que su respuesta celular fue mejor.

Para probar la actividad antimicrobiana de la hemolinfa de los camarones, se utilizó *E. coli* ($1 \times 10^7 \text{ ufc mL}^{-1}$) y las proteínas de la hemolinfa se ajustaron a 1.25 mg mL^{-1} . La hemolinfa de los camarones sumergidos en el extracto, a las 24 horas p.i., fue estadísticamente más efectiva para inhibir el crecimiento de *E. coli*, que las muestras de hemolinfa de las demás horas, de ambos tratamientos de inmunoestimulación, pero, los organismos sumergidos en el extracto, presentaron la menor sobrevivencia (17%).

Se concluye que, la administración del extracto de *M. pyrifera*, vía inyección e inmersión, en adultos el camarón blanco, puede ser utilizado para propósitos de inmunoestimulación, pero en términos de sobrevivencia, los camarones estimulados vía inyección, resistieron más eficientemente la infección bacteriana, debido a que la capacidad fagocítica de sus hemocitos, estimulada por el extracto, fue mayor. En otras palabras, la respuesta celular de los camarones, es más eficiente que la respuesta humoral, para eliminar una infección bacteriana.

Palabras Clave: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio campbellii*, *Macrocystis pyrifera*, inmunoestimulación, consumo de oxígeno, metabolitos, CTH, tasa de depuración, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT of the thesis presented by **Liliana Noemi Sánchez Campos** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México, March 2011.

Effect of immersion and injection of *Macrocystis pyrifera* extract on physiologic, metabolic and immune responses in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio campbellii*

Adults white shrimps (*Litopenaeus vannamei*), ranging from 23-32 g were immune stimulated via injection (10 mg) or immersion (350 mg/l) with a *Macrocystis pyrifera* extract and infected with *Vibrio campbellii* (1×10^6 cfu shrimp⁻¹). Control shrimp were only injected with saline solution or *Vibrio campbellii* and other control group of shrimps at normal conditions, was used as pre-injection control group (PIC). Oxygen consumption rate and hemolymph metabolites (glucose, lactate and proteins), were measured from 2 to 24 hours post infection (p.i.), hemocyanin, bacterial clearance rate, antimicrobial activity and total hemocyte count (THC), were evaluated from 2 to 72 hours p.i. in 270 organisms.

Infection decreased the oxygen consumption rate from 46 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ wet weight (w.w.), to 24 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ w.w., in the *V. campbellii* control group. Immunostimulated shrimps did not decrease their oxygen consumption rate at any hour p.i., maintaining it similar to PIC group. Glucose level in the hemolymph of organisms from *V. campbellii* control group at 2 hours p.i., was significantly higher ($P > 0.05$), than the level of the PIC group (10 mg dL⁻¹). Organisms injected with the extract, showed a significant decrease ($P > 0.05$) in their glucose level at 12 hours p.i., (2.3 mg dL⁻¹), but at 24 hours p.i. it returned to normal level. Shrimps submerged in the extract, showed no significant difference ($P < 0.05$) in glucose at any hour p.i. Lactate concentration of the PIC group was 11.4 mg dL⁻¹, organisms injected with the extract, had the lowest lactate levels throughout the experiment. Shrimps submerged in the extract, decreased significantly their lactate levels at 6 and 12 hours p.i. ($P > 0.05$), but at 24 hours p.i., returned to the normal level, (9.0 mg dL⁻¹). The total protein concentration of the PIC group was 115.3 mg mL⁻¹, shrimps from saline control group, showed no significant differences ($P < 0.05$), compared to the PIC group, organisms from *V. campbellii* control group, had the lowest values of total proteins during all the experiment and immunostimulated organisms, increased their total proteins levels at 24 hours p.i. ($P > 0.05$).

Hemocyanin concentration in the PIC group was 1 mmol L⁻¹, shrimps from saline control group, showed no significant differences with de PIC control group ($P < 0.05$), during the first 24 hours p.i., but the *V. campbellii* control group, showed significant differences with the PIC group at 2, 6, 48 and 72 hours p.i., and shrimps injected and submerged in the extract, had significant differences during the 72 hours p.i. ($P > 0.05$).

Immunestimulated shrimps via injection and immersion, had similar THC at 24 hours post infection (1.63 and 1.59 million/ml, respectively), but after 72 hours, injected shrimps had higher THC, compared with immersed organisms (2.59 and 0.56 million/ml, respectively).

Bacterial DNA was extracted, amplified by PCR and loaded in 2% agarose gels for the clearance rate analysis. Hemolymph of shrimps injected with 10 mg *M. pyrifera* extract, was more efficient to clear *V. campbellii*, 82% survived after 72 hours p.i., so, its cellular response, was more effective.

Hemolymph antimicrobial activity was tested using *E. coli* (1×10^7 cfu mL⁻¹), hemolymph proteins (adjusted to 1.25 mg/ml), from immersed shrimps at 24 hours p.i., were statistically more effective to inhibit *E. coli* growth, than at any other hour of both treatments (humoral response), but immersed shrimps had the lowest survival (17%).

We conclude that the *M. pyrifera* hot-water extract via injection and immersion can be used for immunestimulation proposes in adult white shrimps, but in terms of survival, the immunestimulated shrimps via injection resist more efficiently the bacterial infection due to the higher phagocytic capacity of their hemocytes which was stimulated by the hot-water extract. In another words, cellular immune response is more efficient to eliminate bacteria infection, than the humoral response in shrimps.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio campbellii*, *Macrocystis pyrifera*, immunestimulation, oxygen consumption, metabolites, THC, clearance rate, antimicrobial activity.

Dedicatorias

A la memoria de **Álvaro Sánchez y Jiménez**, mi Papá, por todo lo que significas en mi vida, porque, aunque un día sin aviso ni despedida, te fuiste, sé que me acompañas, pues del aire eras y en el aire estás... siempre te llevaré muy cerca de mí.

A mi Mamá **Isabel** y mi hermana **Sara**, por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de estos años, porque sé que aunque vivimos lejos, nos mantenemos unidas de corazón, juntas hemos vivido lo mejor y sobrevivido lo peor, sonrían, que la vida es HOY.

A **Ricardo**, porque no me alcanzan las palabras para describir todos los años que hemos compartido y lo que hemos vivido desde que salimos de nuestras casas, por su constante e incondicional apoyo, amor y motivación, por estar hoy y siempre, aquí, conmigo.

A TODOS USTEDES **GRACIAS**, INFINITAS GRACIAS POR SER PARTE DE MI,
LOS ADORO.

Agradecimientos

Al **CONACYT**, por la beca que me otorgó, este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo.

Al **CICESE**, por abrirme las puertas de su posgrado e instalaciones a lo largo de este trabajo.

Muy especialmente a mis Directores, **Fernando** y **Alexei**, porque además del constante apoyo profesional, me brindaron su amistad y demostraron su gran calidad humana cuando más lo necesité.

A los miembros de mi comité, **Denisse**, **Leo** y **Eugenio**, por su interés y valiosas aportaciones a este trabajo.

A todos los de la **DEP**, en especial, a **Dolores**, **Ivonne**, **Citlali**, **Normita** y **David**, siempre he recibido lo mejor de ustedes.

A **Maximiliano** López Frisbie, **Lorenzo** M. Juárez, **Alejandro** Flores Tom y a las granjas camarónicas “La Gloria”, en Tepic, Nayarit, “SyAqua”, en Mazatlán, Sinaloa y “Acualarvas” en Huatabampo, Sonora, por su apoyo para la obtención de los camarones blancos utilizados en este trabajo.

A **Lupita** Vargas, por todo el apoyo que amablemente me brindó en el laboratorio de Ecología Molecular, a **Francisco** Javier Ponce y **José** M. Domínguez, por su paciencia, amabilidad y apoyo con las figuras de este trabajo.

Al Departamento de **Microbiología**, por permitirme liofilizar en sus instalaciones.

A **Maricela** Flores Ibarra y **Caroline** Tordoya Romero, por su apoyo para la realización de la fase experimental.

A mis amigos (ellos y ellas), especialmente a **Hanna** y **Mildred**.

A todos aquellos que, seguramente, estoy olvidando, pero que fueron una parte importante para este trabajo.

¡GRACIAS!

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
I. Introducción.....	1
II. Hipótesis.....	9
III. Objetivos.....	10
III.1 Objetivo General.....	10
III.2 Objetivos Particulares.....	10
IV. Materiales y Métodos.....	11
V. Resultados.....	18
VI. Discusión.....	32
VII. Conclusiones.....	40
Referencias.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Consumo de oxígeno de los organismos del control salino durante 24 horas.....	18
2	Consumo de oxígeno de los organismos del control <i>V. campbellii</i> durante 24 horas.....	19
3	Consumo de oxígeno de los organismos inyectados con el extracto de <i>M. pyrifera</i> durante 24 horas.....	20
4	Consumo de oxígeno de los organismos sumergidos en el extracto de <i>M. pyrifera</i> e infectados con <i>V. campbellii</i> , durante 24 horas	21
5	Concentración de glucosa en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales hasta las 24 horas.....	22
6	Concentración de lactato en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 24 horas.....	24
7	Concentración de proteínas totales presentes en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 24 horas.....	25
8	Concentración de hemocianina en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 72 horas.....	27
9	CTH presentes en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales hasta las 72 horas.....	28
10	Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración bacteriana de los organismos del control <i>V. campbellii</i> , hasta las 72 horas.....	29

LISTA DE FIGURAS (continuación)

11	Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración de <i>V. campbellii</i> , en los organismos inyectados con el extracto de <i>M. pyrifera</i> , hasta las 72 horas.....	29
12	Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración de <i>V. campbellii</i> , en los organismos sumergidos en el extracto de <i>M. pyrifera</i> , hasta las 72 horas.....	30
13	Actividad antimicrobiana de las proteínas de la hemolinfa de los camarones sumergidos en el extracto de <i>M. pyrifera</i> , hasta las 72 horas.....	31

I. Introducción

El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico, desde el Golfo de California (Bahía Yavaros, Sonora) hasta el norte de Perú (Caleta La Cruz), su distribución batimétrica abarca de los 5 a los 72 metros de profundidad (Michel, 2002).

Actualmente es el peneido que más se cultiva a nivel mundial, sin embargo, a pesar de ser el recurso acuático más redituable en Latinoamérica, su cultivo ha pasado a segundo lugar en los últimos años, debido a las pérdidas en la producción que ocasionan enfermedades causadas por virus y bacterias (FAO, 2008). Es por ello que, diferentes investigadores (Berger, 2000; Rendón y Balcázar, 2003), puntualizan que la sustentabilidad del cultivo de camarón, depende en gran medida de la prevención y el control de enfermedades, ya que a pesar de su alta tasa de crecimiento, las pérdidas por causa de virus y bacterias que afectan a los organismos cultivados son altas.

Aproximadamente entre un 80 y 90% de las bacterias aisladas de cultivos de peneidos con mortalidades masivas, corresponden al género *Vibrio*, quien generalmente, se comporta como un patógeno oportunista que se beneficia de las condiciones del ambiente que afecta al organismo hospedero, como los cambios climáticos, la densidad de la población, las deficiencias nutricionales y la calidad del agua. Diferentes especies de vibrios afectan a los peneidos en condiciones de cultivo, las principales especies patógenas son *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*, quienes son responsables de las denominadas “vibriosis”, cuyos principales signos en los camarones son: región torácica blanquecina, aletargamiento, nado errático, pérdida del apetito, inflamación del intestino y necrosis de los apéndices (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Leño *et al.*, 1998).

La inmunoestimulación, es actualmente una de las opciones más viables para aumentar la resistencia de los camarones a enfermedades en condiciones de cultivo (Berger, 2000; Vargas-Albores, 2002; Rendón y Balcázar, 2003; Smith, *et al.*, 2003). Los inmunoestimulantes son extraídos de las paredes celulares de bacterias Gram negativas que contienen lipopolisacáridos, bacterias Gram positivas con peptidoglicanos, así como de hongos, levaduras y algas con β -glucanos; su función es simular una agresión microbiana que active el sistema de defensa celular y humoral de los crustáceos (Rendón, *et al.*, 2004). Desde este punto de vista, el sistema de defensa del camarón constituye un factor de importancia radical, ya que al igual que el de otros invertebrados, no tiene especificidad ni memoria inmunológica, debido a la ausencia de inmunoglobulinas y células linfoides, es por esto que, a diferencia de los vertebrados no se pueden utilizar vacunas y se recurre a la inmunoestimulación (Vargas-Albores *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000; Montaña-Pérez *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006).

Cheng *et al.* (2004), estudiaron en *L. vannamei* el efecto de la inyección del alginato de sodio y concluyeron que aumentó su sobrevivencia al ser infectado con *Vibrio alginolyticus*, así como su capacidad inmune, es decir, aumentó el conteo total de hemocitos (CTH), la actividad de la enzima fenoloxidasa (PO), el estallido respiratorio y la tasa de depuración. Cheng *et al.* (2005), mencionan que la administración del alginato de sodio en la dieta de *L. vannamei*, aumentó su capacidad inmune e incrementó su resistencia a la infección con *V. alginolyticus*. Campa-Córdova *et al.* (2005), concluyeron que la inmersión de *L. vannamei* en β -glucanos, lipopolisacáridos y fucoidán, aumentó la capacidad inmune de los organismos y les permitió resistir la infección de *V. penaeicida*. Yeh *et al.* (2006), utilizaron la inmersión e inyección de extractos de *Sargassum duplicatum* en *L. vannamei* y concluyeron que dicho extracto aumentó su resistencia inmune, al ser expuesto a *V. alginolyticus*. Sung *et al.* (1994), demostraron que la inmersión e

inyección de un β -glucano extraído de la levadura, aumentó la resistencia de *P. monodon* a la vibriosis y a la infección por virus de la mancha blanca (WSSV).

