



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



“Efecto del prebiótico inulina y el alga verde *Ulva lactuca* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

JUDITH CRISTINA ALMARAZ SALAS

GUASAVE, SINALOA. DICIEMBRE DE 2011.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave el día 11 del mes Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Judith Cristina Almaraz Salas alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091625, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Antonio Luna González y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto del prebiótico inulina y el alga verde *Ulva lactuca* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Judith_21_03@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Judith Almaraz S.
Judith Cristina Almaraz Salas
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

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

Guasave, Sinaloa, a 28 de septiembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión ordinaria No. 9 celebrada el día 8 del mes de septiembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Almaraz | Salas | Judith Cristina | | | | | | | |
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre (s) | | | | | | | |
| Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>6</td><td>2</td><td>5</td></tr></table> | | | B | 0 | 9 | 1 | 6 | 2 | 5 |
| B | 0 | 9 | 1 | 6 | 2 | 5 | | | |

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Efecto del prebiótico inulina y el alga verde *Ulva lactuca* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales".

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Evaluar el efecto de la inulina y *Ulva lactuca*, adicionados al alimento en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales.

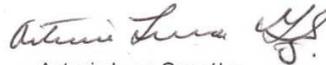
2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:
Dr. Antonio Luna González

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Departamento de Acuicultura del CIIDIR- SINALOA

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

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

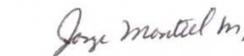
Director(a) de Tesis


Antonio Luna González

Aspirante


Judith Cristina Almaraz Salas

Presidente del Colegio


Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 10:00 horas del día 11 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis de titulada:

"Efecto del prebiótico inulina y el alga verde *Ulva lactuca* en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales"

Presentada por el alumno:

Almaraz
Apellido paterno

Salas
Apellido materno

Judith Cristina
Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | O | 9 | 1 | 6 | 2 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|

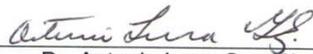
aspirante de:

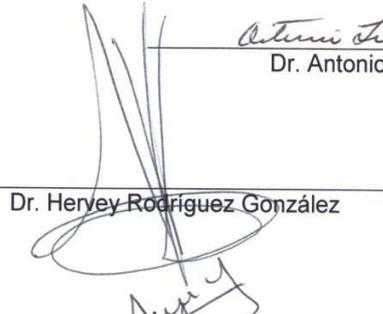
Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

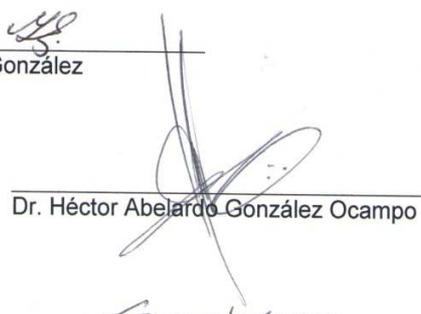
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

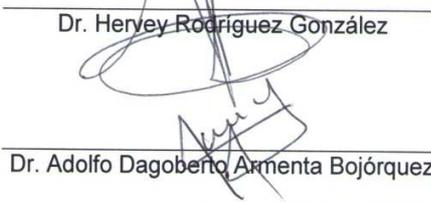
LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


Dr. Antonio Luna González

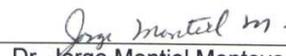

Dr. Hervey Rodríguez González


Dr. Héctor Abelardo González Ocampo


Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez


Dr. Gerardo Rodríguez Quiroz

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Acuacultura del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente a través del proyecto SIP (Con número de registro 20113638). El alumno/a Judith Cristina Almaraz Salas fue apoyado con una beca CONACYT con clave CVU 332318.

“Todo es posible hasta que se pruebe que es imposible. Y aun entonces, lo imposible puede serlo sólo por ahora”.

Pearl S. Buck

DEDICATORIAS:

Dedico esta tesis a la memoria de mi abuela: Carlota Méndez Zavala siempre estaré agradecida por haberte tenido conmigo y ser parte de ti.

A mi mamá, gracias por hacerme sentir que todo está bien, que puedo afrontar cualquier situación que se presente porque cuento con tu apoyo y amor. Te quiero mucho.

A mi papá, éste es un logro más que quiero compartir contigo. Gracias porque siempre, aunque lejos, has estado a mi lado.

Quiero dedicar esta tesis con especial cariño y admiración al Dr. Javier Orduña Rojas †, gracias por haberme aceptado como su alumna por confiar en mí y apoyarme, gracias por cada uno de sus comentarios en tutoriales y por sus palabras de ánimo. Fue un placer haberlo tenido como mi director de tesis.

A ti Señor Jesús porque pusiste los medios para que entrara a la maestría, porque tú eres quien abre puertas que nadie puede cerrar, por todo el amor con el que me rodeas y porque me tienes en tus manos. Esta tesis es para ti.



Judith.

“Tú guardarás en completa paz a aquel cuyo pensamiento en ti persevera; porque en ti ha confiado”

Isaías 26:3

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo no hubiera sido posible sin la participación de diversas personas que me han brindado su apoyo y me han estimulado durante su redacción. Aun a riesgo de olvidar a alguien, me gustaría citar de manera especial:

A mis directores de tesis: Dr. Antonio Luna González y Dr. Javier Orduña Rojas†. Gracias por la oportunidad que me dieron de trabajar y aprender de ustedes.

A los miembros que formó mi comité tutorial: Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez, Dr. Héctor Abelardo González Ocampo, Dr. Gerardo Rodríguez Quiroz, Dr. Heyvey González Rodríguez. Gracias por sus comentarios en cada tutorial los cuales me ayudaron a mejorar mi trabajo de tesis.

Al equipo técnico que me respaldó en la práctica de esta investigación: M.C. Jesús Arturo Fierro Coronado, Biol. Elysara López Álvarez, M.C. Ma. del Carmen Flores Miranda, Profe. José Pedro Villalobos Medina y al Biol. Luis Abraham Cota Gastélum. Muchas gracias por enseñarme.

Al equipo administrativo que me ayudo siempre con su mejor disposición en cada trámite, en especial este de titulación: Lic. Roberto Urías y Lic. Dorín Ortiz. Gracias.

También muy especialmente quiero agradecer a todos aquellos que me estuvieron dando su amistad, apoyo, ánimo y compañía durante el transcurso de la maestría, Mis amigos: Lucy, Raquel, Fátima, gracias plebes por brindarme su sincera y leal amistad, por sus consejos y palabras de ánimo siempre; Carlos y Abraham, gracias por permitirme conocerlos, por todas sus locuras que me hicieron reír, por todos los favores, por la paciencia que tuvieron conmigo, pero sobre todo gracias por aceptarme como su amiga es lo mejor que me llevo del CIIDIR espero contar con ello siempre.

Mis Hermanos: Alma, Alejandro y Gladis, los quiero mucho gracias por sus porras y su fe en mí y espero que se animen a realizar una maestría yo seré la primera en apoyar su decisión.

A ti Mario muchas gracias por tus consejos, ánimo y cariño que me diste todo este tiempo. Quiero que sepas que ocupas un lugar especial.