Se han llevado a cabo estudios de inmunoestimulación, mediante el uso de extractos de algas y plantas en *L. vannamei* infectado con *V. alginolyticus*, en los cuales, se obtuvo un incremento en la respuesta inmune y en la resistencia a la infección experimental; entre ellos destacan los realizados por: Hou y Chen (2005), que utilizaron la inyección del extracto de *Gracilaria tenuistipitata*, Yeh *et al.* (2006), con inyección e inmersión en el extracto de *Sargassum duplicatum*, Fu *et al.* (2007), con inyección, inmersión e inclusión en la dieta del extracto de *Gelidium amansii*, Hsieh *et al.* (2008), con inyección del extracto de *Toona sinensis* y por último Yeh y Chen (2009), con inmersión en el extracto de *Gracilaria tenuistipitata*.

Con el fin de evaluar el efecto de las condiciones ambientales en camarones silvestres y cultivados, se han propuesto variables que se consideran indicadoras del estado de salud fisiológica, nutricional e inmunológica de *L. vannamei* y *L. setiferus*, entre las cuales se encuentran, la cuantificación de metabolitos en la hemolinfa (glucosa, lactato, proteínas y hemocianina), así como del CTH. (Racotta y Palacios 1998, Rosas *et al.* 2001; 2002, Sánchez *et al.* 2001 y Pascual *et al.* 2003; 2004). Estas variables se han propuesto debido a que reflejan el proceso de respuesta al estrés, pues el metabolismo de un organismo, se modifica al tratar de contrarrestar el efecto del estresor.

Se ha mencionado por Yoganandhan *et al.* (2003), que generalmente, el nivel de glucosa en la hemolinfa, aumenta cuando los camarones están infectados y disminuye en el músculo y el hepatopáncreas, en comparación con camarones saludables; lo anterior, debido a que el organismo intenta contrarrestar la infección, para lo cual utiliza más energía.

Hall y van Ham (1998), reportaron que varios agentes estresores, provocaron un aumento significativo en la concentración de glucosa presente en la hemolinfa de *P. monodon* y mencionan que la medición de la concentración de glucosa, puede utilizarse como indicador de estrés biológico para camarones, ya que es simple y confiable.

El lactato se usa como indicador de estrés en organismos acuáticos, debido a que es el producto final del metabolismo anaeróbico. Cuando los camarones están bajo la influencia de un estresor, utilizan carbohidratos como fuente de energía y se produce lactato, que entra al ciclo del ácido carboxílico y la fosforilación oxidativa; es por esto que bajo condiciones de estrés, la concentración de lactato es mayor que la capacidad de oxidación del lactato y se acumula en el músculo, lo que indica que el metabolismo anaeróbico fue mayor que el aeróbico y, para evitar que los músculos se dañen con la acumulación de cristales de lactato, se almacenan en la hemolinfa. Una vez que el estrés se reduce, el lactato es transportado al músculo, donde se metaboliza, por lo que su concentración en la hemolinfa baja (Paterson, 1993; Sánchez *et al.*, 2001).

Se han estudiado las respuestas metabólicas (glucosa, lactato, proteínas totales, colesterol, triacilglicéridos, lípidos y hemocianina) e inmunes (CTH y estallido respiratorio), de juveniles de camarón blanco, expuestos a estrés sucesivo por manejo diario, en dos condiciones de cultivo (interior y al aire libre) (Mercier *et al.*, 2006). Los mismos autores mencionan que, las variables metabólicas, como la glucosa y el lactato, han sido utilizadas como indicadores de estrés en diferentes especies de crustáceos y que, variables como la hemocianina, proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos y colesterol, pueden ser usados también para evaluar la condición fisiológica de los camarones bajo diferentes condiciones de cultivo.

Las variables metabólicas de la hemolinfa (glucosa, lactato, proteínas, colesterol, triacilglicéridos y la capacidad osmorreguladora), así como las respuestas hematológicas (CTH y actividad de la PO), de machos adultos de *L. setiferus* aclimatados a dos temperaturas, han sido utilizadas como indicadores de estrés; también los metabolitos presentes en la hemolinfa pueden utilizarse como índices del estado nutricional, debido a que la hemolinfa, junto con el músculo y la glándula digestiva, son tejidos de reserva (Sánchez *et al.*, 2001).

La hemocianina es la proteína que se encarga del transporte del oxígeno y CO₂ en la hemolinfa, constituye el 60 al 95% de las proteínas totales del plasma. Pascual *et al.* (2004), mencionan que la hemocianina es una proteína multifuncional, que puede ser utilizada como proteína de reserva, transportador de oxígeno, de carotenoides y como osmolito. Además, existen estudios que reportan que se generan péptidos antimicrobianos (PAMs), a partir de la región C-terminal de ésta proteína (Destoumieux *et al.*, 2001).

La medición del consumo de oxígeno en los animales acuáticos, es un método válido para evaluar el efecto de factores ambientales como la temperatura, la salinidad, la exposición a contaminantes, intensidad luminosa y oxígeno disuelto, así como para determinar los costos energéticos, asociados con el estrés fisiológico que esas combinaciones le imponen al organismo (Lemos *et al.*, 2001; Altinok y Grizzle, 2003).

Las branquias de los crustáceos no sólo intervienen en el intercambio de gases y en la regulación de iones, sino que también contribuyen con el sistema de defensa, pues se sabe que son el principal sitio de eliminación de partículas extrañas, como pueden ser las bacterias, las cuales, una vez que son removidas de la hemolinfa, se acumulan y eventualmente se encapsulan en las branquias (Martin *et al.*, 2000).

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica, por lo que, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo el material extraño de sus tejidos (Vargas-Albores *et al.*, 1996). La primer línea de defensa en los crustáceos es la cutícula, la cual constituye una barrera física y biológicamente activa, a la cual se asocia la actividad microbicida y de la enzima PO (Maldonado *et al.*, 2004).

El sistema de defensa de los crustáceos, está basado en efectores celulares y humorales que se conjugan para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. La hemolinfa es un análogo a la sangre y la linfa de los vertebrados, constituye la respuesta humoral; en ella circulan moléculas importantes como la hemocianina, inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento y varias lipoproteínas, entre ellas, el factor de coagulación y la proteína fijadora de β -glucano. Los hemocitos constituyen la fracción celular de la hemolinfa, son análogos a los glóbulos blancos y se encargan de eliminar partículas extrañas o células viejas por medio de fagocitosis (Maldonado *et al.*, 2004).

En los peneidos se utiliza el CTH presentes en la hemolinfa, por ser considerados las células de mayor importancia en su sistema de defensa, ya que se encargan principalmente de la fagocitosis, encapsulación y lisis de las partículas ajenas. Participan en la cicatrización de heridas por medio de la agregación celular, inician el proceso de coagulación, liberando los factores necesarios para la solidificación del plasma, transportan y liberan el sistema enzimático de la proPO, además, están involucrados en la síntesis y descarga en la hemolinfa de moléculas importantes, como los PAMs. El CTH en crustáceos puede variar como respuesta a infecciones, estrés ambiental y actividad endócrina durante el ciclo de muda (Le Moullac y Haffner, 2000; Rodríguez y Le Moullac, 2000; Rendón y Balcázar, 2003).

Los hemocitos de los crustáceos se diferencian en tres tipos: hialinos, semigranulares y granulares (Le Moullac y Haffner, 2000; Rodríguez y Le Moullac,

2000; Rendón y Balcázar, 2003; Wang y Chen, 2005). Los hemocitos hialinos no contienen gránulos densos, son capaces de fagocitar e intervienen en la coagulación. Los semigranulares contienen muchos gránulos pequeños y redondos, en los camarones intervienen en la fagocitosis, encapsulación y liberación del sistema enzimático de la proPO, además sintetizan y liberan PAMs. Los hemocitos granulosos contienen gránulos de gran tamaño y almacenan mayor cantidad de enzimas del sistema proPO comparados con los semigranulares, también sintetizan y almacenan PAMs e intervienen en el mecanismo de encapsulación (Rendón y Balcázar, 2003).

En la inmunidad innata de los organismos acuáticos, participan moléculas que son las primeras que reconocen e intentan destruir las partículas extrañas y que muestran especificidad hacia componentes de la pared celular microbiana, como lipopolisacáridos de bacterias Gram-, β -glucanos de levaduras y RNA viral; aunque el espectro parece reducido, es lo suficientemente eficiente para reconocer la mayoría de los microorganismos. Estas moléculas, han sido detectadas en todos los animales, tanto en vertebrados como en invertebrados. Mientras los vertebrados tienen el sistema de complemento, los invertebrados cuentan con el sistema de activación de la proPO, el cual se puede considerar un sistema análogo (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002).

Uno de los elementos de la inmunidad innata, que tiene un papel crucial para combatir las infecciones, son los PAMs, que se caracterizan por tener bajo peso molecular (menores de 10kDa), por ser codificados en el genoma y porque penetran la membrana plasmática microbiana, se conocen también como defensinas. Se han detectado PAMs en muchos invertebrados marinos, en crustáceos, destacan los estudios de PAMs del cangrejo de arena *Carcinus maenas*, del camarón blanco *L. vannamei* y del mejillón *Mytillus edulis* (Montaño-Pérez y Vargas-Albores, 2002).

Los principales componentes de las alga cafés son los polisacáridos, cuya concentración varía del 40 al 80%, según la especie. El laminaran, que a su vez está compuesto de β -glucanos, es el principal polisacárido de reserva de estas algas, le siguen los alginatos y en menor proporción, el fucoidán (Zvyagintseva *et al.*, 2005; Rioux *et al.*, 2007). Estos compuestos tienen diversas aplicaciones biológicas, en el caso del laminaran, tiene propiedades anticancerígenas, funciona como crio-protector y activa el sistema inmune, los alginatos se consideran también activadores del sistema inmune en peces y crustáceos y, por último, el fucoidán, tiene propiedades antineoplásicas, anticoagulantes y antivirales (HIV, Herpes y Hepatitis) (Zvyagintseva *et al.*, 2005).

Macrocystis pyrifera es una alga café, del orden Laminariales, comúnmente llamada “kelp” o “sargazo gigante”, que crece en zonas de sustratos rocosos cercanas a las costas, a profundidades no mayores de 40 metros, en aguas templadas o frías, claras y ricas en nutrientes. Se localiza en las costas de América del norte y del sur, Australia, sur de África, Nueva Zelanda, Noruega, Escocia, Japón y Corea (Cruz-Suárez *et al.*, 2000). Es una de las algas marinas cafés que son explotadas comercialmente como fuente de alginatos. En México, su distribución se extiende desde la frontera con los Estados Unidos de América, hasta Punta San Hipólito, Baja California Sur. La biomasa cosechable estimada (1 m debajo de la superficie marina), varía estacionalmente de 36,520 toneladas en invierno, a 99,626 toneladas en verano (Reyes-Tisnado *et al.*, 2004).

Vibrio campbellii es un bacilo recto, Gram negativo, que pertenece a la clase de las Gammaproteobacterias. Se caracteriza por tener flagelo polar y varios flagelos laterales que le dan movilidad cuando se encuentra en medio sólido, crece hasta a los 35°C, el sodio estimula su crecimiento (2-3% de NaCl), fermenta glucosa y no es luminiscente (Krieg y Holt 1984; Holt *et al.*, 1994). Se considera un patógeno importante para organismos acuáticos, especialmente para los crustáceos (Thompson *et al.*, 2004; Gomez-Gil *et al.*, 2004; Scholnick *et al.*, 2006).

II. Hipótesis

Después de sumergir ó inyectar a los adultos de *Litopenaeus vannamei* con el extracto de *Macrocystis pyrifera*, el camarón blanco optimizará sus repuestas fisiológicas, metabólicas y de su sistema de defensa, lo que mejorará su capacidad de respuesta al desafiarlo con *Vibrio campbellii*.

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del extracto de *Macrocystis pyrifera* administrado por inmersión ó inyección en adultos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y determinar la modificación de los parámetros fisiológicos, metabólicos e inmunológicos al desafiarlos con *Vibrio campbellii*.

III.2 Objetivos particulares:

- Cuantificar la tasa de consumo de oxígeno de los camarones sumergidos ó inyectados con el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*.
- Determinar la modificación de los parámetros metabólicos (glucosa, lactato y proteínas totales) en adultos de *L. vannamei* sumergidos ó inyectados con el extracto de *M. pyrifera* después de haber sido desafiados con *V. campbellii*.
- Evaluar el CTH, la hemocianina, la actividad antimicrobiana y la tasa de depuración en la hemolinfa de los camarones sumergidos ó inyectados con el extracto de *Macrocystis pyrifera* e inoculados con *V. campbellii*.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Preparación del extracto de *Macrocystis pyrifera*

Se recolectaron láminas de *M. pyrifera* en La Misión, B.C., México, durante el verano del 2007 y se preparó un extracto del alga con base en la metodología descrita por Yeh *et al.* (2006). Brevemente, las láminas seleccionadas fueron lavadas, deshidratadas en un invernadero y molidas. Se tomaron 10 g de las láminas molidas y se hirvieron en 300 mL de agua desionizada durante 3 horas, posteriormente, la suspensión se filtró y liofilizó.