A mis compañeros del departamento de acuacultura y de generación. Gracias por su compañía.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| CONTENIDO | I |
| GLOSARIO | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE CUADROS | VIII |
| RESUMEN | IX |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 7 |
| 4. HIPÓTESIS | 8 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 8 |
| 5.1. Objetivos específicos | 8 |
| 6. METODOLOGÍA | 9 |
| 6.1. Colecta, transporte y mantenimiento de la granja (<i>L. vannamei</i>) | 9 |
| 6.2. Preparación de dietas..... | 9 |
| 6.2.1. Incorporación de <i>Ulva lactuca</i> al alimento balanceado | 9 |
| 6.2.2. Incorporación de inulina al alimento balanceado..... | 10 |
| 6.3. Análisis de mancha blanca..... | 10 |
| 6.4. Diseño experimental..... | 11 |
| 6.4.1. Evaluación y efecto de alimentos con aditivos en el crecimiento y supervivencia de los camarones en laboratorio | 11 |
| 6.4.1.1. Bioensayo 1: efecto de inulina adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 11 |
| 6.4.1.2. Bioensayo 2: efecto de <i>U. lactuca</i> adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 12 |
| 6.4.1.3. Bioensayo 3: efecto de inulina y <i>U. lactuca</i> adicionadas al alimento, en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune del camarón blanco | 12 |
| 6.5. Análisis de parámetros físico-químicos para determinar la calidad de agua .. | 12 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.6. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias ácidolácticas y levaduras | 13 |
| 6.7. Parámetros inmunológicos | 13 |
| 6.7.1. Obtención de hemolinfa..... | 13 |
| 6.7.2. Conteo y separación de hemocitos | 13 |
| 6.7.3. Medición de fenoloxidasa y profenoloxidasa | 13 |
| 6.8. Proteína..... | 14 |
| 6.9. Tasa de crecimiento específico | 14 |
| 6.10. Análisis estadístico | 15 |
| 7. RESULTADOS..... | 16 |
| 7.1. Evaluación del efecto de inulina adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 16 |
| 7.1.1. Bioensayo 1: efecto de inulina adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 16 |
| 7.1.2. Tasa de crecimiento específica | 17 |
| 7.1.3. Calidad del agua | |
| 7.1.3.1. Parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, nitritos, nitratos y amonio) | 17 |
| 7.1.4. Conteo de UFC/g de BAL y levaduras del intestino de camarón..... | 18 |
| 7.2. Evaluación del efecto de <i>U. lactuca</i> adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 19 |
| 7.2.1. Bioensayo 2: efecto de <i>U. lactuca</i> adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 19 |
| 7.2.2. Calidad de agua | 20 |
| 7.2.2.1. Parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, nitritos, nitratos y amonio) | 20 |
| 7.3. Evaluación del efecto inulina y <i>U. lactuca</i> adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco | 21 |
| 7.3.1. Bioensayo 3: efecto de inulina y <i>U. lactuca</i> adicionadas al alimento, en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune del camarón blanco | 21 |
| 7.3.2. Calidad del agua | 22 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.3.2.1. Parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, nitritos, nitratos y amonio) | 22 |
| 7.3.4. Determinación de parámetros inmunológicos | 23 |
| 7.3.4.1. Conteo de hemocitos..... | 23 |
| 7.3.4.2. Actividad de la profenoloxidasa (FO tot)..... | 24 |
| 7.3.4.3. Actividad de la fenoloxidasa (FO)..... | 25 |
| 7.3.4.4. Actividad de la fenoloxidasa en plasma..... | 26 |
| 8. DISCUSIÓN | 28 |
| 9. CONCLUSIONES | 31 |
| 10. REFERENCIAS..... | 32 |

GLOSARIO

Acuicultura: Conjunto de técnicas y actividades cuyo objetivo es la cría en cautiverio de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos, reptiles o algas) en agua cuyo mayor o menor carácter intensivo depende del grado de intervención del hombre en los ciclos biológicos de los organismos en cuestión.

Antibiótico: [Gr. anti, contra + bios, vida]: un compuesto orgánico, inhibidor o tóxico para otras especies, por lo general bacterias, que es formado y secretado naturalmente por un organismo.

Bacteria: Organismo unicelular procariota, que se presenta en varias formas (esférica, bastón o espiral). Algunas bacterias provocan enfermedades, pero muchas son benéficas.

Camaronicultura: Es el cultivo de las diferentes especies de camarones que se lleva a cabo en aéreas costeras.

Coagulación: Proceso en el cual intervienen distintos factores o sustancias (factores de la coagulación) por el cual se forma una placa o coágulo.

Cutícula: [Lat. cutícula, dim. de cutis, piel]: 1. En las plantas, una capa de sustancia cerosa (cutina) de la superficie externa de las paredes de las células epidérmicas. 2. En los animales, la capa no celular más externa de muchos invertebrados.

Dry Oil®: Atractante y ligante para alimentos destinados a la acuicultura fabricado a base de aceites de pescado deshidratado.

Emulsificante: Agente que genera una emulsión, mezcla entre sustancias que no se incorporan sin este elemento. La característica de una emulsión es la formación de microesferas. Sinónimo emulgente.

Enfermedad: Término amplio que se utiliza para designar el daño de células suficiente para causar difusión en el organismo. Una enfermedad puede ser causada por defectos genéticos reflejados en una normal estructura y función celular, desbalance nutricional que priva a las células de nutrientes esenciales, agentes químicos o físicos que lesionan las células o, agentes infecciosos que dañan las células por su acción fisiológica o presencia física.

Enzima: Biomolécula que cataliza una reacción química específica, fundamentalmente una proteína.

Fagocitosis: Capacidad de algunas células de destruir las bacterias o agentes nocivos para el organismo.

Fructooligosacaridos: Es un oligosacárido lineal formados por 10-20 monómeros de fructosa, unidos por enlaces β (1 \rightarrow 2) y que contienen una molécula inicial de glucosa. Un ejemplo típico de fructooligosacarido es la 1-ketosa.

Gen: En biología molecular, segmento de DNA o RNA que normalmente contiene una región promotora, una región que se transcribe y una región con una señal de terminación de lectura.

Hemocito: Célula de la hemolinfa de los invertebrados.

Hemolinfa: Líquido circulatorio de los artrópodos, moluscos, etc. Análogo de la sangre de vertebrados. Su composición varía mucho de una especie a otra. Puede ser de diferentes colores o incluso incolora; los pigmentos pueden proceder de la alimentación o de los procesos metabólicos y no tienen ninguna función biológica, ya que en el transporte de gases es independiente del aparato circulatorio.

Inulina: El nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas moleculares de fructosa. Es, por lo tanto, un fructosano o fructano, que se encuentran generalmente en las raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas (Bardana, achicoria, diente de león, yacón, etc.) como sustancia de reserva. Forma parte de la fibra alimentaria. Su nombre procede de la primera planta que se aisló en 1804, el helenio (*Inula helenium*).

Palatabilidad: Esta palabra viene de “palatable” que significa gustoso, sabroso, es decir, que palatabilidad significaría: gustosidad, sabrosidad. También puede ser el conjunto de características organolépticas de un alimento, independientemente del valor nutritivo, que hacen que para una determinada persona dicha comida sea más placentera o menos placentera. Esto es subjetivo de cada persona, y depende de la experiencia previa de cada persona.

Patógeno: Cualquier organismo que puede causar enfermedades o iniciar un proceso patológico.

PCR (Siglas del Inglés Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa): Metodología utilizada para producir múltiples copias de fragmento de DNA molde, anillamiento con oligonucleótidos específicos y extensión de los mismos por medio de una DNA polimerasa termotolerante.

Prebiótico: Ingredientes alimentarios no digeribles que promueven la salud del huésped al estimular selectivamente el crecimiento y la actividad de una bacteria benéfica o un grupo de ellas en el tracto digestivo.

Probiótico: Se considera alimento probiótico aquel que contiene microorganismos vivos presentes en un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos, se define como un suplemento microbiano formado por un cultivo simple o mixto de microorganismos seleccionados que son adicionados con el propósito de manipular las poblaciones bacterianas presentes en los sistemas de producción.

Síndrome: Combinación de síntomas que dan como resultado un solo efecto que constituye una entidad clínica diferente.

Vibrio: Género de bacterias, incluidas en el grupo gamma de las proteobacterias varias de las especies de *Vibrio* son patógenas, provocando enfermedades del tracto digestivo, en especial *V. cholerae*, el agente que provoca el cólera, y *V. vulnificus*, que se transmite a través de la ingesta de marisco. Además de estos, existen varias especies marinas bioluminiscentes, tanto de vida independiente como simbiótica o parasitaria. Las especies de género *Vibrio* son invariablemente bacilos Gram negativos, de entre 2 y 3 µm de largo, dotados de un único cilio que les permite una elevada movilidad. Soportan bien los medios alcalinos, así como las concentraciones salinas.