IV.2 Obtención y mantenimiento de *L. vannamei*

Se obtuvieron organismos adultos de *Litopenaeus vannamei* de 23-32 g de p.h., que fueron donados por la granja La Gloria (Nayarit, México). Se mantuvieron durante 2 meses en estanques de 2000 L, con recambio continuo de agua de mar (35‰) y aireación constante, a una temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, que fue la temperatura preferida, determinada para este estadio de desarrollo, por González-Sánchez *et al.* (2010). Se les proporcionó alimento a saciedad marca Rangen, con 40% de proteína. En total, se utilizaron 270 camarones adultos, que fueron seleccionados al azar antes de cada experimento.

IV.3 Cultivo de *Vibrio campbellii*

Se utilizó la cepa de *V. campbellii* (CICESE 559; CAIM 416), que fue aislada por Giffard (1999), del agua superficial del estanque de abastecimiento de reproductores, en una granja camaronícola en Sonora, México. Anteriormente, dicha cepa se identificó como *V. harveyi*, aunque estudios moleculares posteriores (Gómez-Gil *et al.*, 2004), comprobaron que se trataba de *V. campbellii*. Esta cepa es patógena en nauplios de *Artemia franciscana* y larvas de *L. vannamei* (Soto-Rodríguez, 2002; Soto-Rodríguez *et al.*, 2003; 2006).

La cepa se cultivó en medio Zobell a 28°C durante 18 horas, después se cosechó y resuspendió en solución salina (NaCl 9‰), hasta que se obtuvo una concentración de 1×10^7 ufc/mL (D.O.= 0.9 a 600 nm). Para confirmar la densidad bacteriana, la suspensión se diluyó en serie con solución salina estéril y se sembraron 0.1 mL de cada dilución, por duplicado, en cajas Petri, con medio TCBS, selectivo para *Vibrio* sp. Las cajas se incubaron a 28°C durante 18 horas y posteriormente, se contaron las ufc de cada caja (Soto-Rodríguez *et al.*, 2003).

IV.4 Determinación de la dosis letal media de *V. campbellii* en *L. vannamei*

Se revisó la bibliografía existente sobre las concentraciones inyectadas de *V. alginolyticus* y *V. campbellii* en *L. vannamei*, se calculó la dosis letal media (DL50) y posteriormente, se comprobó en un experimento en el que se inyectó *V. campbellii* a 60 juveniles de *L. vannamei*, mediante el cual, se determinó que la DL50 para camarones infectados con la cepa de *V. campbellii*, utilizada en este trabajo, fue de 1×10^6 ufc camarón⁻¹, a las 72 horas.

IV.5 Consumo de oxígeno de *L. vannamei*

Para cuantificar el consumo de oxígeno de los camarones, se utilizó un respirómetro semiabierto con 21 cámaras de 2800 mL cada una, conectado a un sistema como el descrito por Díaz *et al.*, (2007). Se colocaron de forma individual 20 camarones dentro de los 20 matraces de 2800 mL y se dejó una cámara respirométrica sin organismo, para medir el consumo de oxígeno de los microorganismos presentes en el agua. La temperatura del agua de todo el sistema fue mantenida a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

La concentración del oxígeno disuelto, fue medida mediante un oxímetro YSI 52 B, provisto de un sensor polarográfico, el cual se conectó a una cámara cerrada por medio de un sistema de mangueras, para evitar que la muestra de agua tuviera contacto directo con el aire. Antes de cerrar las cámaras, se tomó una muestra de agua para cuantificar la concentración inicial de oxígeno.

Las cámaras respirométricas permanecieron cerradas durante 1 hora, ya que de acuerdo a Stern *et al.* (1984), es el tiempo adecuado para que el oxígeno disuelto no disminuya por debajo del 30% de saturación y no cause estrés en los organismos.

IV.6 Inyección del extracto de *M. pyrifera* en *L. vannamei*

Se tomaron 6 mg del extracto liofilizado, que se disolvieron en 6 mL de solución salina y se inyectaron 60 camarones blancos adultos, en el músculo abdominal, con una concentración de $10 \mu\text{g g}^{-1}$. 24 horas después, se inyectó una concentración de 1×10^6 ufc camarón⁻¹ de *V. campbellii* a cada uno de los organismos, 20 de los cuales, fueron colocados individualmente en cada cámara respirométrica, 2 horas antes de iniciar las mediciones del consumo de oxígeno, que se realizaron a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas post infección (p.i.)

IV.7 Inmersión de *L. vannamei* en el extracto de *M. pyrifera*

Para preparar la solución en la que se sumergió a los camarones, se usaron 3.5 g del extracto liofilizado de *M. pyrifera*, que se disolvieron en 10 L de agua de mar, para obtener una concentración final de 350 mg L^{-1} . Se mantuvieron sumergidos 60 adultos de *L. vannamei* durante 3 horas, en acuarios que contenían el extracto a dicha concentración y se mantuvieron con aireación constante. Todos los camarones se inyectaron con una concentración de 1×10^6 ufc camarón⁻¹ de *V. campbellii* y posteriormente, se utilizaron 20 organismos que fueron colocados individualmente, en cada cámara respirométrica, 2 horas antes de iniciar las mediciones del consumo de oxígeno, que se realizaron a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas p.i.

IV.8 Controles experimentales

Se utilizaron 150 camarones como controles, de los cuales, 60 fueron inyectados únicamente con 100 μL de solución salina, a este grupo se le identificó

como “control salino”. Otros 60 organismos fueron inyectados únicamente con 100 μL de la suspensión bacteriana de *V. campbellii* (1×10^6 ufc camarón⁻¹), este grupo fue identificado como “control *V. campbellii*”. A estos 2 grupos control, se les midió el consumo de oxígeno, en las mismas horas y de la misma forma que en los experimentos anteriormente descritos (inyección e inmersión en el extracto de *M. pyrifera*).

Los 30 organismos restantes, se utilizaron como control de pre-inyección (CPI), ya que dichos organismos, no fueron sometidos a ningún tratamiento con el extracto de *M. pyrifera*, ni tampoco fueron inyectados con solución salina o infectados con la bacteria. A este grupo, también se le midió el consumo de oxígeno y se realizó una repetición de dicho experimento.

IV.9 Extracción de hemolinfa

Se extrajo la hemolinfa de 8 camarones de cada condición experimental a las 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post tratamiento (también de los grupos control), mediante una jeringa hipodérmica de 1 mL, cargada previamente con la solución anticoagulante fría (4°C). La aguja se insertó en la base del quinto par de pereiópodos de los organismos. Se extrajeron 200 μL de hemolinfa de cada camarón, diluidos con 400 μL del anticoagulante, es decir, en relación 2:1 (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

IV.10 Cuantificación de metabolitos

Todas las muestras se centrifugaron a 800 g por 3 minutos, a 4°C y el sobrenadante, fue separado para la cuantificación de cada metabolito, por medio de kits comerciales (marca Pointe Scientific Inc). Las muestras de glucosa se leyeron a 520 nm, las de lactato a 546 nm y las de proteínas a 540 nm, en un espectrofotómetro marca Hach, finalmente, la concentración de cada metabolito fue calculada de la concentración de sus respectivos estándares.

IV.11 Cuantificación de hemocianina

Se tomaron muestras de 10 μ L de hemolinfa sin anticoagulante, de los organismos provenientes de cada condición experimental a las 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas p.i., cada una de las muestras fue diluida inmediatamente con 990 μ L de agua destilada en una cubeta para espectrofotómetro y posteriormente, se leyeron a 335 nm. La concentración de Hc se determinó utilizando un coeficiente de extinción de $\epsilon = 17.26$, calculado en base a una sub-unidad de 74000 Da para crustáceos (Hagerman, 1986; Chen y Cheng, 1993).

IV.12 Conteo total de hemocitos

Para el CTH presentes en las muestras de hemolinfa, tomadas a las 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas p.i., se utilizó una cámara NeuBauer de 0.100 mm de profundidad, donde fueron colocados 10 μ L de la mezcla de anticoagulante-hemolinfa y posteriormente, el conteo se llevó a cabo mediante un microscopio de contraste de fases, marca Zeiss, a 10x.

IV.13 Desinfección de estanques y material

Una vez que finalizaron todos los experimentos, se desinfectó el respirómetro completo, los estanques y el material de laboratorio utilizado, con cloro al 1%. 48 horas después, se tomaron muestras de agua de todos los estanques y se filtraron 100 mL, 10 mL y 0.1 mL, con una membrana de 45 μ m, cada membrana se colocó en una caja Petri con medio TCBS y se incubó a 28°C durante 18 horas, para confirmar que estaban completamente libres de *V. campbellii*.

IV.14 Extracción del DNA bacteriano

Para poder analizar la tasa de depuración de los camarones infectados con *V. campbellii*, se extrajo el DNA bacteriano de cada una de las muestras de hemolinfa mezclada con anticoagulante, mediante choque térmico, para lo cual, se centrifugó cada muestra a 12000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón celular que quedó en la pared del tubo fue resuspendido

en 100 µL de agua destilada. Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 80°C durante 5 minutos y congelados a -80°C durante 5 minutos, dicho proceso se repitió 5 veces, finalmente, las muestras se volvieron a centrifugar a 12000 rpm durante 15 min y se tomó el sobrenadante, en el cual se encontraba el DNA.

IV.15 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el DNA bacteriano

Se utilizó el programa MacVector, para diseñar oligonucleótidos que amplificaran el DNA de *V. campbellii* y se probó su especificidad con diferentes cepas de vibrios luminiscentes, de la colección del laboratorio de Ecología Molecular del CICESE, que está a cargo del Dr. Leonardo Lizárraga, sin embargo, aunque amplificaron el DNA de *V. campbellii*, no resultaron específicos. El par de oligonucleótidos diseñados fueron:

Fwd 5'- TCGGCGAAATCTGGCACAAC -3'

Bwd 5'- GCGTGAAATACTCTGACGGCAG -3'

IV.16 Amplificación del DNA bacteriano

El DNA de *V. campbellii* extraído de cada muestra, fue amplificado mediante reacciones de PCR, utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, la extensión final fue a 72°C, durante 7 minutos.

IV.17 Geles de agarosa para el análisis de la tasa de depuración bacteriana

Para la detección de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, para ser visualizados y fotografiados bajo luz UV, mediante este procedimiento, se analizó la tasa de depuración de todos los organismos que fueron infectados con la bacteria, es decir, los del control *V. campbellii* y los inyectados o sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*.

IV.18 Actividad antimicrobiana de las muestras

Para determinar si las muestras de hemolinfa de cada condición experimental, obtenidas a lo largo de las 72 horas p.i., presentaban actividad antimicrobiana (AAM), primero, se estandarizó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de *Escherichia coli* con carbencilina y una vez que se detectó, se realizaron pruebas con distintas concentraciones de las proteínas contenidas en las muestras, de cada condición experimental. Se decidió ajustar la concentración de proteínas de cada muestra a 1.25 mg/mL, mediante PBS 1x, con ayuda de un espectrofotómetro (NanoVue) y posteriormente, se utilizaron microplacas de cultivo de 96 pozos, en las cuales, se colocaron 50 µL de la mezcla de hemolinfa y anticoagulante a 1.25 mg/mL, 100 µL de *E. coli* a una concentración de 1×10^7 ufc mL⁻¹ y 100 µL de medio de cultivo LB, por duplicado. Cada placa fue incubada a 37°C, durante 18 horas y después, se tomó la lectura de las microplacas a una D.O. de 655 nm. Se utilizó carbencilina (1mg/mL), anticoagulante en la misma dilución que en las muestras y PBS 1x como controles negativos, y como control positivo, medio LB.

IV.19 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de consumo de oxígeno, metabolitos presentes en la hemolinfa y del CTH se llevó a cabo mediante el programa Sigma Stat, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1999), para determinar si existieron diferencias significativas entre los organismos del CPI, el control salino, el control *V. campbellii* y los 2 tratamientos experimentales en que se utilizó el extracto de *M. pyrifera*.

En el caso de los datos de la AAM, de las muestras de hemolinfa de los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, se utilizó la misma prueba para determinar si existieron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de *E. coli*, entre las muestras obtenidas a lo largo de las 72 horas p.i.

V. Resultados

La tasa de consumo de oxígeno de los camarones provenientes del control de pre-inyección (CPI), fue de $46 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ p.h.}$ Los organismos del control salino, tuvieron un aumento en la tasa de consumo de oxígeno a las 2 y 12 horas p.i., de 62.1 y $63.8 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ p.h.}$ respectivamente, sin embargo, este aumento no fue significativamente diferente respecto al CPI ($P < 0.05$) (**Figura 1**).