Virus: Agente infeccioso a celular, con una organización muy simple, formada por un complejo de proteína, la cápside y un solo tipo de ácido nucleico (DNA o RNA), carece de metabolismo independiente y solo se puede replicar en una célula hospedera.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Primer bioensayo. Supervivencia final de <i>Litopenaeus vannamei</i> | 16 |
| Figura 2. Porcentaje de prevalencia de los camarones infectados con WSSV | 17 |
| Figura 3. Segundo bioensayo. Supervivencia final de <i>L. vannamei</i> | 20 |
| Figura 4. Tercer bioensayo. Supervivencia final de <i>L. vanamei</i> | 22 |
| Figura 5. Promedio de hemocitos al final del bioensayo tres..... | 24 |
| Figura 6. Actividad de fenoloxidasa proFO total de cada tratamiento al final del bioensayo tres | 25 |
| Figura 7. Actividad de fenoloxidasa FO SLH de cada tratamiento al final del bioensayo tres | 26 |
| Figura 8. Actividad de fenoloxidasa FO plasma de cada tratamiento al final del bioensayo tres | 27 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 18 |
| Cuadro 2. Concentración de nitritos, nitratos y amonio (mg/L) del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 18 |
| Cuadro 3. Conteo de UFC de BAL y levaduras en un gramo de intestino de <i>Litopenaeus vannamei</i> | 19 |
| Cuadro 4. Segundo bioensayo. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 20 |
| Cuadro 5. Segundo bioensayo. Concentración de nitritos, nitratos y amonio (mg/L) del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 21 |
| Cuadro 6. Tercer bioensayo. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 22 |
| Cuadro 7. Tercer bioensayo. Concentración de nitritos, nitratos y amonio (mg/L) del agua de los tratamientos del sistema de cultivo | 23 |

RESUMEN

El cultivo del *Litopenaeus vannamei* es una actividad productiva muy importante en el noroeste de México. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto prebiótico inulina y el alga verde *Ulva lactuca* en el crecimiento (TCE), supervivencia y sistema inmune de *L. vannamei*, cultivado en el laboratorio. En los bioensayos se utilizaron tinas de plástico con 80 L de agua de mar, aireación constante y 10 organismos/tina. Se adicionó la inulina y la macroalga en el alimento (Camaronina®, 35% de proteína). La alimentación se realizó *ad libitum* dos veces al día, la limpieza, diario y la determinación de parámetros fisicoquímicos cada 3 días. La calidad del agua y el registro del peso de los organismos se realizaron al inicio y al final de cada bioensayo. Se determinó la tasa de crecimiento específico. En los bioensayos los tratamientos fueron por triplicado. **Bioensayo 1 (62 días, camarones de 1.1 ± 0.08 g)**: I) dieta control (Camaronina); II) Camaronina + 1.25 g de inulina/kg de alimento; III) Camaronina + 2.5 g/kg; IV) Camaronina + 5 g/kg de alimento; V) Camaronina + 10 g/kg de alimento. Al final del bioensayo se realizó una PCR para la detección del WSSV y un conteo de UFC/g de BAL y levaduras del intestino de camarón. **Bioensayo 2 (46 días, camarones de 0.9 ± 0.05 g)**: 1) Control, Camaronina + DO; 2) Camaronina + *Ulva* (50 g/kg de alimento); 3) Camaronina + *Ulva* (100 g/kg de alimento); 4) Camaronina + *Ulva* (150 g/kg de alimento) y; 5) camaroina + *Ulva* (200 g/kg de alimento). **Bioensayo 3 (73 días, camarones de 1.09 ± 0.07 g)**: I) control (Camaronina); II) 2.5 g de inulina + 20% *Ulva*/kg de alimento; III) 2.5 g de inulina/kg de alimento (del tratamiento 1); IV) 20% *Ulva*/kg de alimento (del tratamiento 2). Se hizo un conteo total de hemocitos y se determinó la actividad de la fenoloxidasa en plasma y profenoloxidasa en el sobrenadante del lisado de hemocitos. Los resultados se analizaron estadísticamente. La inulina no incrementó claramente el número UFC de BAL y levaduras en el intestino. La inulina y la macroalga no afectaron el crecimiento de los camarones, pero la inulina disminuyó la prevalencia de WSSV. El efecto de la macroalga contra WSSV no se determinó. La combinación de inulina y *U. lactuca* aumentó significativamente el número de hemocitos pero no aumentó la actividad de la fenoloxidasa en los camarones. La inulina sí aumentó significativamente la actividad de la fenoloxidasa.

ABSTRACT

The culture of *Litopenaeus vannamei* is a very important productive activity in northwestern Mexico. In this research we evaluated the prebiotic inulin and the green algae *Ulva lactuca* in the growth, survival and immune system of *L. vannamei*, cultured in the laboratory. In the bioassay were used plastic tanks with 80 L of sea water, constant aeration and 10 shrimp/tank. Inulin and macroalgae were added to the feed (Cameronina[®], 35% protein). Feeding was done *ad libitum* twice a day, daily cleaning was done and determination of physicochemical parameters every 3 days. Water quality and weight determination were carried out at the beginning and end of the bioassay. We determined the specific growth rate. The three bioassays were performed in triplicate. **Bioassay 1** (62 days, 1.1 ± 0.08 g): I) control diet (Cameronina); II) Cameronina + 1.25 g inulin/kg feed; III) Cameronina + 2.5 g inulin/kg feed, IV) Cameronina + 5 g inulin/kg feed; V) Cameronina + 10 g inulin/kg feed. At the end of the bioassay a PCR was performed to detect WSSV and intestine LAB and yeast were counted. **Bioassay 2** (46 days, 0.9 ± 0.05 g): 1) control, Cameronina + DO; 2) Cameronina + *Ulva* (50 g/kg feed), 3) Cameronina + *Ulva* (100 g/kg feed), 4) Cameronina + *Ulva* (150 g/kg feed), and 5) Cameronina + *Ulva* (200 g/kg feed). **Bioassay 3** (73 days, 1.09 ± 0.07 g): I) control (Cameronina); II) 2.5 g inulin + 20% *Ulva*/kg feed; III) 2.5 g inulin/kg feed (bioassay 1); IV) 20% *Ulva*/kg feed (bioassay 2). Total hemocyte count and the activity of phenoloxidase (PO) in plasma and prophenoloxidasas (proPO) in the hemocyte lysate supernatant (HLS) were determined. The results were statistically analyzed. Inulin did not increase the number of LAB and yeast in the intestine. Inulin and macroalgae did not affect the growth of shrimp, but the inulin decreased the prevalence of WSSV. The effect of macroalgae against WSSV was not determined. The combination of inulin and *U. lactuca* significantly increased the number of hemocytes but did not increase phenoloxidase activity in shrimp. Inulin significantly increased the activity of phenoloxidase.

1. INTRODUCCIÓN

La camaronicultura se ha incrementado constantemente en las últimas décadas, proporcionando actualmente la mitad del suministro mundial de este crustáceo (Goarant *et al.*, 2006). En México la producción de camarón en el 2009 alcanzó un volumen total de 196,456 t en peso vivo; de esa cifra, la producción proveniente de la actividad acuícola representó el 67.84% (CONAPESCA, 2009). Sin embargo, los organismos bajo cultivo son susceptibles a diferentes agentes patógenos como bacterias y virus como el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), el virus de la necrosis hipodermal y hematopoyética (IHHNV, por sus siglas en inglés) y el virus del síndrome del Taura (TSV, por sus siglas en inglés) (FAO, 2002). Respecto al WSSV este ha causado una disminución importante en la producción de camarón en distintos países (Aguirre-Guzmán, 2004).

El camarón, posee dos líneas de defensa contra éstos patógenos. La primera es la cutícula que constituye una barrera física que impide la entrada del patógeno al organismo. La segunda consiste en mecanismos celulares y humorales. Dentro de esta última, se encuentran las células de la hemolinfa o hemocitos, que se dividen en tres categorías de acuerdo a su morfología. Los hemocitos hialinos que no presentan gránulos citoplasmáticos y participan en la coagulación y fagocitosis de partículas extrañas o células envejecidas del propio organismo. Los hemocitos semigranulares y granulares que poseen gránulos citoplasmáticos (mayor número en granulares) y participan en los procesos de encapsulación y nodulación, cuando un cuerpo extraño, que no puede ser fagocitado, es rodeado por hemocitos que lo contienen y evitan su expansión. Los gránulos contienen péptidos antimicrobianos, enzimas lisosomales y el sistema profenoloxidasa. Los mecanismos humorales parecen tener mayor actividad contra patógenos bacterianos y fúngicos, que contra los virales. El sistema profenoloxidasa (proPO) actúa oxidando fenoles para producir quinonas, las cuales darán origen a la melanina que inhibe la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas. Los péptidos antimicrobianos o peneidinas son proteínas con actividad antibacteriana

(principalmente contra bacterias Gram positivas) y antifúngica (Rendón y Balcázar, 2003; Maldonado *et al.*, 2004; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Wang y Zhang, 2008).

El sistema inmune juega un papel importante en la defensa contra virus aunque no es el único factor que determina la presencia o ausencia de una patología cuyo estallido puede ser influenciada por diversos factores, expresados dentro de la llamada “triada epidemiológica” en el que la enfermedad es el resultado final de una compleja interacción entre el camarón, su ambiente y el patógeno (Lightner y Redman, 1998; Lemonnier *et al.*, 2006).