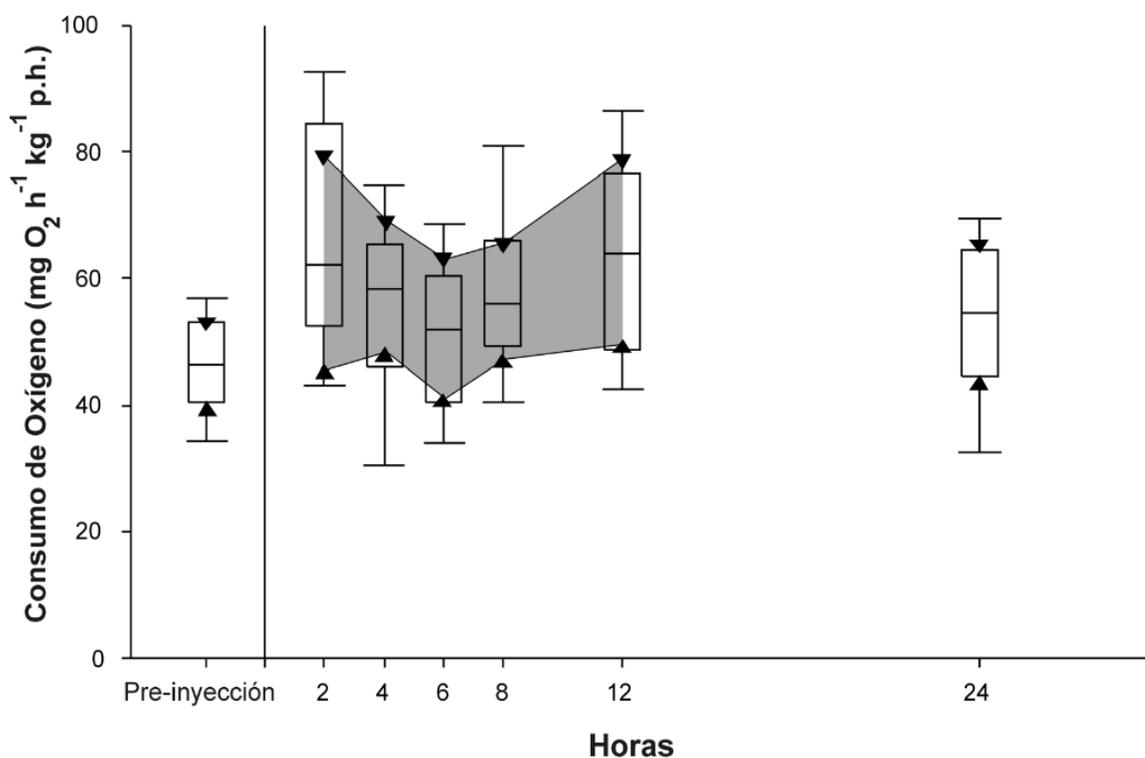


Figura 1. Consumo de oxígeno de los organismos del control salino, durante 24 horas. No se encontraron diferencias significativas respecto al CPI ($P < 0.05$).

En los organismos del control *V. campbellii*, la bacteria indujo un aumento del consumo de oxígeno a las 2, 4 y 6 horas p.i., de 65.6, 67 y 65.4 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h. respectivamente.

A partir de las 8 y 12 horas p.i., la tasa de consumo de oxígeno empezó a disminuir, de 54.3 y 31 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h. respectivamente, y para las 24 horas p.i., se obtuvo la menor tasa de consumo de oxígeno, de 24.15 mg O₂ h⁻¹ kg⁻¹ p.h. Los cambios registrados en el consumo de oxígeno de estos organismos a las 2, 4, 6 y 24 horas p.i., fueron significativamente diferentes respecto al CPI (P>0.05) (Figura 2).

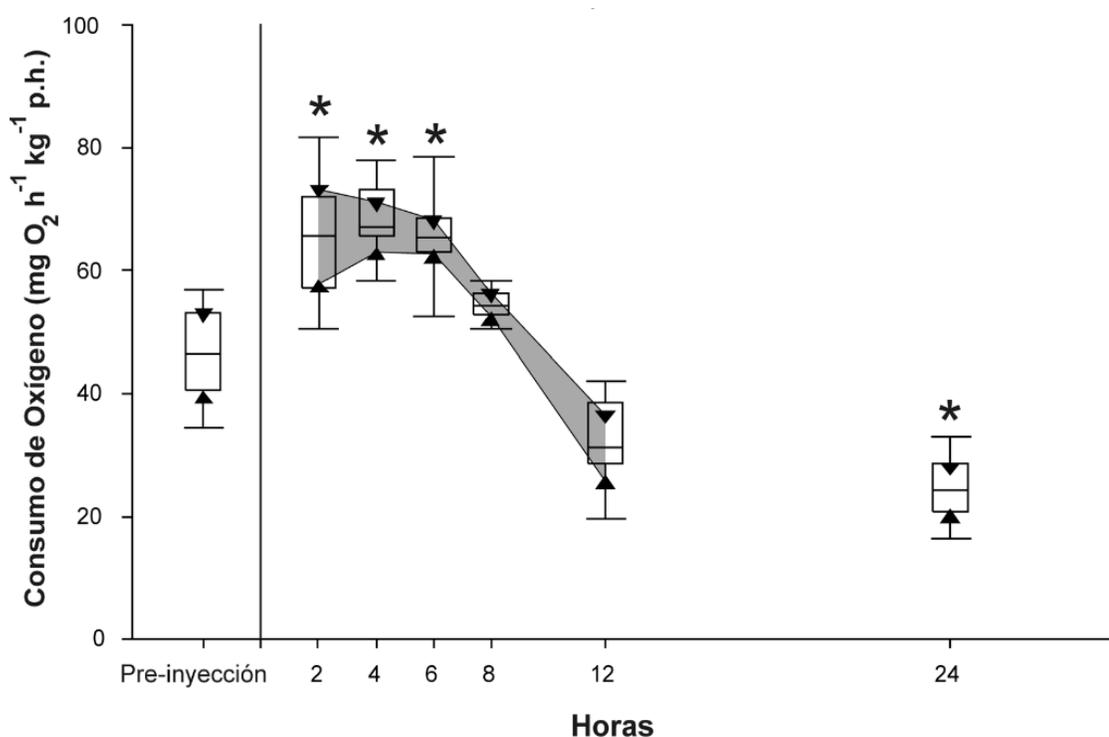


Figura 2. Consumo de oxígeno de los organismos del control *V. campbellii*, durante 24 horas. * Indica las diferencias significativas respecto al CPI (P>0.05).

La tasa de consumo de oxígeno de los organismos del CPI y la tasa de consumo de los organismos que fueron inyectados con el extracto de *M. pyrifer* e infectados con *V. campbellii*, no fueron significativamente diferentes, durante ninguna de las horas p.i., manteniéndose en un intervalo de 35.3 ± 5 a 44.7 ± 9 mg O_2 h^{-1} kg^{-1} p.h. ($P < 0.05$) (**Figura 3**).

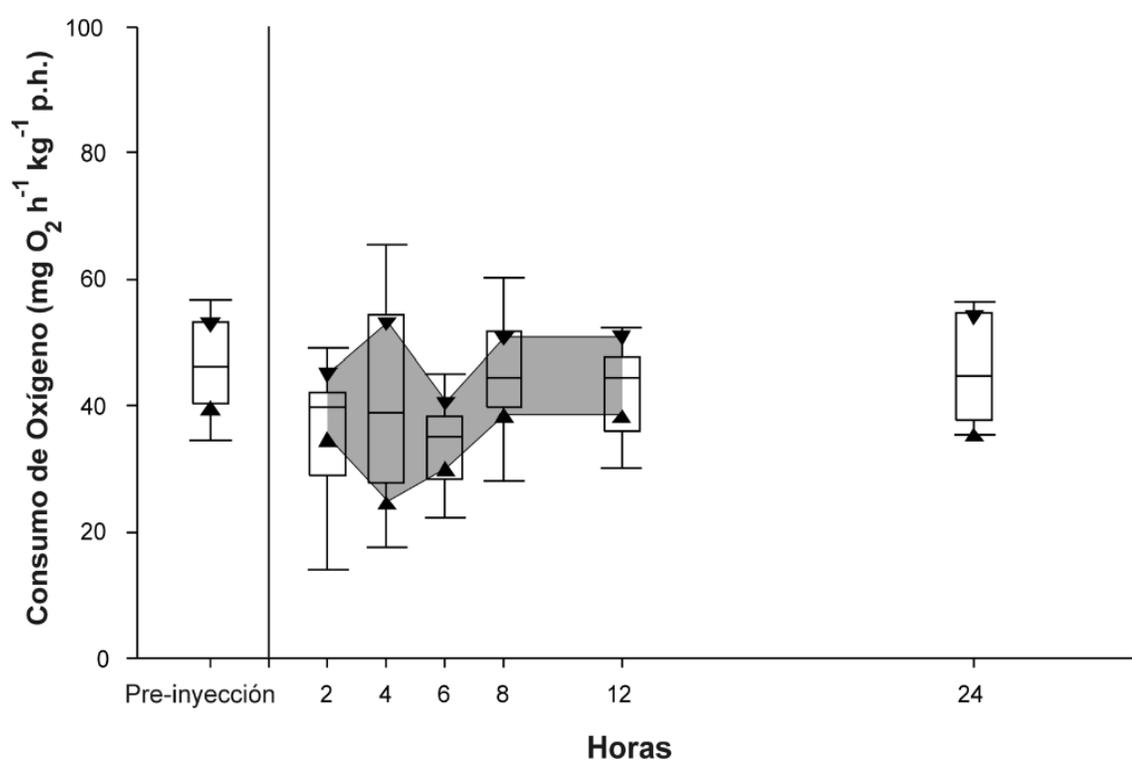


Figura 3. Consumo de oxígeno de los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifer*, durante 24 horas. No se encontraron diferencias significativas respecto al CPI ($P < 0.05$).

Al analizar el consumo de oxígeno de los organismos del CPI y los organismos que fueron sumergidos en el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se observó que el consumo de oxígeno de estos organismos se mantuvo en un intervalo de 43.4 ± 9 a 59.9 ± 9 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ p.h. (**Figura 4**).

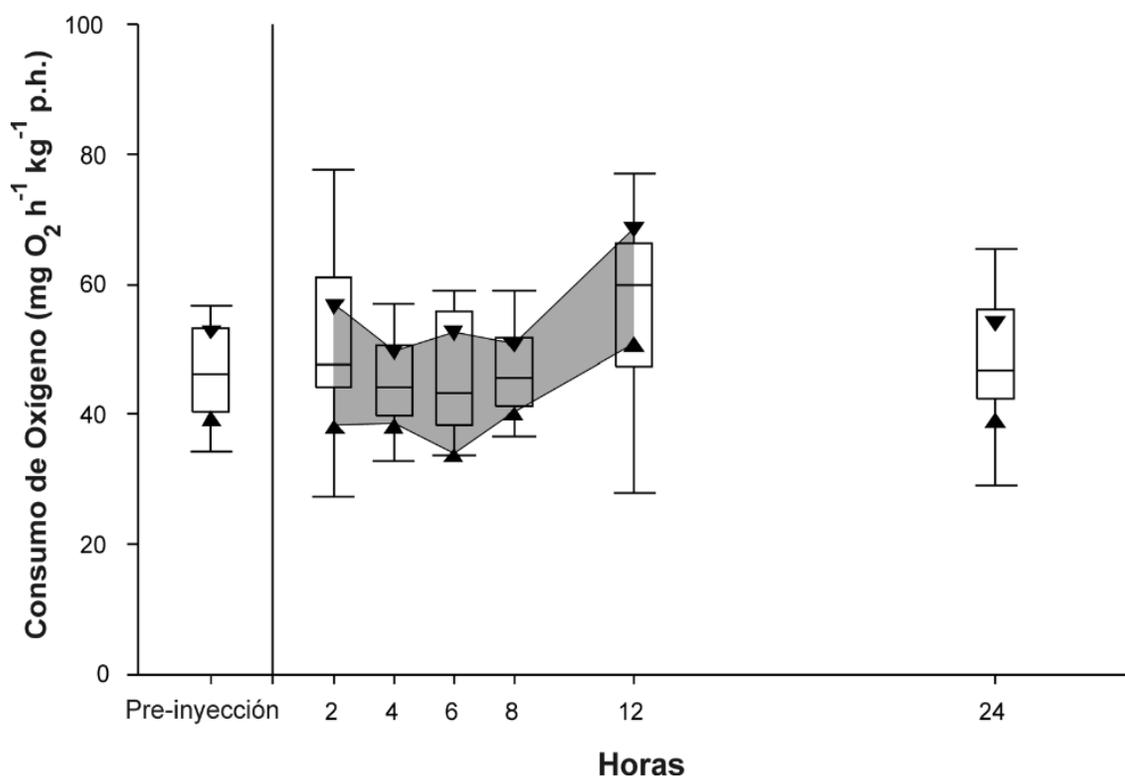


Figura 4. Consumo de oxígeno de los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, durante 24 horas. No se encontraron diferencias significativas respecto al CPI ($P < 0.05$).

La concentración de glucosa de los camarones provenientes del CPI, fue de 10 mg dL⁻¹. Los organismos del control *V. campbellii*, tuvieron la mayor concentración de glucosa registrada a las 2 horas p.i. (32.7 mg dL⁻¹), la cual, fue significativamente diferente a la del CPI ($P > 0.05$). Los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, mostraron una disminución en la concentración de glucosa a las 12 horas p.i. (2.3 mg dL⁻¹), que fue significativamente diferente a la del CPI ($P > 0.05$); sin embargo, a las 24 horas p.i., la concentración de glucosa en la hemolinfa de esos organismos, fue de 11.7 mg dL⁻¹, es decir, regresó a un nivel muy cercano al registrado en el CPI. Los organismos expuestos al tratamiento de inmersión con el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, no mostraron diferencias significativas en la concentración de glucosa en la hemolinfa, respecto al CPI ($P < 0.05$) (**Figura 5**).

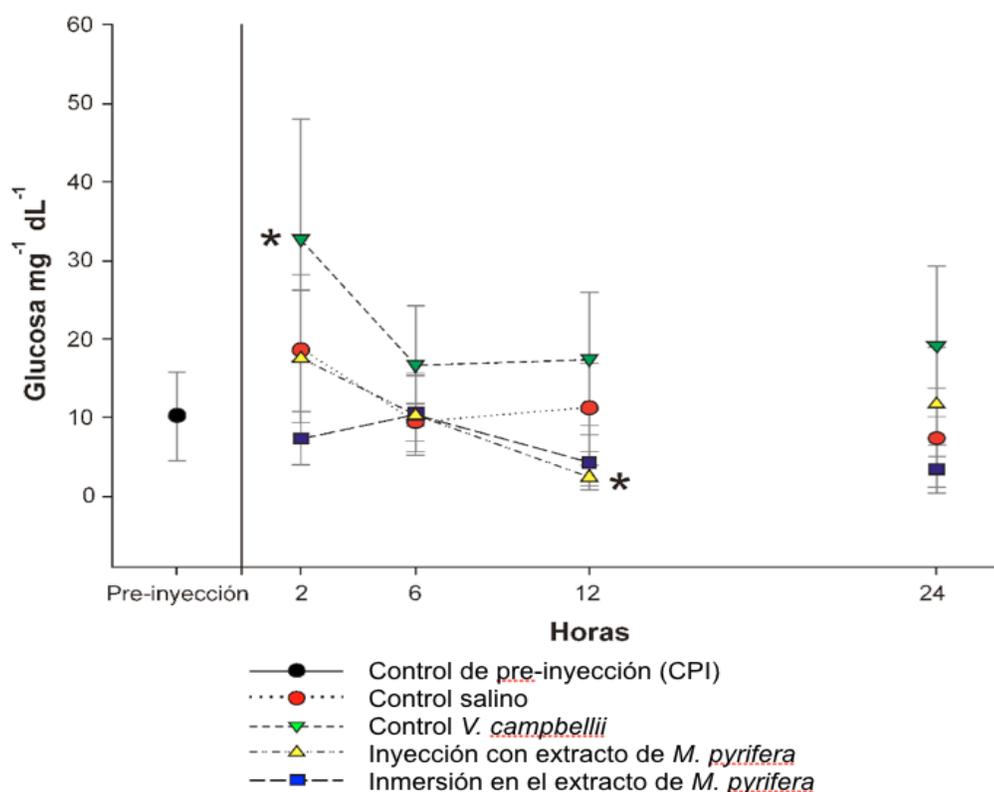


Figura 5. Concentración de glucosa en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales hasta las 24 horas p.i. * Indica las diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$).

La concentración de lactato en la hemolinfa de *L. vannamei* del CPI, fué de 11.4 mg dL⁻¹.

Los organismos del control salino y los del control *V. campbellii*, no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), con respecto al CPI a ninguna de las horas de muestreo, sin embargo, los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera* e infectados, tuvieron las concentraciones de lactato en hemolinfa significativamente más bajas durante las 24 horas p.i., respecto al CPI ($P > 0.05$), manteniéndose en un intervalo de 0.9 a 3.4 mg dL⁻¹.

Los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, tuvieron una concentración de lactato en hemolinfa similar a la de los camarones del CPI a las 2 y 24 horas p.i., sin embargo, su concentración de lactato en hemolinfa, disminuyó a 3.8 y 3.1 mg dL⁻¹, a las 6 y 12 horas p.i. respectivamente, mostrando diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$).

Finalmente, a las 24 horas p.i., su concentración de lactato volvió a un nivel muy cercano al del CPI, de 9 mg dL⁻¹ (**Figura 6**).

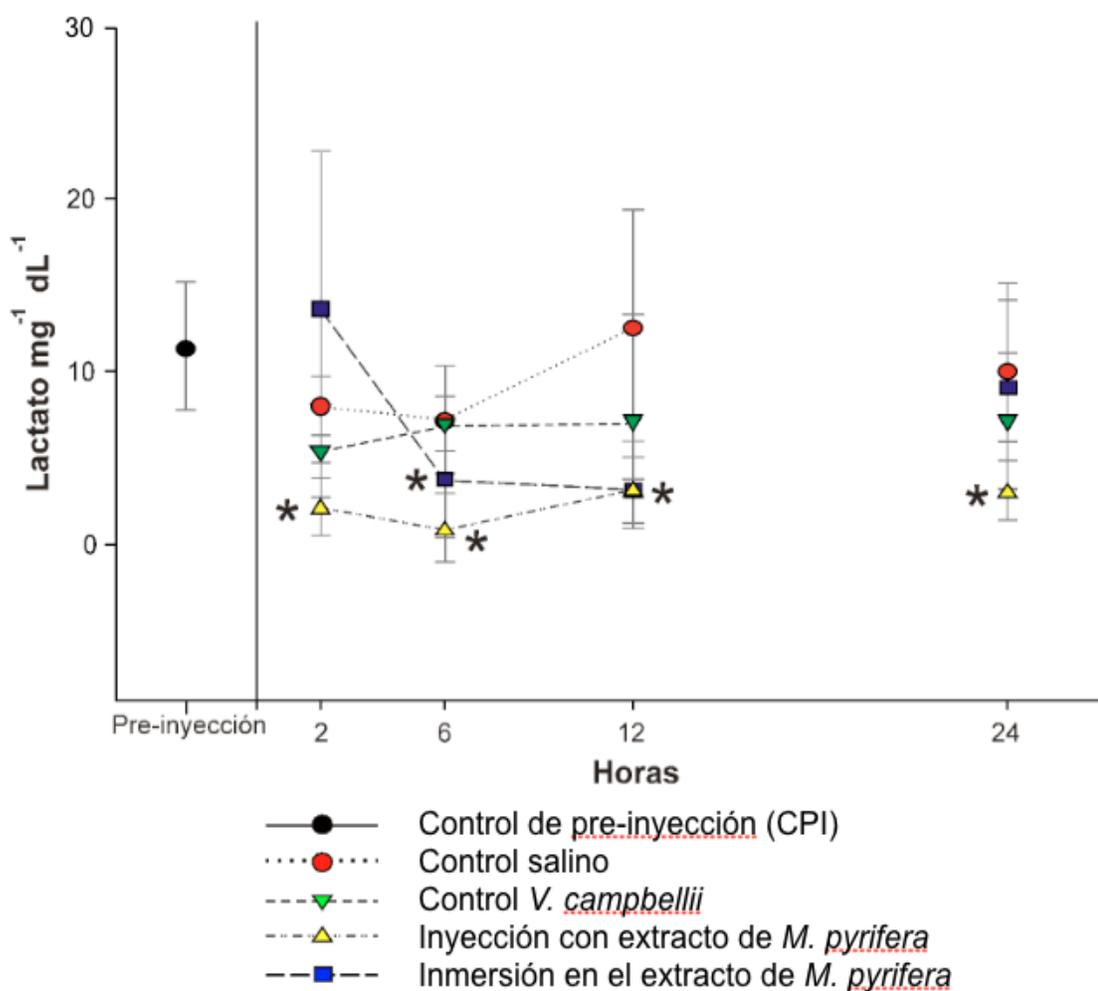


Figura 6. Concentración de lactato en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 24 horas p.i. * Indica las diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$).

La concentración de proteínas totales en la hemolinfa de los organismos del CPI, fue de 115.3 mg mL^{-1} . Los camarones del control salino nunca mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), con respecto a los del CPI, sin embargo, los organismos del control *V. campbellii*, tuvieron los valores significativamente más bajos de proteínas totales, durante todos los muestreos, respecto a los del CPI ($P > 0.05$), manteniéndose en un intervalo que abarcó de 57 a 86 mg mL^{-1} .

Los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, tuvieron el valor significativamente más alto de proteínas totales en hemolinfa a las 24 horas p.i. (184 mg mL^{-1}).

En el caso de los camarones que fueron sumergidos en el extracto de *M. pyrifera* e infectados con *V. campbellii*, tuvieron valores de proteínas totales en hemolinfa, significativamente más altos que los del CPI ($P > 0.05$), a las 6 y 24 horas p.i. (167.4 y 168.3 mg mL^{-1} respectivamente) (**Figura 7**).

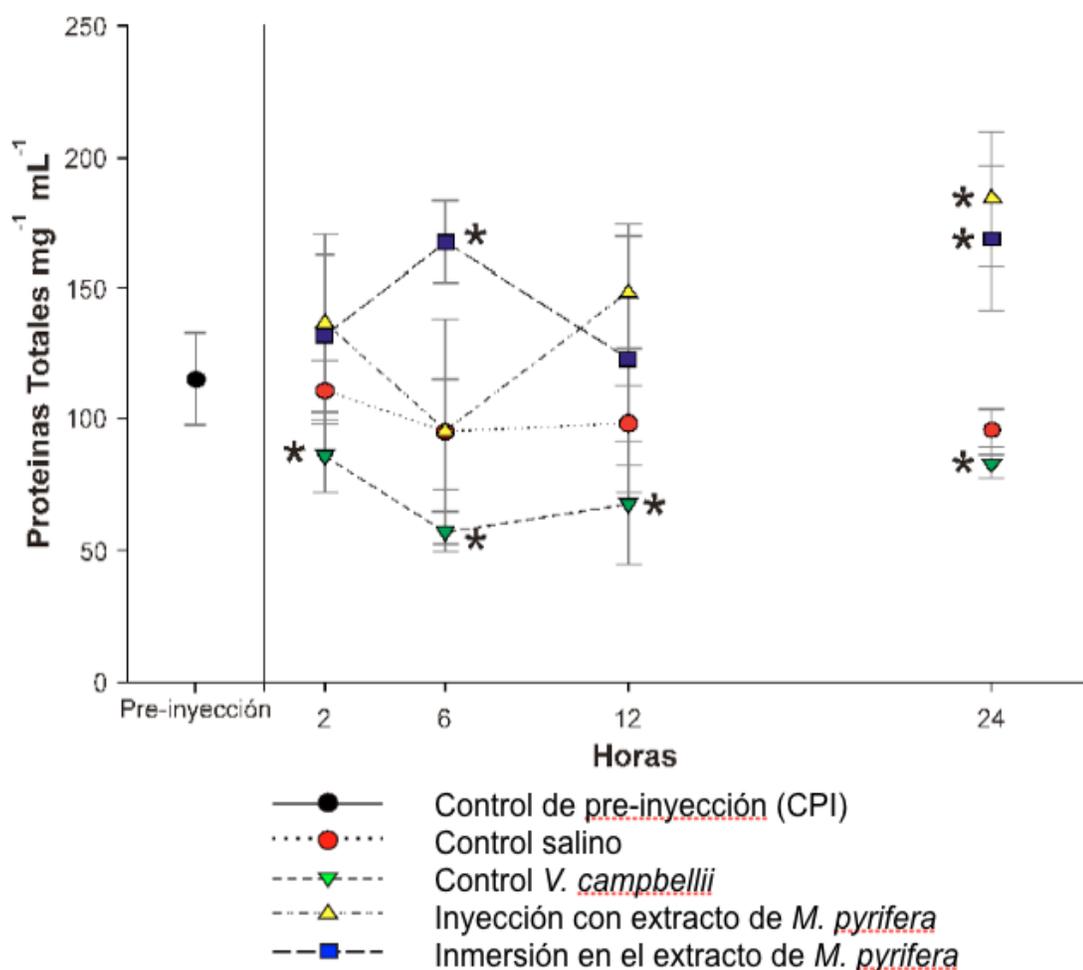


Figura 7. Concentración de proteínas totales presentes en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 24 horas p.i. *Indica las diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$).

La concentración de hemocianina en la hemolinfa de los organismos del CPI fue de 1 mmol L^{-1} .

Los organismos provenientes del control salino, no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en sus niveles de hemocianina, respecto a los organismos del CPI, a ninguna de las horas de muestreo, después de la inyección con la solución salina, manteniéndose en un intervalo de 0.63 a 1 mmol L^{-1} .

Se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), entre los valores de hemocianina de los organismos del control *V. campbellii*, respecto al CPI, a las 2, 6, 48 y 72 horas p.i. (0.5 , 0.53 , 0.5 y 0.57 mmol L^{-1} respectivamente).

Los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera*, mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$), en sus niveles de hemocianina, respecto al CPI, en todos los tiempos de muestreo: 0.47 , 0.36 , 0.54 , 0.41 , 0.41 y 0.28 mmol L^{-1} , a las 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas p.i. respectivamente.

También se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), entre los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera* y los del CPI, en todos los tiempos de muestreo: 0.44 , 0.65 , 0.53 , 0.64 , 0.75 y 0.58 mmol L^{-1} , a las 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas p.i. respectivamente (**Figura 8**).