El uso tradicional de antibióticos ha sido criticado por el desarrollo potencial de bacterias resistentes a los antibióticos, por la presencia de residuos de los mismos en productos del mar, la destrucción de las poblaciones microbianas en el ambiente acuícola, y la supresión del sistema inmunológico de los animales acuáticos. Una estrategia alternativa al uso de antibióticos en el manejo de enfermedades acuáticas, son los probióticos en la acuicultura que han mostrado una aplicación exitosa en el medio acuático. Debido al costo, el impacto potencial sobre el medio ambiente, cuestiones de reglamentación y seguridad de los productos, la aplicación a gran escala de los probióticos ha sido limitada (Gatesoupe, 1999; Irianto y Agustín, 2002). Los prebióticos se definen como ingredientes no digeribles que afectan de manera positiva al hospedero estimulando el crecimiento o la actividad de un número limitado de bacterias benéficas en tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995) la inulina es un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales, frutas y cereales. La inulina y sus derivados (oligofruktosa, fructooligosacáridos) son generalmente llamados fructanos, que están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa. En humanos, los prebióticos tienen un efecto benéfico como aporte de fibra dietética, bajo valor calórico, hipoglicemiante, mejorador de la biodisponibilidad de calcio y magnesio. Se han presentado evidencias promisorias de su actuación en el refuerzo de la respuesta inmune y protección contra desórdenes intestinales. En una amplia variedad de productos alimenticios se usa la inulina y sus derivados como: espesante, emulsificante, gelificante, sustituto de azúcares y de grasas, humectante, depresor del punto de congelación, etc. (Madrigal y Sangronis, 2007).

Las algas ulvales (Chlorophyta) son algas distribuidas en todo el mundo. Los dos géneros principales *Ulva* y *Enteromorpha* contienen Ulván en su pared celular, el cual es un polisacárido sulfatado. El Ulván y sus oligosacáridos tienen actividad antitumoral y actividades de modulación inmunitaria. La degradación de los oligosacáridos de Ulván podría ser beneficiosa para estimular las defensas contra las enfermedades de los animales. El Ulván de *U. rigida* puede estimular los macrófagos y contribuir a la resistencia a enfermedades en los peces (Lahaye y Robic, 2007).

Las algas, por su composición nutricional, pueden ser utilizadas como insumo en la sustitución parcial de la harina de pescado. Si bien el contenido proteico no es más alto que algunas plantas terrestres, este podría ser incrementado sometiendo a las algas a pulsos de nitrógeno (Jones *et al.*, 1995). Los compuestos algales pueden también tener efectos beneficiosos sobre la salud de los peces, similares a los efectos positivos sobre el sistema inmunológico en humanos y el sistema de defensa en las plantas (Werner *et al.*, 2004).

Otro importante uso de las algas, es la obtención de carragenina, alginato y agar, espesantes y gelificantes que constituyen la base principal del uso industrial de las algas, ya sea en el área textil, alimentaria, papelera, farmacéutica, cosmética, y de productos dentales, etc. (Cruz-Suárez *et al.*, 2000; McHugh, 2002).

En el presente trabajo de investigación se estudió el efecto de aditivos alimenticios en el crecimiento, supervivencia y capacidad inmune en *Litopenaeus vannamei*, cultivado en el laboratorio.

2. ANTECEDENTES

Li y Gatlin (2005) utilizaron suplementos dietéticos como inmunoestimulante y prebióticos para mantener la salud de los peces y mediante un ensayo de 21 semanas para evaluar el producto comercial GroBiotic[®]-A que es una mezcla de levadura de cerveza, leche en polvo y productos fermentados adicionados al alimento. Los peces alimentados con dietas suplementos alimenticios tuvieron el mayor crecimiento.

Ringo *et al.* (2006) evaluaron la población de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas en el intestino del pez *Salvelinus alpinus*, alimentado con dextrina e inulina obteniendo 217 aislamientos bacterianos identificados por las principales características fenotípicas y bioquímicas identificando 22 cepas mediante la secuenciación parcial del 16S rRNA gen de las bacterias que colonizan el intestino grueso alimentados con dextrina estaba dominado por los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Psychrobacter glacincola* y *Streptococcus* los resultados en el intestino grueso de los peces alimentados con inulina *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* y *Bacillus* y *Carnobacterium divergens* fue similar en las cepas que fueron aisladas del intestino grueso de los peces alimentados con inulina como con dextrina. El análisis microscópico de electrones de las regiones del intestino grueso se observaron un menor número de células bacterianas entre las microvellosidades asociadas a las superficies de los enterocitos de los peces alimentados con inulina en lugar de dextrina.

Zhou *et al.* (2007) evaluaron, en juveniles de *L. vannamei*, alimento adicionado con fructooligosacáridos (FOS, prebiótico) de cadena corta (ScFOS, Profeed[®] 95%) en concentraciones de 0, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 g/kg. Se obtuvo un crecimiento significativo de las bacterias benéficas del intestino en la concentración de 0.4-0.8 g/kg. Así mismo, se obtuvo un efecto benéfico en el camarón estimulando el crecimiento y la conversión de alimento, siendo la adición de 0.4 g/kg la de mejor resultado.

Li *et al.* (2007) evaluaron durante 6 semanas, en juveniles de *L. vannamei*, alimentos adicionados con fructooligosacáridos (FOS) al 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2,

0.4 y 0.8%. La comunidad bacteriana en el intestino de camarones alimentados con FOS fue similar en las diferentes concentraciones, pero diferente respecto al tratamiento sin FOS (control). Los FOS adicionados no influyeron significativamente en el crecimiento y la supervivencia. En el sistema inmune, hubo un aumento en el número de hemocitos y la actividad de la enzima fenoloxidasa en los tratamientos con FOS respecto al control, pero no fue significativo; sin embargo, sí se observó un aumento significativo en la actividad fagocítica de los hemocitos.

Partida-Arangure (2009) probó una mezcla de inulina más bacterias con la inmunoestimuló a los camarones aumentando significativamente el número total de hemocitos presentándose un aumento en la actividad de la enzima lisosomal N-acetil- β -glucosaminidasa. El número de BAL en el intestino fue alto en los tratamientos con inulina sola e inulina con bacterias. También observó una alta supervivencia y una disminución en la prevalencia de WSSV en los camarones tratados con inulina, bacterias y levaduras.

En cuanto a la utilización de las algas en la alimentación de especies acuícolas, Cruz-Suárez, *et al.* (2000). Realizó una investigación con harina de *kelp* en alimentos para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde evaluaron el efecto de la inclusión de 2% y 4% de harina sobre diferentes parámetros zootécnicos en el camarón blanco, se midió el consumo de alimento, ganancia en peso, tasa de crecimiento, conversión alimenticia, digestibilidad, entre otros. Ellos observaron que la inclusión de harina de *kelp* en los alimentos aumentó al doble el consumo, el crecimiento y la biomasa, así como la digestibilidad de la materia seca. Además, los pellets aumentaron significativamente su capacidad de absorción de agua. Con todo esto concluyeron que la inclusión de harina de *kelp*, en un 2 y 4% en alimentos pelletizados para camarón, resulta ser un excelente aditivo attractante, aglutinante y texturizante, lo que permite la utilización más eficiente de los nutrientes en la dieta.

Otra investigación realizada por Takahashiet *et al.* (1998). Determinó el efecto de la inclusión de algas en alimentos el camarón (*Penaeus japonicus*), demostrando la eficacia de la administración oral del fucoidán, que es un polisacárido sulfatado extraído del alga café *Cladosiphon okamuranos*, a concentraciones de 60 y 100 mg semipuro por kilo de camarón por día, para el control del virus del síndrome de la

mancha blanca (WSSV), obtuvieron sobrevivencias del 76 y 77% comparado con un 0% obtenido en el control. Con esto se concluyó que el fucoidán inhibe la adsorción del WSSV en las células del camarón, previniendo de esta forma la infección y posterior desarrollo de la enfermedad.

Casas-Valdez, *et al.* 2006. Evaluó el efecto de *Sargassum* spp. Sobre parámetros productivos y concentración de colesterol en camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*), realizando dos dietas: una comercial y otra que incluyo 4% de harina de alga; al concluir el bioensayo no observaron diferencias significativas ($P>0.05$) en cuanto ganancia de peso, talla, tasa de supervivencia y factor de conversión alimenticia entre los dos tratamientos; en cuanto a las concentraciones de colesterol en los camarones alimentados con la alga observaron una reducción significativa comparada con la dieta testigo. Los resultados que obtuvieron les permitió concluir que 4% de harina de *Sargassum* spp. Puede ser incorporada a alimentos balanceados para camarón café sin causar efectos negativos.

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón es un producto de gran demanda y alto valor económico. En México, este crustáceo ocupa el segundo lugar de exportación su cultivo en los últimos años se ha visto obstaculizado por la aparición de enfermedades de etiología infecciosa.

Esta situación ha provocado el uso irracional de antibióticos y compuestos químicos (hormonas y algunas sales) para la solución del problema, trayendo consigo la aparición de cepas patógenas resistentes y problemas ambientales. En esta investigación se propone por una parte el uso del prebiótico inulina como nutriente para estimular el desarrollo de las bacterias del tracto digestivo del camarón, y por otra parte el alga verde (*Ulva lactuca*), para mejorar el crecimiento y la salud de los organismos. *U. lactuca* tiene un potencial económico por su amplia distribución y abundancia en las costas permitiendo así la elaboración de harina para sustitución de proteína animal de alimentos comerciales, disminuyendo los costos de producción.

4. HIPÓTESIS

La adición de inulina y *Ulva lactuca* en el alimento mejorará el crecimiento, la supervivencia y la capacidad inmune de *L. vannamei*.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inulina y *Ulva lactuca*, adicionados al alimento, en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *L. vannamei*, cultivado en condiciones experimentales.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar el efecto de la inulina y *Ulva lactuca*, adicionados en el alimento, en el crecimiento y la supervivencia de camarones blancos cultivados en el laboratorio.

-Determinar el efecto de la inulina y *Ulva lactuca*., adicionados en el alimento, en el sistema inmune de camarones blancos cultivados en laboratorio.

6. METODOLOGÍA

6.1. Colecta, transporte y mantenimiento de camarones de granja

Se colectaron 150 camarones (0.8-1.0 g) para los dos primeros experimentos y 120 camarones (1.0 g), para el tercer experimento, de la granja Cuate Machado, ubicada frente a playa Las Glorias (25°19'6.14" N 108°29'37.87" O), municipio de Guasave, Sinaloa. Los animales fueron transportados al patio de cultivo del Laboratorio de Acuicultura del CIIDIR-IPN (Unidad Sinaloa), donde se aclimataron colocándolos en tinas de plástico de 120 L con 80 L de agua de mar filtrada (20 µm) con una salinidad entre 30-35‰, disminuyendo o aumentando (2‰/h) según fuera necesario. Los animales se mantuvieron a temperatura ambiente y con aireación constante.

6.2. Preparación de las dietas

6.2.1. Incorporación de *Ulva lactuca* al alimento

Las macroalgas fueron colectadas en la Bahía de Navachiste y se secaron al sol en el Laboratorio de Acuicultura. Una vez que estaban secas se procedió a molerlos en un molino Thomas-Willey para obtener una harina con tamaño de grano de 450 µm. Para la incorporación de la macroalga al alimento se preparó una mezcla de la harina de *U. lactuca* con harina de alimento comercial (molido de la misma manera que la macroalga), en grenetina con agua destilada formando una masa que fue procesada en un molino para carne para la formación de los pellets se preparó alimento para 60 días y se almacenó a -20 °C. Para el control sin *U. lactuca* el alimento se impregnó de grenetina. Es importante mencionar que la macroalga (en porcentaje) se sustituyó por un determinado porcentaje de alimento comercial. No se elaboró una dieta como tal con la macroalga sustituyendo la harina de pescado.

6.2.2. Incorporación de la inulina al alimento balanceado

La inulina de agave tequilero se obtuvo de una empresa comercial (IIDEAL, S. A. de C.V., Guadalajara, Jalisco) y se incorporó al alimento por aspersión, mezclando manualmente para una adicción homogénea diluida en Dry Oil[®] (DO) con agua destilada (10 ml). Se preparó alimento para 10 días y se almacenó a 4 °C. Se impregnó de DO el alimento para el control sin inulina.

6.3. Análisis de mancha blanca

La extracción del ADN se hizo con 100 mg de tejido de pleópodos de camarón con el reactivo DNAzol (Invitrogen[®]). Los oligonucleótidos que se utilizaron en el PCR sencillo son, WSSV1: 5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3' y WSSV2: 5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3', y para el anidado WSSV1 in (sentido) 5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC 3' y WSSV2 in (contrasentido) 5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG 3' (Kimura *et al.*, 1996), que amplifican un fragmento de 982 pb y 570 pb, respectivamente. La mezcla de reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL e incluyó 18.75 µL de H₂O; 2.5 µL de búfer de reacción 10X (Bioline); 1.0 µL de MgCl₂ (50 mM; Bioline); 0.5 µL de dNTPs (100 µM; Bioline); 0.5 µL de cada oligo (10 mM cada uno; Sigma-Genosys) y 0.25 µL de Taq polimerasa (5 U/µL; Bioline) y 1 µL de DNA total para un volumen total de 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador Tpersonal (Biometra) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C, por 4 min, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C, por 4 min. Los fragmentos amplificados se visualizaron (incluido un marcador de peso molecular de 1 kb) en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV. En el PCR anidado se redujo a 45 s el tiempo de polimerización a 72 °C.

6.4. Diseño experimental

6.4.1. Evaluación y efecto de alimentos con aditivos en el crecimiento y supervivencia de camarones cultivados en laboratorio

Los organismos obtenidos de la granja comercial se aclimataron durante tres días en el sistema de cultivo que consistía en tinas ovaladas de plástico (120 L) con 80 L de agua de mar filtrada (20 μm), con una salinidad entre 30-35 ‰. Los animales se alimentaron con Camaronina[®] a razón de 7.0 % del peso corporal en dos raciones, una a las 09:00 y otra a las 17:00 h. Se realizó un recambio del 50 % de agua de mar cada cinco días. La limpieza de la materia particulada del fondo de las tinas se hizo diariamente por sifoneo. El volumen de agua perdido por la limpieza diaria se recuperó inmediatamente. Se colocaron 10 organismos por tina al azar. Los tratamientos se hicieron por triplicado. Al final de cada bioensayo se registraron la supervivencia y el peso. El análisis de la presencia o ausencia de WSSV sólo se realizó en el bioensayo uno. En el bioensayo dos no se hicieron debido a que en el cultivo la temperatura estuvo por arriba del intervalo óptimo según Brock y Main (1994). Al finalizar el cultivo se realizó un conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC) del intestino de los camarones.

6.4.1.1. Bioensayo 1: Efecto de la inulina, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

Se utilizaron camarones con peso promedio de 1.1 ± 0.08 g, se realizó el análisis para mancha blanca al final del bioensayo, no se determinó previamente si venían infectados con WSSV desde la granja. El bioensayo tuvo una duración de 62 d y constó de cinco tratamientos por triplicado: 1) Control, Camaronina + DO; 2) Camaronina + inulina (1.25 g/kg de alimento); 3) Camaronina + inulina (2.50 g/kg de alimento); 4) Camaronina + inulina (5 g/kg de alimento) y; 5) Camaronina + inulina (10 g/kg de alimento).

6.4.1.2. Bioensayo 2: Efecto de *U. lactuca*, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

El segundo bioensayo se utilizaron organismos con un peso de 0.9 ± 0.05 tuvo una duración de de 46 días g. El bioensayo consistió de cinco tratamientos por triplicado: 1) Control, Camaronina + DO; 2) Camaronina + *Ulva* (50 g/kg de alimento); 3) Camaronina + *Ulva* (100 g/kg de alimento); 4) Camaronina + *Ulva* (150 g/kg de alimento) y; 5) Camaronina + *Ulva* (200 g/kg de alimento).

6.4.1.3. Bioensayo 3: Efecto de inulina y *U. lactuca*, adicionadas en el alimento, en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de camarón blanco

Se utilizaron camarones de 1.09 ± 0.07 g. Este bioensayo tuvo una duración de 73 días y constó de cuatro tratamientos por triplicado: 1) control, Camaronina + DO; 2) mezcla, Camaronina + inulina (2.50 g/kg de alimento) + *U. lactuca* (200 g/kg de alimento); 3) Camaronina + inulina (2.50 g/kg de alimento) y; 4) Camaronina + *Ulva lactuca* (200 g/kg de alimento). Al finalizar el cultivo se midieron los parámetros inmunológicos.

6.5. Análisis de parámetros fisicoquímicos para determinar la calidad de agua

En los tres bioensayos se determinó los parámetros fisicoquímicos como la temperatura, el oxígeno, la salinidad y el pH de cada tina. La medición de los parámetros se hizo cada tercer día.