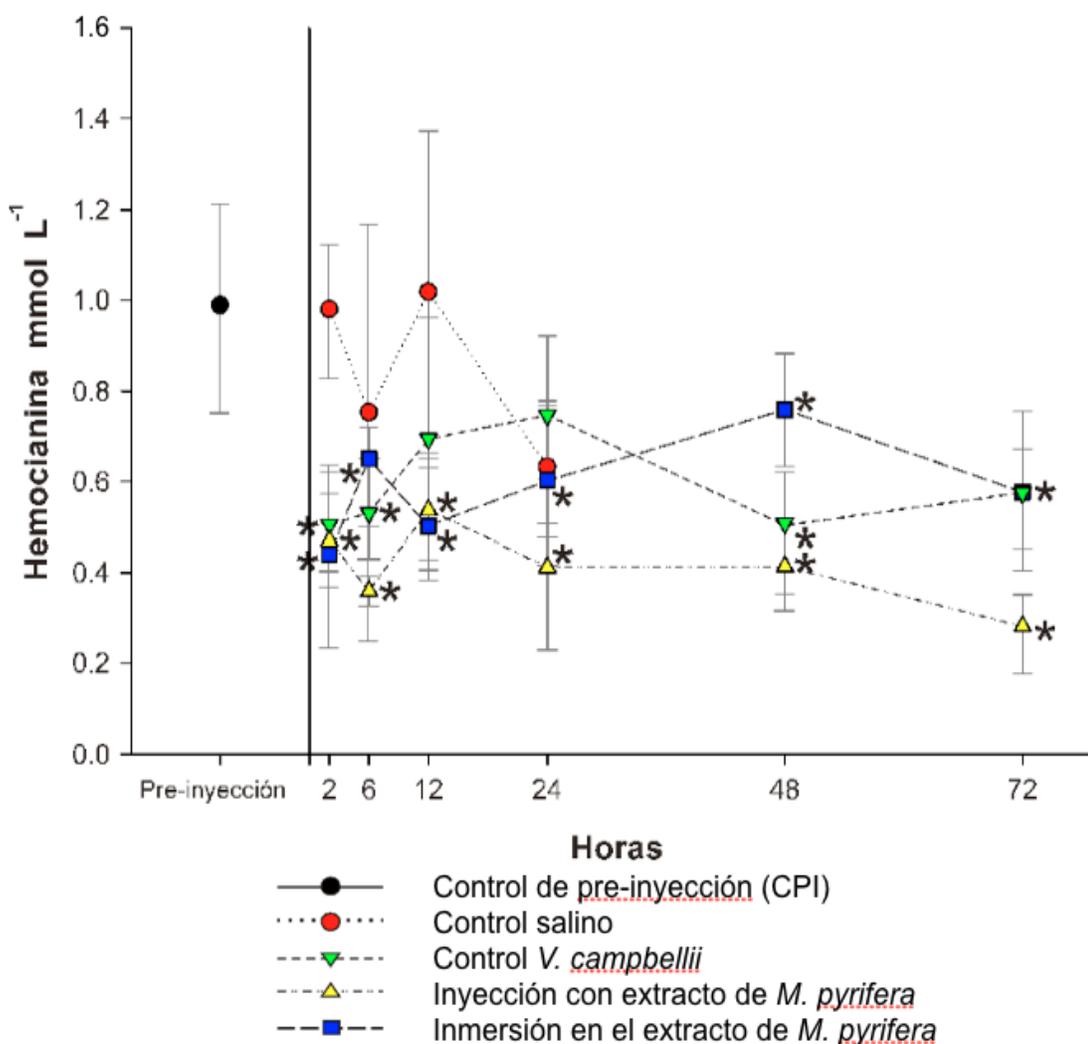


Figura 8. Concentración de hemocianina en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales, hasta las 72 horas p.i. * Indica las diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$).

En cuanto a los resultados del CTH de los organismos del control salino, se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), respecto al CPI ($498,750 \text{ cel mL}^{-1}$), a las 2, 6, 12 y 24 horas p.i., de $3,063,750$, $3,367,500$, $4,125,000$ y $4,590,000 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente. Los organismos del control *V. campbellii*, también mostraron diferencias significativas respecto al CPI ($P > 0.05$), a las 6 y 48 horas p.i., de $1,983,750$ y $1,616,250 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente.

Los organismos del tratamiento de inyección del extracto, mostraron diferencias significativas respecto al CPI ($P>0.05$), a lo largo de todas las horas de muestreo, manteniéndose en un intervalo de 1,627,500 - 2,752,500 cel mL⁻¹.

Los organismos del tratamiento de inmersión en el extracto, también mostraron diferencias significativas respecto al CPI ($P>0.05$), durante todas las horas del experimento, manteniéndose en un intervalo de 566,250 - 3,228,750 cel mL⁻¹ (**Figura 9**).

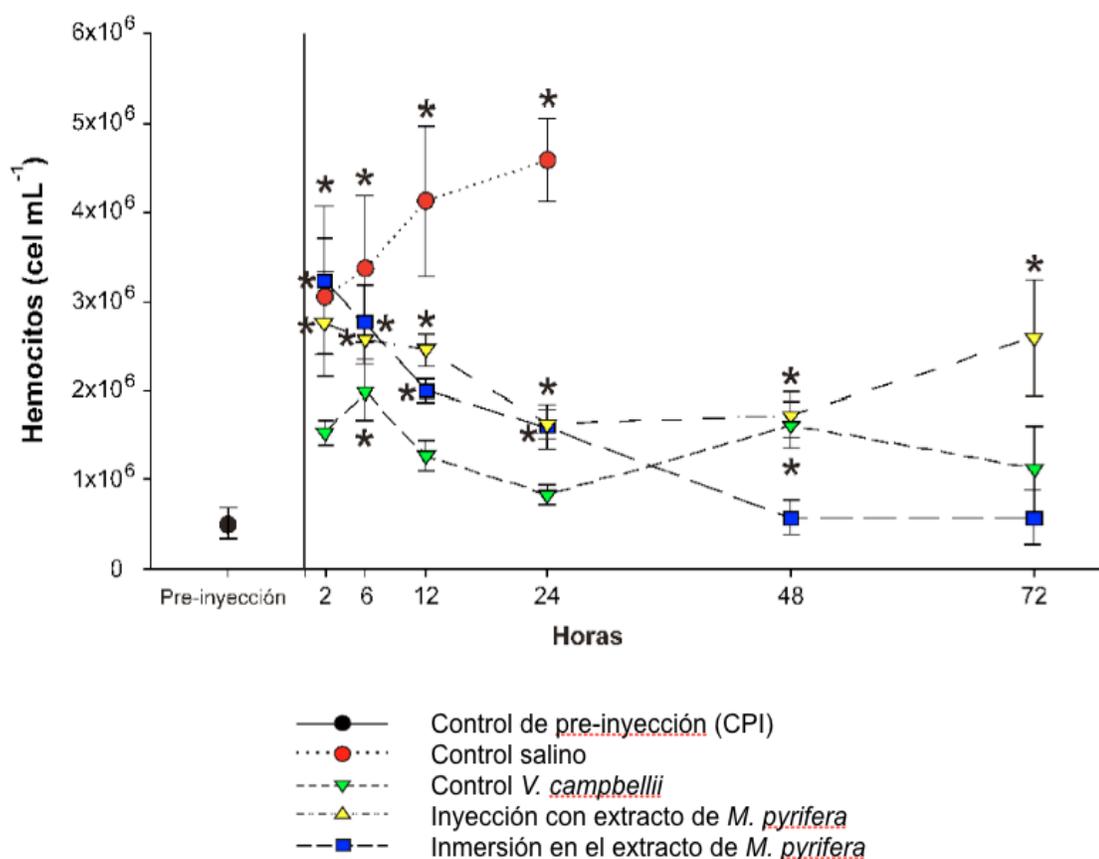


Figura 9. CTH presentes en la hemolinfa de los camarones de todas las condiciones experimentales hasta las 72 horas p.i. * Indica las diferencias significativas respecto al control de pre-inyección ($P>0.05$).

Los resultados de la tasa de depuración bacteriana, mostraron que los hemocitos de los camarones del control *V. campbellii*, fueron ineficientes para eliminar a la bacteria, ya que únicamente sobrevivió el 50% de los camarones infectados a las 72 horas p.i. y en el gel de agarosa no se detectó DNA bacteriano amplificado (**Figura 10**).

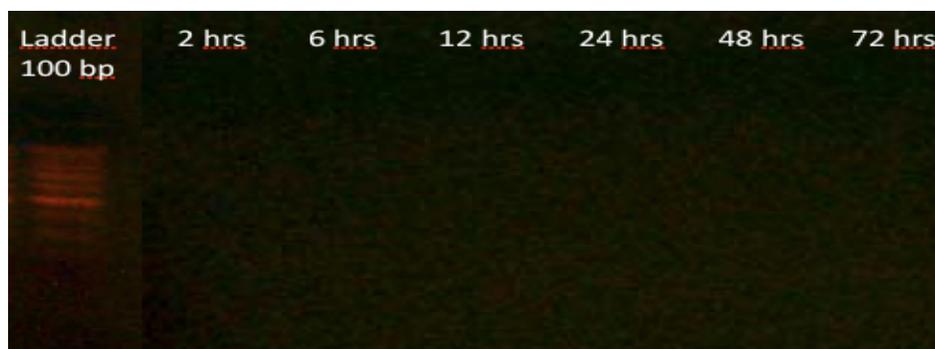


Figura 10. Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración bacteriana de los organismos del control *V. campbellii*, hasta las 72 horas p.i.

Los hemocitos de los camarones provenientes del tratamiento de inyección con el extracto de *M. pyrifera*, fueron los más eficientes para eliminar a la bacteria, pues se detectó una mayor cantidad de DNA bacteriano en el gel de agarosa y sobrevivió el 82% de los camarones a las 72 horas p.i. (**Figura 11**).

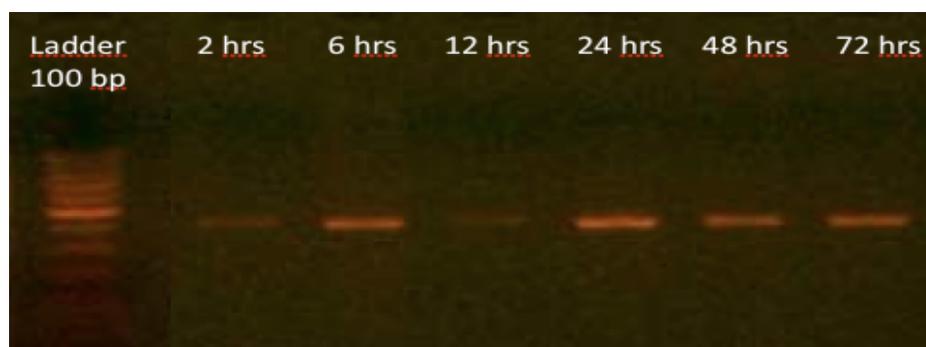


Figura 11. Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración de *V. campbellii*, en los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera*, hasta las 72 horas p.i.

Los hemocitos de los camarones del tratamiento de inmersión en el extracto de *M. pyrifera*, no fueron tan eficientes para eliminar a *V. campbellii*, pues en el gel de agarosa, se detectó muy poco DNA bacteriano y sólo sobrevivió el 17% de los camarones a las 72 horas p.i. (**Figura 12**).

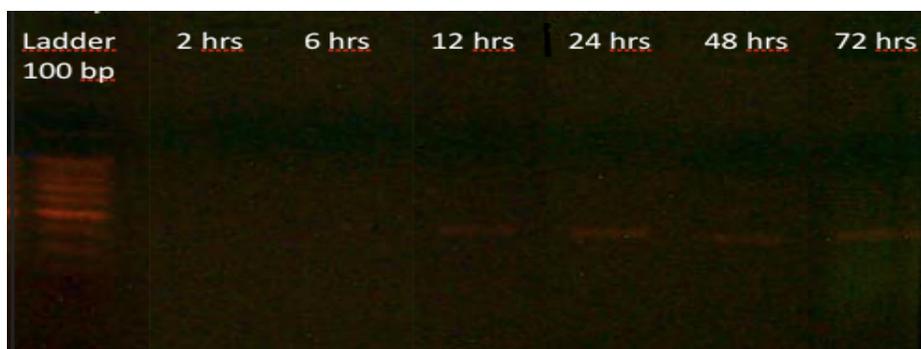


Figura 12. Gel de agarosa al 2% con la tasa de depuración de *V. campbellii*, en los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, hasta las 72 horas p.i.

En cuanto a la AAM de las muestras ajustadas a una concentración de 1.25 mg mL^{-1} de proteínas, se observó que las muestras del tratamiento que tuvieron una mayor inhibición del crecimiento de *E. coli*, fueron las que provinieron de los organismos expuestos a la inmersión en el extracto de *M. pyrifera*; específicamente las de las 24 horas p.i., fueron las más eficientes para inhibir el crecimiento de dicha bacteria ($P > 0.05$), con una absorbancia de 0.153, a una D.O. de 655 nm.

El resto de las muestras se mantuvo en un intervalo de 0.248 a 0.184 a la misma D.O. (**Figura 13**).

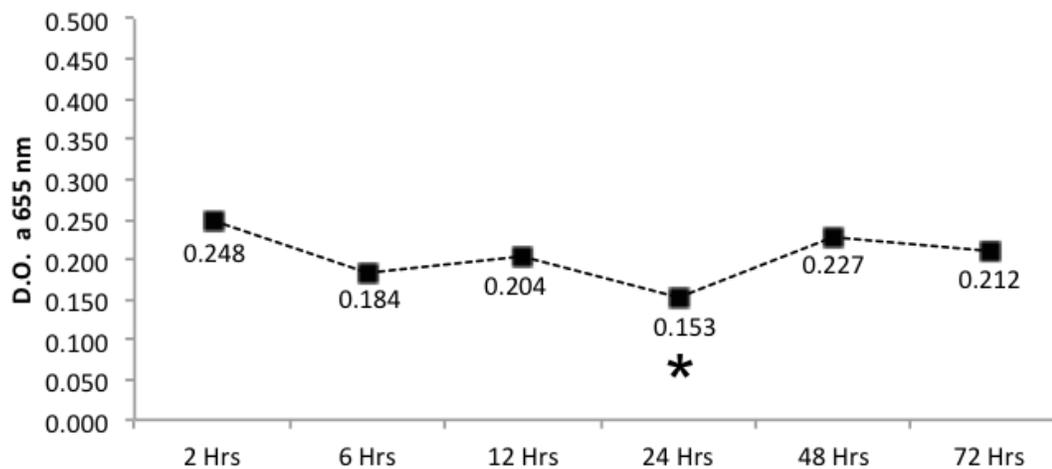


Figura 13. Las proteínas de la hemolinfa de los camarones sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, a las 24 horas p.i., fueron estadísticamente más efectivas para inhibir el crecimiento de *E. coli* * ($P > 0.05$).

VI. Discusión

El efecto de los productos naturales extraídos de algunos organismos, como las macroalgas, han cobrado importancia, debido a que estos pueden funcionar como potentes estimulantes del sistema inmune en diferentes especies, entre ellas, lombrices, peces, ratones, ratas, conejos, cuyos, borregos, humanos e inclusive camarones (Vetvicka *et al.*, 2007).

Varios autores mencionan que la inmunoestimulación, vía inmersión, mejora la respuesta inmune del camarón (Itami *et al.*, 1998; Alabi *et al.*, 1999; Campa-Cordova *et al.*, 2005; Hou & Chen, 2005; Yeh *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007), así como por medio de la inyección (Cheng *et al.*, 2004; Hou & Chen, 2005; Yeh *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007). En el presente estudio, ambas formas de inmunoestimulación, fueron efectivas para que la presencia de la bacteria no disminuyera el consumo de oxígeno, en los organismos expuestos al extracto de *M. pyrifera*, por lo tanto, se evitó la formación de nódulos que obstruyen las branquias.

Los organismos del control *V. campbellii*, aumentaron su tasa de consumo de oxígeno, durante las primeras 6 horas p.i. y la disminuyeron en las horas posteriores, se ha reportado un efecto similar en *L. vannamei* infectado con *V. campbellii*, por Scholnick *et al.* (2006).

También se ha estudiado el efecto de la presencia de bacterias y hemocitos en las branquias de *Callinectes sapidus* y de la misma manera, se ha demostrado que la captación de oxígeno disminuyó (Burnett *et al.* 2006). Por otra parte, se ha comprobado que los hemocitos se unen a las partículas que circulan en la hemolinfa y forman nódulos, que por procesos mecánicos, terminan alojándose en las branquias (Martin *et al.*, 1993; 1998; 2000). Estos nódulos pueden afectar la capacidad de las branquias para llevar a cabo su función de intercambio de gases y la regulación de iones, provocando hipoxia en el organismo infectado. Por tal

motivo, se puede decir, que en el presente trabajo, la formación de los nódulos en las branquias de los camarones del control *Vibrio campbellii*, fue lo que causó que el consumo de oxígeno de esos organismos, en las horas 8, 12 y 24 p.i., disminuyera de manera significativa, respecto al CPI.

La concentración de glucosa registrada para los camarones del CPI, fue similar a la reportada por Racotta y Palacios (1998) en *L. vannamei* (15 mg dL^{-1}), quienes demostraron que la glucosa en la hemolinfa, aumentó como respuesta al estrés producido por muestreos repetidos de hemolinfa. En el presente estudio, los organismos del control *V. campbellii*, presentaron la mayor concentración de glucosa a las 2 horas p.i., debido al estrés causado por la infección. El extracto de *M. pyrifera* utilizado en el presente estudio, tuvo un efecto positivo, pues ninguno de los organismos de los diferentes tratamientos, presentó valores anormales de glucosa; el único cambio que se registró fue la disminución a las 12 horas p.i., en los organismos que fueron inyectados con el extracto, sin embargo, este efecto no persistió, ya que a partir de los siguientes muestreos, los valores de glucosa en hemolinfa se mantuvieron muy cerca del nivel del CPI, lo cual, indicó que todos los organismos fueron capaces de contrarrestar el estrés de la infección-inyección, a excepción del control *V. campbellii*, a las 2 horas p.i.

En cuanto a los niveles de lactato en la hemolinfa de los camarones, todos los organismos provenientes de los tratamientos y controles se mantuvieron por debajo del nivel del CPI, lo cual coincidió con el valor reportado por Racotta y Palacios (1998), de 11 mg dL^{-1} ; esos autores concluyen que, a pesar de que se utiliza el lactato como indicador de estrés, sus resultados sugieren que el nivel de glucosa en hemolinfa, resultó más sensible como indicador de estrés en *L. vannamei*, debido a que los niveles de lactato que ellos registraron en juveniles de *L. vannamei*, se vieron menormente afectados por la manipulación. En el presente estudio, se observaron resultados similares, ya que hubo una mayor modificación en los niveles de glucosa que en los de lactato. La utilización del extracto de *M.*

pyrifera por ambas vías de inmunoestimulación de este estudio, reflejado en los niveles de lactato, demostró que los organismos fueron capaces de contrarrestar el efecto del estresor (infección-inyección), antes de que fuera necesario obtener anaeróbicamente su energía y los valores de lactato en hemolinfa se vieran incrementados; así que únicamente se observaron niveles altos de glucosa, que fue un indicador de estrés más sensible que el lactato. Hsieh *et al.* (2008), reportan que los juveniles de la misma especie, sometidos a una infección con *V. alginolyticus*, aumentaron sus niveles de glucosa y lactato, lo cual, apoya nuestra hipótesis de que el extracto mantuvo los niveles de estos metabolitos cercanos a los reportados como normales, aún estando bajo los efectos de la infección con *V. campbellii*.

La concentración de proteínas totales, en la hemolinfa de los camarones del CPI, fue de 117.7 mg mL⁻¹, valores similares de 130, 127 y 103 mg mL⁻¹ han sido reportados en la hemolinfa de *L. vannamei*, por Racotta y Palacios (1998), Rodríguez *et al.* (2000) y Pascual *et al.* (2003), respectivamente.

Pascual *et al.* (2003), mencionan que los niveles de proteínas en la hemolinfa, son afectados por el estrés nutricional y no tanto por el estrés que causa la manipulación, sugiriendo que los niveles de proteína en hemolinfa, pueden reflejar los cambios en la salud del camarón, incluyendo la modificación de la respuesta inmune. Los organismos provenientes del grupo control *V. campbellii*, mostraron los niveles más bajos de proteínas durante todos los muestreos de hemolinfa p.i., lo cual sugiere que, dicho control tuvo una menor cantidad de proteínas involucradas en la respuesta inmune.

Se ha mencionado por Destomieux *et al.*, (2001), Pascual *et al.*, (2004) y Pérez *et al.*, (2006), que al utilizar inmunoestimulantes, los niveles de proteína aumentan por la producción de péptidos antimicrobianos, debido a que se utiliza a la hemocianina como precursor de estos péptidos.

La hemocianina de los crustáceos, puede ser procesada por una cistein-proteasa para generar péptidos antimicrobianos bajo condiciones ácidas, y su producción puede ser inducida si se inyectan lipopolisacáridos y glucanos en el organismo (Lee *et al.*, 2003). En los experimentos donde se utilizó el extracto inmunoestimulante de *M. pyrifera* vía inyección e inmersión, los camarones tuvieron niveles de proteína por arriba del nivel del CPI, observándose el mayor nivel de proteínas totales a las 24 horas p.i. en ambos tratamientos. Lo anterior, debido probablemente a un incremento de la producción de péptidos antimicrobianos para combatir la infección a partir de la hemocianina, lo cual coincide con los resultados de AAM de las muestras del tratamiento de inmersión en el extracto, pues a las 24 horas p.i. fueron las más eficientes para inhibir el crecimiento de *E. coli*.

Los niveles de hemocianina en la hemolinfa de todos los organismos que estuvieron en contacto con la bacteria, se mantuvieron por debajo del nivel normal, sin embargo, eso no afectó la tasa de consumo de oxígeno.

El CTH aumentó en los organismos provenientes de todas las condiciones experimentales, tal como se ha reportado en estudios previos de inmunoestimulación en peneidos, entre los cuales destacan: Sung *et al.* (1994), en *P. monodon* inmunoestimulado con β -glucanos extraídos de levadura, Cheng *et al.* (2004 y 2005), en *L. vannamei* con alginato de sodio, Campa-Córdova *et al.* (2005), con β -glucanos, lipopolisacáridos y fucoidán, también en camarón blanco, Hou *et al.* (2005), mediante el extracto del alga roja *Gracilaria tenuistipitata*, Yeh *et al.* (2006), con el extracto del alga café *Sargassum duplicatum*, Fu *et al.* (2007), con el extracto del alga roja *Gelidium amansii* y por último Hsieh *et al.* (2008), con el extracto de la planta *Toona sinensis* (Rutin), estos últimos cuatro estudios también fueron realizados con camarón blanco.

En el caso de los camarones del control salino, el CTH aumentó debido a que el sistema de defensa del camarón no tiene especificidad, por lo cual, reaccionó a la inyección del suero fisiológico como si fuera un agente extraño, sin embargo, el conteo de hemocitos se mantuvo alto debido a que no había presencia de bacteria en estos organismos y a pesar de que se produjeron más hemocitos, no fueron utilizados contra ningún agente que necesitara ser fagocitado o eliminado por el organismo, por lo que se acumularon en la hemolinfa conforme se fueron produciendo.

De los tratamientos experimentales, el que tuvo mayor número de hemocitos fue el de inmersión en el extracto, iniciando con $3,228,750 \text{ cel mL}^{-1}$, sin embargo, a pesar de tener tantos hemocitos presentes en la hemolinfa, se utilizaron más rápido, pues para las 48 y 72 horas p.i. los organismos sumergidos en el extracto solo presentaron $67,500 \text{ cel mL}^{-1}$ más que el CPI.

Durante las primeras 24 horas p.i., los camarones sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, mostraron un incremento significativo del CTH, sin embargo, a las 48 horas p.i., disminuyeron su CTH hasta los niveles del CPI, efecto que persistió hasta las 72 horas p.i.; algunos autores, han encontrado un efecto similar en *L. vannamei* y *Penaeus japonicus* (Sequeira *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). La disminución del CTH, pudo haber sido inducida por la proliferación y movilidad de los hemocitos circulantes hacia el tejido hematopoyético, para generar hemocitos maduros (Van de Braak *et al.* 2002; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Los resultados de la tasa de depuración de *V. campbellii*, junto con los de sobrevivencia a las 72 horas p.i., mostraron que, la capacidad fagocítica de los hemocitos de los camarones inyectados con el extracto de *M. pyrifera*, fue la más efectiva contra la bacteria, ya que se detectó DNA bacteriano en los hemocitos después de las 6 horas p.i. y la sobrevivencia de dicho grupo fue del 82%, lo que

prueba que el DNA bacteriano amplificado por medio de PCR, pertenece a bacterias muertas que fueron fagocitadas por los hemocitos, en el momento en que se realizó la extracción de hemolinfa.

En el caso del control *V. campbellii*, no se detectó DNA bacteriano fagocitado a ninguna hora p.i., y en los camarones sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, se detectó DNA bacteriano hasta después de las 12 horas p.i.; en ambos grupos, la sobrevivencia registrada a las 72 horas p.i. fue muy baja, de 50 y 17%, respectivamente.

Una posible explicación de la efectividad de los hemocitos de los camarones inyectados con el extracto de *M. pyrifera*, para eliminar a la bacteria y su alto CTH a las 72 horas p.i., puede ser que los camarones inyectados con el extracto, tuvieron 24 horas de ventaja para madurar sus hemocitos, antes de la infección bacteriana, y los camarones sumergidos en el extracto, solamente contaron con 3 horas.

Los resultados de la AAM, muestran que los organismos sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, inhibieron más eficientemente el crecimiento de *E. coli*, lo que sugiere que, los hemocitos de los organismos sumergidos se desgranularon más rápido y por eso las muestras de hemolinfa de dichos organismos tuvieron un mejor desempeño en las pruebas de AAM. Estos resultados podrían explicar el bajo CTH que se registró a las 24 horas p.i., en los camarones sumergidos en el extracto de *M. pyrifera*, ya que la desgranulación provoca lisis en los hemocitos (tal como la observada al microscopio en las muestras de CTH del tratamiento de inmersión en el extracto), por lo que, al desgranularse tan rápido, muchos sufrieron lisis y es por esto que no hubo una cantidad suficiente de ellos para resistir la infección. Lo anterior concuerda con lo que mencionan Van de Braak *et al.* (2002), acerca de que se pierden hemocitos después de la desgranulación, pues se lleva a cabo un proceso de lisis de los mismos.

Si se compara el CTH de los camarones sumergidos en el extracto, con los del tratamiento de inyección en el extracto, los inyectados con el extracto tuvieron más hemocitos que los sumergidos, a las 12, 48 y 72 horas p.i. y fueron más eficientes para fagocitar a *V. campbellii*, sin embargo, debido a que los hemocitos de los camarones inyectados con el extracto fueron más eficientes para fagocitar, su desgranulación y por lo tanto la liberación de los PAMs, fue más lenta y no tuvieron tan buena AAM. Como apoyo a lo anterior, se ha descubierto que los hemocitos granulares y semi-granulares contienen PAMs, varios de los cuales ya han sido caracterizados en *L. vannamei*, los más conocidos son las peneidinas, las cuales son sintetizadas y almacenadas en los hemocitos (Rendón y Balcázar, 2003; Montaña-Pérez y Vargas-Albores, 2002; Rodríguez y Le Moullac, 2000). Van de Braak (2002), menciona que los hemocitos contienen a los PAMs y que, por medio de la desgranulación, dichas células liberan a la hemolinfa distintos componentes humorales, entre los cuales están las peneidinas y muchos otros agentes antimicrobianos.

La técnica utilizada en este trabajo, para determinar la tasa de depuración de *V. campbellii* por PCR en la hemolinfa de cada grupo de camarones, no había sido utilizada en ningún estudio previo, únicamente es similar la técnica utilizada por Wang y Zhang (2008), quienes detectaron el DNA del virus de la mancha blanca, en *M. japonicus*, mediante PCR tiempo real.

La técnica para determinar la AAM de la hemolinfa en todos los grupos de camarones de este trabajo, fue muy similar a la utilizada en el estudio de Lee *et al.* (2003), para analizar la efectividad de la astacidina 1 (PAM), del cangrejo de agua dulce (*Pascifastacus leniusculus*), para inhibir el crecimiento de 9 bacterias diferentes, entre ellas *E. coli*. En ese estudio, se concluyó que la liberación de la astacidina 1, aumentó cuando los cangrejos fueron inyectados con lipopolisacáridos o glucanos.