Al inicio y al final de cada uno de los tres bioensayos se determinaron la cantidad de nitritos, nitratos y amonio presentes en el agua de cada una de las tinas experimentales, la toma de la muestra de agua se hizo antes del primero y el último recambio. Para la toma de cada muestra de agua se utilizó una botella de plástico de boca ancha de 250 ml. la botella se sumergió a una profundidad media de la tina, quitando la manguera de aireación. El análisis se hizo por métodos químicos Strickland y Parsons, 1972.

6.6. Cuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias ácidolácticas (BAL) y levaduras

La extracción de intestino se realizó en juveniles de *L. vannamei*. Cada muestra de intestino se pesó y maceró individualmente en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina (NaCl 2 %) estéril. Para el macerado se utilizó un homogenizador Pellet Pestle motor (Kontes, NY, USA). Del macerado de intestino se realizó una siembra (1 μ L) por esparcimiento en cajas de Petri con Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) con 1.5 % de NaCl y con el medio de Man Rogosa y Sharpe (MRS, Difco) con 2.5 % de NaCl y 200 mg/L de Azul de Anilina, incubándose a 37 °C, por 24 h.

6.7. Parámetros inmunológicos

Se realizó al final del tercer bioensayo la medición de parámetros inmunológicos, los cuales se describen a continuación.

6.7.1. Obtención de la hemolinfa

La extracción de hemolinfa se realizó durante el periodo de intermuda. La hemolinfa fue extraída con jeringas para insulina (27G x 13 mm) de la parte ventral que comprende el primer segmento de los pleópodos, ligeramente anterior al poro genital. La jeringa se cargó con una solución isotónica para camarón y EDTA como anticoagulante (SIC- EDTA, Na₂) (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA, Na₂ 10 mM, pH 7.3, 850 mOsm/kg) previamente enfriado a 4 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1993) en una proporción 1:3 (1 volumen de hemolinfa por tres volúmenes de SIC-EDTA).

6.7.2. Cuento y separación de hemocito

Se utilizó una cámara de Neubauer con una retícula de 0.01 mm. Para el conteo se tomaron 50 μ L de hemolinfa y se diluyeron en 150 μ L de formol al 4 % (1:3). A partir de esta dilución se realizaron los conteos en el microscopio colocando 15 μ L de la muestra. El número de hemocitos por mililitro se calculó con la siguiente fórmula:

Células/mL= [(Células contadas/# de cuadros contados) x 10 000] [Factor de dilución]

Para separar los hemocitos del plasma y medir la fenoloxidasa, se centrifugó la muestra a 800 x g, por 5 min, a 4 °C. Se separó el plasma del paquete celular. Las células se lavaron con 1 mL de SIC y se centrifugó a 800 x g, por 5 min, a 4 °C. Se adicionaron 300 µL de cacodilato de sodio 10 mM (pH 7) y se centrifugó a 14 000 x g, durante 10 min, a 4 °C, para romper las células y obtener el contenido celular, sobrenadante del lisado de hemocitos, (SLH). El SLH y el plasma se utilizaron inmediatamente para los análisis de profenoloxidasa (proFO) y fenoloxidasa (FO) y se congelaron a -70 °C para la determinación de enzimas hidrolíticas y proteína.

6.7.3. Medición de fenoloxidasa y profenoloxidasa

La medición de la proFO y la FO se realizó con la técnica descrita por Hernández-López *et al.* (1996). La actividad de la FO presente en el plasma se determinó espectrofotométricamente por la formación de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa). A 50 µL de muestra, se le adicionaron 50 µL de búfer de cacodilato 10 mM, pH 7 y 50 µL de L-Dopa (3 mg/mL en agua destilada). Se incubó durante 10 min a 37 °C, después se adicionaron 800 µL de búfer de cacodilato y se leyó la absorbancia a 492 nm. En todos los tratamientos se utilizó cacodilato como control negativo. La proFO se determinó activándola previamente con tripsina (0.1 mg/mL en agua destilada) para convertirla en FO. La actividad de la FO se midió como se describió previamente. La actividad total se expresó como el cambio en la absorbancia a 492 nm x min x proteína (mg). La cantidad de proFO disponible en la muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{FO} + \text{FO activada con tripsina} &= \text{FO total} \\ \text{FO total} - \text{FO} &= \text{proFO} \end{aligned}$$

6.8. Proteína

La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método descrito por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino para construir una curva estándar.

6.9. Tasa de crecimiento específico

La tasa de crecimiento específico (TCE) se calculó de la siguiente manera:

$$TCE = 100 (\text{LN } W_2 - \text{LN } W_1) / t$$

Donde: W_2 es el peso final, W_1 el peso inicial y t es el número de días de cultivo.

6.10. Análisis estadístico

Los datos de supervivencia se transformaron con la fórmula $\arcsen(\sqrt{\%/100})$ (Dughetti y De Carli, 1999; Araya *et al.*, 2000) para cumplir una distribución normal se verificó la normalidad de los datos (prueba de Lilliefors) y la homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett). Como los datos fueron normales se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, usando la prueba F para analizar las diferencias entre tratamientos con los aditivos y el control sin los aditivos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes. Cuando existieron diferencias significativas (Daniels, 1979), se realizó una prueba de Tukey (HSD) para identificar la naturaleza de estas diferencias ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto de la inulina, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

7.1.1. Biensayo 1: Efecto de la inulina, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

Los resultados muestran una supervivencia en el tratamiento I (control) del 90 % y una prevalencia del WSSV de 58.3 % que sugiere que posiblemente ese porcentaje eran portadores de WSSV al momento de ser colectados de la granja. El tratamiento II (1.25 g de inulina/kg de alimento) presentó una supervivencia del 96.7 % y una prevalencia de WSSV del 41.7 %. El tratamiento III (2.5 g de inulina/kg de alimento) presentó una supervivencia del 93.3 % y una prevalencia de WSSV del 16.7 %. El tratamiento IV (5 g de inulina/kg de alimento) obtuvo una supervivencia del 90 % y una prevalencia de WSSV del 16.7 %. Por último, el tratamiento V (10 g de inulina/kg de alimento) tuvo una supervivencia del 80 % y una prevalencia de WSSV del 41.7%. No hubo diferencias significativas en la supervivencia (Fig. 1). Los resultados indican que los tratamientos III y IV lograron contrarrestar el WSSV reduciendo su prevalencia en los camarones cultivados (Fig. 2).

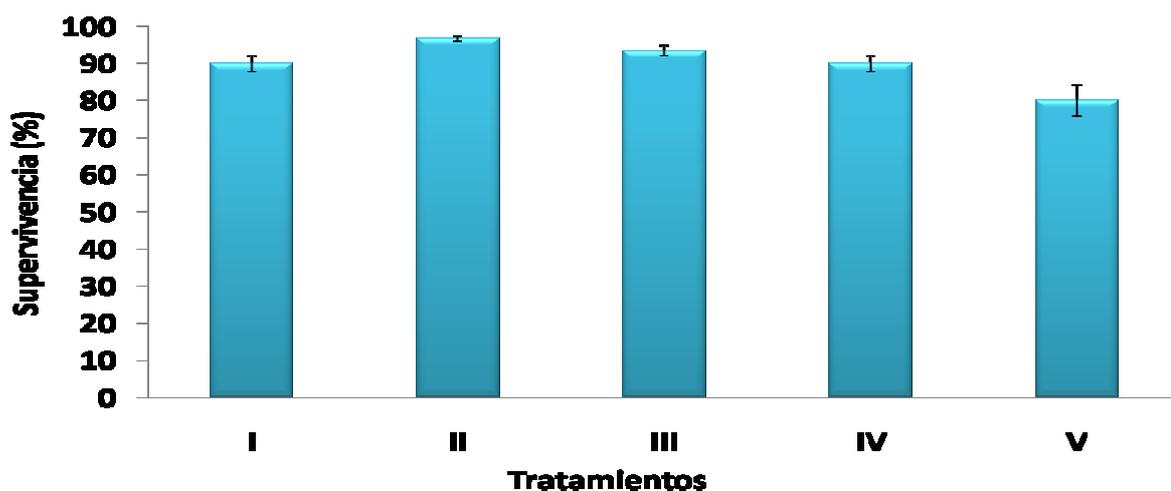


Figura 1. Supervivencia final de *L. vannamei*. Tratamientos: I) Control (camaronina + DO); II) camaronina + Inulina 1.25 g de inulina/kg de alimento; III) camaronina + Inulina 2.5 g de inulina/kg de alimento; IV) camaronina + Inulina 5 g de inulina/kg de alimento; V) camaronina + Inulina 10 g de inulina/kg de alimento. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

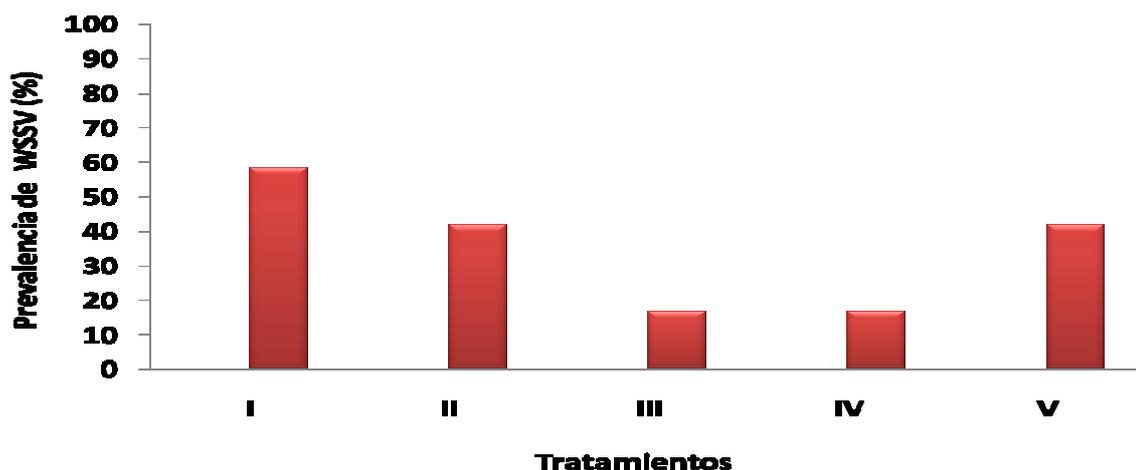


Figura 2. Prevalencia de WSSV en camarones cultivados. Tratamientos: I) Control (camaronina + DO); II) camaronina + Inulina 1.25 g de inulina/kg de alimento; III) camaronina + Inulina 2.5 g de inulina/kg de alimento; IV) camaronina + Inulina 5 g de inulina/kg de alimento; V) camaronina + Inulina 10 g de inulina/kg de alimento.

7.1.2. Tasa de crecimiento específico (TCE)

La TCE de los organismos fue la siguiente: tratamiento I) 2.99 ± 0.21 %/d; tratamiento II) 2.94 ± 0.19 %/d; tratamiento III) 2.98 ± 0.02 %/d; tratamiento IV) 3.05 ± 0.04 %/d y tratamiento V); 3.03 ± 0.05 %/d. No hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos.

7.1.3. Calidad de agua

7.1.3.1. Parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad, nitritos, nitratos y amonio)

Todos los parámetros estuvieron dentro del intervalo óptimo según Brock y Main (1994) con excepción de la temperatura que estuvo ligeramente por debajo del

nivel óptimo (Tabla 1). Los nitritos, nitratos y amonio estuvieron dentro del intervalo óptimo según Boyd y Tucker (1998). (Tabla 2).

Tabla 1. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua del sistema de cultivo. Se indican los promedios \pm DE.

| Tratamientos | OD (mg/mL) | pH | T °C | S (‰) |
|-------------------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| I | 4.7 \pm 0.3 | 7.6 \pm 0.3 | 21.8 \pm 1.7 | 34 \pm 3.3 |
| II | 4.5 \pm 0.2 | 7.8 \pm 0.2 | 22 \pm 1.7 | 36 \pm 3.5 |
| III | 4.8 \pm 0.5 | 7.9 \pm 0.2 | 22 \pm 1.7 | 35 \pm 4.0 |
| IV | 4.7 \pm 0.4 | 8.0 \pm 0.2 | 22 \pm 1.7 | 35 \pm 3.3 |
| V | 4.5 \pm 0.3 | 7.9 \pm 0.2 | 22 \pm 1.7 | 35 \pm 2.8 |
| Intervalo óptimo | 4.0-10.0 | 8.1-9.0 | 23-30 | 15-35 |

Tratamientos: I) control (camaronina+ DO); II) camaronina + inulina 1.25 g/kg de alimento; III) camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) camaronina + inulina 5 g/kg de alimento; V) camaronina + inulina 10 g/kg de alimento.

Tabla 2. Concentración de nitritos, nitratos y amonio (mg/L) del agua del sistema de cultivo. Se indican los promedios \pm DE.

| Tratamientos | Nitratos (mg/L) | Nitritos (mg/L) | Amonio (mg/L) |
|-------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| I | 0.14 \pm 0.0 | 0.005 \pm 0.0 | 0.17 \pm 0.1 |
| II | 0.13 \pm 0.1 | 0.005 \pm 0.0 | 0.18 \pm 0.2 |
| III | 0.11 \pm 0.1 | 0.005 \pm 0.0 | 0.08 \pm 0.0 |
| IV | 0.14 \pm 0.0 | 0.005 \pm 0.0 | 0.1 \pm 0.0 |
| V | 0.15 \pm 0.1 | 0.005 \pm 0.0 | 0.13 \pm 0.1 |
| Intervalo óptimo | 0.4-0.8 | <0.5 | 0.1-1.0 |

Tratamientos: I) control (camaronina+DO); II) camaronina + inulina 1.25 g/kg de alimento; III) camaronina+ inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) camaronina + inulina 5 g/kg de alimento; V) inulina 10 g/kg de alimento.

7.1.5. Conteo de UFC en el intestino de camarón

Se determinaron los microorganismos encontrados en el intestino de *L. vanamei* para cada tratamiento. Sin encontrar una tendencia clara respecto crecimiento.

Tabla 3. Conteo de UFC de BAL y levaduras en un gramo de intestino de *L. vannamei*. Se indican los promedios \pm DE.

| Tratamientos | BAL | Levaduras |
|--------------|--------------------|--------------------|
| I | 54.54 \pm 35.7 | No |
| II | 33.63 \pm 16.7 | No |
| III | 290.11 \pm 461.7 | 425.18 \pm 492.6 |
| IV | 33.87 \pm 40.7 | 28.04 \pm 20.9 |
| V | 218.72 \pm 326.3 | 920.91 \pm 933.6 |

Tratamientos: I) control (camaronina + DO); II) camaronina + inulina 1.25 g/kg de alimento; III) camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) camaronina + inulina 5 g/kg de alimento; V) camaronina + inulina 10 g/kg de alimento.

7.2. Evaluación del efecto de *U. lactuca*, adicionada en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

7.2.1. Bioensayo 2: Evaluación del efecto de *U. lactuca* adicionada en el alimento en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

La TCE promedio y la supervivencia en el tratamiento I fue de 4.49 \pm 0.31 %/d, con una supervivencia de 90 %; tratamiento II, 4.58 \pm 0.25 %/d, con una supervivencia de 100 %; tratamiento III, 4.34 \pm 0.56 %/d, con una supervivencia de 100 %; tratamiento IV, 4.73 \pm 0.26 %/d, con una supervivencia de 96.7 % y tratamiento V; 4.83 \pm 0.1 %/d, con una supervivencia de 93.3 %. Sin diferencias significativas ($p > 0.05$) de ambos, entre los tratamientos (Fig. 3).

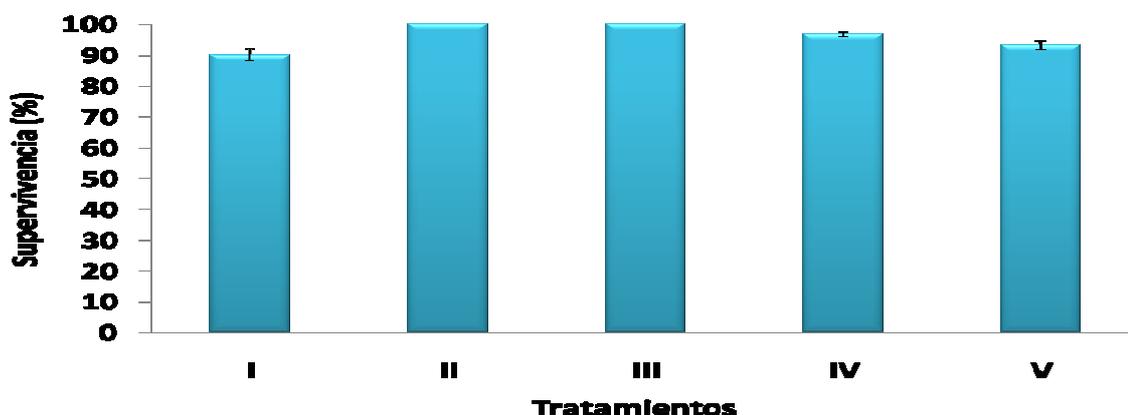


Figura 3. Supervivencia final de *L. vannamei* alimentado con *U. lactuca*. Tratamientos: I) Control (camaronina + DO); II) camaronina + *U. lactuca* 50 g/kg de alimento; III) camaronina + *U. lactuca* 100 g/kg de alimento; IV) camaronina + *U. lactuca* 150 g/kg de alimento; V) camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0.05$).