El extracto de *M. pyrifera*, utilizado en este trabajo, contiene una cantidad considerable de polisacáridos (betaglucanos, alginatos y fucoidan) (Zvyagintseva *et al.*, 2005; Rioux *et al.*, 2007), que estimulan la respuesta celular y humoral de los organismos, ya que, a pesar de que no se caracterizaron los componentes exactos del extracto del alga, en general, las algas cafés están compuestas por un alto porcentaje de esos polisacáridos.

Los resultados del CTH de los organismos inyectados con el extracto de *M. pyrifera*, junto con los de la tasa de depuración de la bacteria y la sobrevivencia a las 72 horas p.i., indican que el extracto, estimuló positivamente su respuesta celular y les ayudó a resistir la infección con *V. campbellii*.

En el caso de los camarones sumergidos en el extracto, el efecto inmunoestimulador fue positivo en cuanto a la respuesta humoral, ya que los mejores resultados de AAM, se encontraron en las muestras de ese tratamiento. Sin embargo, la sobrevivencia fue baja y la cantidad de DNA bacteriano detectado en su tasa de depuración, también fue baja, a pesar de que metodológicamente, resulte más sencillo inmunoestimar a los organismos a través de la inmersión.

Ninguno de los metabolitos medidos en la hemolinfa, indicó que los organismos estuvieron sometidos a estrés, que comprometiera su salud fisiológica, sin embargo, el tiempo de maduración de los hemocitos, parece ser de primordial importancia en estudios como este, pues puede ser la diferencia entre una sobrevivencia del 17 al 82%.

VII. Conclusiones

- El efecto que provocó el extracto de *Macrocystis pyrifera*, administrado vía inyección e inmersión, sobre el consumo de oxígeno de los organismos, fue positivo, ya que la tasa de consumo de oxígeno de los organismos inmunoestimulados, no se redujo conforme avanzó la infección, como en el caso de los organismos del control infectado con *Vibrio campbellii*.
- Los metabolitos medidos en la hemolinfa de los organismos infectados y estimulados con el extracto de *M. pyrifera* por ambas vías, no mostraron cambios, lo que indicó que el extracto tuvo un efecto positivo sobre la salud fisiológica de los organismos.
- El extracto de *M. pyrifera*, administrado vía inyección e inmersión, estimuló la respuesta humoral y celular del sistema de defensa de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *V. campbellii*, sin embargo, al comparar los resultados de la tasa de depuración bacteriana, el CTH y la sobrevivencia de los organismos a las 72 horas p.i., fue notorio que el tratamiento de inyección fue más efectivo que el de inmersión, para que los organismos resistieran la infección. Lo anterior, debido a que en la tasa de depuración de los organismos inyectados con el extracto, sus hemocitos tuvieron una mayor capacidad fagocítica y se detectó una mayor cantidad de DNA bacteriano, además, su CTH a las 72 horas p.i. fue más alto y la sobrevivencia registrada al final de los experimentos, fue de 82%.
- La respuesta humoral de los organismos del tratamiento de inmersión en el extracto de *M. pyrifera*, fue más efectiva en las pruebas de actividad antimicrobiana, sin embargo, en base a los resultados de sobrevivencia y el CTH a las 72 horas p.i., la respuesta celular provocada por el extracto, fue más

relevante que la humoral, debido a que en su tasa de depuración, se detectó poco DNA bacteriano, que corresponde a bacterias muertas, su CTH fue bajo y la sobrevivencia de este grupo, a las 72 horas p.i., fue de 17%.

- La importancia del presente estudio, radica en que, los inmunoestimulantes son una eficiente alternativa para prevenir enfermedades y de esta forma, no se recurre al uso de antibióticos, en cultivos de organismos que están destinados al consumo humano; además, la abundante biomasa cosechable de *M. pyrifera*, puede permitir su explotación para producir inmunoestimulantes.
- Es recomendable utilizar inmunoestimulantes de origen natural, como el extracto del alga del presente estudio, en cultivos de organismos de alto valor comercial, como el camarón.

Referencias

Alabi, A.O., D.A. Jones y J.W. Latchford. 1999. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. (178): 1-11 p.

Altinok, I. y J.M. Grizzle. 2003. Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. (34): 113-117 p.

Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-Tecnología a la Alimentación y a la Inmuno-Estimulación de Camarones peneidos: En: 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. Mérida, Yucatán. México. 102-110 p.

Burnett, L.E., J.D. Holman, D.D. Jorgensen, J.L. Ikerd y K.G. Burnett. 2006. Immune defense reduces respiratory fitness in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab. *Biology bulletin*. (211): 50-57 p.

Campa-Córdova, A.I., N.Y. Hernández-Saavedra, G. Aguirre-Guzmán y F. Ascencio. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas*. (31): 661-669 p.

Chen, J.C. y S.Y. Cheng, 1993. Hemolymph PCO₂, hemocyanin, protein levels and urea excretion of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology*. (27): 281-292 p.

Cheng, W., C.H. Liu, S.T. Yeh y J.C. Chen. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. (17): 41-51 p.

Cheng, W., C.H. Liu, C.H. Kuo y J.C. Chen. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* (18): 1-12 p.

Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar y C. Guajardo-Barbosa. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre. Mérida, Yucatán. México. 227-266 p.

Destoumieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, y E. Bachère. 2001. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry*. (276): 47070-47077 p.

Díaz, F., A.D. Re, R.A. González, L.N. Sánchez, G. Leyva y F. Valenzuela. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*. (38): 1387-1394 p.

FAO. 2008. The state of world and aquaculture. 2008 (SOFIA) disponible en línea: <ftp://ftp.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e00.pdf> (descargado Marzo, 2, 2010).

Fu, W.Y., W.Y. Hou, S.T. Yeh, H.L. Chiu y J.C. Chen. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administration on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. (22): 673-685 p.

Giffard, M. I. 1999. Incidencia de bacterias luminiscentes en cultivos larvarios de *Penaeus stylirostris*. Tesis de Maestría. CICESE, Ensenada, B. C., México. 71 pp.

Gómez-Gil, B., S. Soto-Rodríguez, A. García-Gasca, A. Roque, R. Vázquez-Juárez, y F. L. Thompson. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* (150): 1769-1777 p.

González-Sánchez, R.A., F. Díaz, A. Licea, A.D. Re, L.N. Sánchez y Z. García-Esquivel. 2010. Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*. (35): 218-224 p.

Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration on *Crangon crangon* after exposure to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*. (85A): 721-724 p.

Hall, M.R. y E.H. van Ham. 1998. The effect of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society*. (29): 290-299 p.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley y S. T. Williams. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 pp.

Hou, W.Y. y 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 Immunology*. (19): 127-138 p.

Hsieh, S.L., Y.H. Ruan, Y.C. Li, P.S. Hsieh, C.H. Hu, y C.M. Kuo. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. (275): 335-341 p.

Huang, X., H. Zhou y 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 p.

Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa y N. Takeno. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*. (164): 277-288 p.

Jiravanichpaisal P., B.L. Lee y K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunology*. (211): 213-36 p.

Krieg, N. R. y J. G. Holt (Eds.) 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Primera edición. Baltimore. 964 pp.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz Lacierda y L.D. de la Peña. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*. (91): 1-13 p.

Leaño, E.M., C.R. Lavilla-Pitogo y M.G. Parner. 1998. Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture*. (164): 367-374 p.

Lee, S.Y., B.L. Lee y K. Söderhäll. 2003. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of Biological Chemistry*. (278): 7927-7933 p.

Lemos, D., V.N. Phan y G. Alvarez. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (261): 55-74 p.

- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. (191): 121-131 p.
- Li C.C., S.T. Yeh y J.C. Chen. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology*. (25): 853-60 p.
- Li C.C., S.T. Yeh y J.C. Chen. 2010. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and a low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology* (28): 121-27 p.
- Maldonado, M., J. Rodriguez, e I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *AquaTIC*. (21): 78-91 p.
- Martin, G.G., D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. McKrell, y A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. (62): 308-315 p.
- Martin, G.G., J. Kay, D. Poole y C. Poole. 1998. In vitro nodule formation in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*, an the American lobster, *Homarus americanus*. *Invertebrate Biology*. (117): 155-168 p.
- Martin, G.G., M. Quintero, M. Quigley y H. Khosrovian. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. (20): 209-217 p.
- Mercier, L., E. Palacios, A.I. Campa-Cordova, D. Tovar-Ramirez, R. Hernández-Herrera, e I.S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*. (258): 633-640 p.
- Michel, E.H. 2002. Taxonomía, Biología y Zoogeografía de los Peneidos de importancia comercial del Pacífico mexicano. Unidad Académica de Mazatlán. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. U.N.A.M. México. 153 pp.
- Montaño-Pérez, K. y F. Vargas-Albores. 2002. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*. (27): 21-27 p.
- Montaño-Pérez, K., A. Gómez-Gámez y F. Vargas-Albores. 2005. Different expression of *Litopenaeus vannamei* (Boone) haemocytes to *Vibrio* and abiotic particle inoculation. *Aquaculture Research*. (36): 912-919 p.

Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. Van der Knapp, E. Mialhe y E. Bachère. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. (191): 89-107 p.

Pascual, C., G. Gaxiola y C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*. (142): 735-745 p.

Pascual, C., L. Arena, G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela y C. Rosas. 2004. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture*. (230): 405-416 p.

Paterson, B. D. 1993. The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentration in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 B: 395-400.

Pérez, L., T. Rodríguez, L. Ramos, Y. Guerra e I.S. Racotta. 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*. (252): 591-597 p.

Racotta, I.S. y E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *The Journal of the World Aquaculture Society*. (29): 351– 356 p.

Rendón, L. y J.L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *AquaTIC*, (19): 27-33 p.

Rendón, L., M.A. Bravo, F. Echeverría y J. Rodríguez. 2004. ¿Puede la industria camaronera evaluar las sustancias inmunoestimulantes ofrecidas en el Mercado y establecer su uso correcto?. *Panorama Acuícola on line*. 2004-02-24. http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2004/02/24/_puede_la_industria_camaronera_evaluar_las_sustancias_inmunoestimulantes_ofrecidas_en_el_mercado_y_establecer_su_uso_correcto_.html

Reyes-Tisnado, R., G. Hernández-Carmona, F. López-Gutiérrez, E.J. Vernon-Carter y P. Castro-Moroyoqui. 2004. Alginatos de sodio y potasio extraídos del alga *Macrocystis pyrifera* para usos en materiales para impresión dental. *Ciencias Marinas*. (30): 189-199 p.

Rioux, L.E., S.L. Turgeon, y M. Beaulieu. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. (69): 530-537 p.

Rodríguez, J., R. Cedeño, C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela y M.A. Sotomayor. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V*.

Rodriguez, J. y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. (191): 109-119 p.

Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, Y. LePriol, C. Pascual, J. Rossignol, F. Contreras, A. Sánchez y A. VanWormhoudt. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (259): 1-22 p.

Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Taboada, L. Arena, y A. VanWormhoudt. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (268): 47-67 p.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac y C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*. (198): 13-28 p.

Scholnick, D.A., K.G. Burnett y L.E. Burnett. 2006. Impact of exposure to bacteria on metabolism in the Penaeid Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biology Bulletin*. (211): 44-49 p.

Sequeira T, D. Tavares y M. Arala-Chavez. 1996. Evidence for circulating hemocytes proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology*. (20): 97-104 p.

Smith, V.J., J.H. Brown y C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish Immunology*. (15): 71-90 p.

Soto-Rodríguez, S. A. 2002. Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis de Doctorado. CICESE, Ensenada, B. C., México. 278 pp.

Soto-Rodríguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizárraga-Partida, A. L. Guerra-Flores y B. Gómez-Gil. 2003. Virulence of luminous *Vibrios* to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*. (53): 231-240 p.

Soto-Rodríguez, S. A., N. Simoes, A. Roque y B. Gómez-Gil. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminiscent vibrios. *Aquaculture*. (258): 109-115 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* (De Man). *Comparative Biochemistry and Physiology*. (79A): 271-274 p.

Sung, H.H., G.H. Kou y Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*. (29): 11-17 p.

Thompson, F. L., I. Tetsuya y J. Swings. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3): 403-431 p.

Van de Braak C.B.T., M.H.A. Botterblom, N. Taverne, W.B. Van Muiswinkel, J.H.W.M. Rombout y WPW Van der Knaap. 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*. (13): 293-309 p.

Vargas-Albores, F. M.A. Guzmán & J.L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 106A: 299-303.

Vargas-Albores, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas, y G. Yepiz. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer symposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 433-439 P.

Vargas-Albores, F. 2002. Herramientas para determinar inmunoestimulación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo. México

Vetvicka, V., B. Dvorak, J. Vetvickova, J. Richter, J. Krizan, P. Sima y J.C. 2007. Orally administered marine (1-3) β -D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*. (40): 291-298 p.

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

Wang W. Y X. Zhang. 2008. Comparision of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*. (25): 522-527 p.

Yeh, S.T., C.S. Lee y J.C. Chen. 2006. Administration of hot-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 p.

Yeh, S.T. y J.C. Chen. 2009. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology*. (26): 724-730 p.

Yoganandhan, K., S. Thirupathi, y A.S. Sahul Hameed. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*. (221): 1-11 p.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. USA. 150 pp.

Zvyagintseva, T.N., N.M. Shevchenko, E.L. Nazarenko, V.I. Gorbach, A.M. Urvantseva, M.I. Kiseleva, y V. V. Isakov. 2005. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (320): 123-131 p.