7.2.2. Calidad del agua

7.2.2.1. Parámetros físico-químicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad)

Los valores de oxígeno disuelto, salinidad y pH estuvieron dentro del intervalo óptimo según Brock y Main (1994) con excepción de la temperatura que estuvo por arriba del intervalo óptimo. (Tabla 4). Los nitritos, nitratos y amonio estuvieron dentro del intervalo óptimo según Boyd y Tucker (1998). (Tabla 5).

Tabla 4. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua del sistema de cultivo. Se indican promedios \pm DE.

| Tratamientos | OD (mg/L) | pH | T °C | Salinidad (‰) |
|-------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| I | 5.3 \pm 0.1 | 7.9 \pm 0.1 | 31.3 \pm 0.6 | 33.5 \pm 0.9 |
| II | 5.2 \pm 0.2 | 7.9 \pm 0.5 | 33.7 \pm 0.1 | 31.8 \pm 1.0 |
| III | 4.8 \pm 0.3 | 8.1 \pm 0.1 | 34.4 \pm 0.5 | 31.8 \pm 0.9 |
| IV | 5.2 \pm 0.1 | 8.1 \pm 0.0 | 34.0 \pm 0.8 | 31.8 \pm 0.9 |
| V | 5.3 \pm 0.1 | 8.2 \pm 0.1 | 32.1 \pm 1.1 | 33.5 \pm 1.1 |
| Intervalo óptimo | 4.0-10.0 | 8.1-9.0 | 23-30 | 15-35 |

Tratamientos: I) Control (camaronina + DO); II) camaronina + *U. lactuca* 50 g/kg de alimento; III) camaronina + *U. lactuca* 100 g/kg de alimento; IV) camaronina + *U. lactuca* 150 g/kg de alimento; V) camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento.

Tabla 5. Concentración de nitritos, nitratos y amonio (mg/L) del agua del sistema de cultivo. Se indican los promedios \pm DE.

| Tratamientos | Nitritos (mg/L) | Nitratos (mg/L) | Amonio (mg/L) |
|-------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| I | 0.005 \pm 0.01 | 0.13 \pm 0.07 | 0.3 \pm 0.06 |
| II | 0.005 \pm 0.01 | 0.22 \pm 0.03 | 0.33 \pm 0.01 |
| III | 0.005 \pm 0.01 | 0.23 \pm 0.03 | 0.19 \pm 0.08 |
| IV | 0.005 \pm 0.01 | 0.28 \pm 0.16 | 0.23 \pm 0.13 |
| V | 0.005 \pm 0.01 | 0.22 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.06 |
| Intervalo óptimo | <0.5 | 0.4-0.8 | 0.1-1.0 |

Tratamientos: I) Control (camaronina + DO); II) camaronina + *U. lactuca* 50 g/kg de alimento; III) camaronina + *U. lactuca* 100 g/kg de alimento; IV) camaronina + *U. lactuca* 150 g/kg de alimento; V) camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento.

7.3. Evaluación del efecto del prebiótico inulina y *Ulva lactuca*, adicionados en el alimento, en el crecimiento y supervivencia de camarón blanco

7.3.1. Bioensayo 3: Evaluación del efecto del prebiótico inulina y *Ulva lactuca*, adicionados en el alimento, en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de camarón blanco

La TCE promedio y la supervivencia en el tratamiento I fué de 3.09 \pm 0.08 %/d y 97 %, respectivamente. En el tratamiento II fue de 2.95 \pm 0.07 %/d y 80 %, respectivamente. En el tratamiento III fue de 2.93 \pm 0.07 %/d y 100 %, respectivamente. En el tratamiento IV fue de 2.81 \pm 0.25 %/d y 96.7 %, respectivamente. Sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Fig. 4).

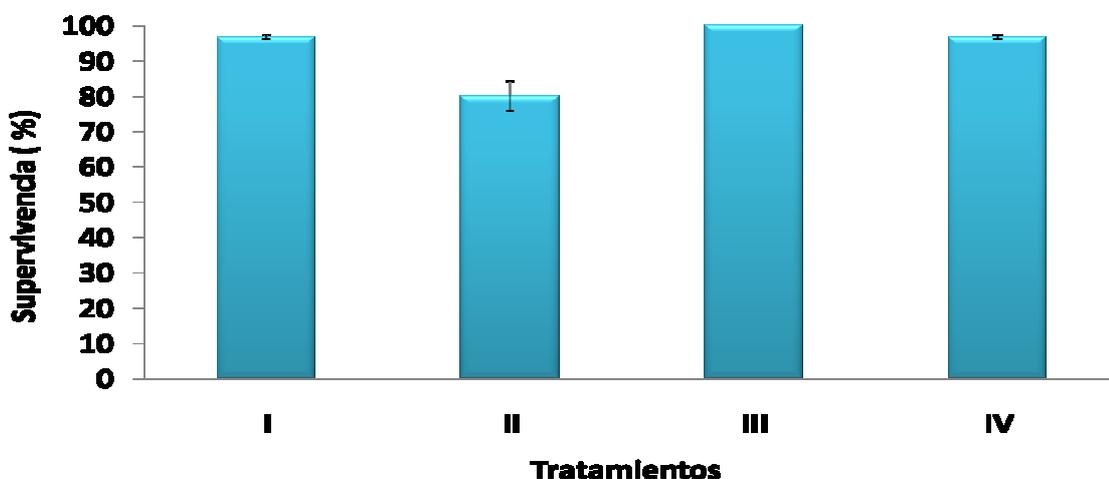


Figura 4. Supervivencia final de *L. vannamei*. Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento.

7.3.2. Calidad del agua

7.3.2.1. Parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad)

Todos los parámetros estuvieron dentro del nivel óptimo según Brock y Main (1994) (Tabla 6). Los nitritos, nitrato y amonio estuvieron dentro del intervalo óptimo según Boyd y Tucker (1998). (Tabla 7).

Tabla 6. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y salinidad del agua del sistema de cultivo. Se indican promedios \pm DE.

| Tratamientos | OD (mg/mL) | pH | T °C | S (‰) |
|-------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| I | 7.3 \pm 0.29 | 8.0 \pm 0.04 | 27.6 \pm 1.59 | 35.0 \pm 3.80 |
| II | 7.5 \pm 0.34 | 8.0 \pm 0.11 | 27.6 \pm 2.21 | 32.2 \pm 1.84 |
| III | 7.3 \pm 0.32 | 7.8 \pm 0.30 | 27.6 \pm 1.56 | 32.6 \pm 1.81 |
| IV | 7.1 \pm 0.22 | 7.9 \pm 0.10 | 28.5 \pm 1.36 | 32.6 \pm 3.06 |
| Intervalo óptimo | 4.0-10.0 | 8.1-9.0 | 23-30 | 15-35 |

Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento.

Tabla 7. Concentración nitritos, nitratos y amonio del agua del sistema de cultivo. Se indican los promedios \pm DE.

| Tratamientos | Nitratos (mg/L) | Nitritos (mg/L) | Amonio (mg/L) |
|-------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| I | 0.64 \pm 0.25 | 0.05 \pm 0.05 | 0.071 \pm 0.03 |
| II | 0.70 \pm 0.07 | 0.04 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.05 |
| III | 0.81 \pm 0.06 | 0.03 \pm 0.00 | 0.77 \pm 0.02 |
| IV | 0.76 \pm 0.09 | 0.03 \pm 0.04 | 0.76 \pm 0.05 |
| Intervalo óptimo | 0.4-0.8 | <0.5 | 0.1-1.0 |

Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento.

7.3.4. Determinación de parámetros del sistema inmune

7.3.4.1. Conteo de hemocitos

El número promedio de hemocitos del tratamiento I fue de aproximadamente 9×10^6 millones, mientras que en el tratamiento II fue de aproximadamente 15×10^6 . El tratamiento III presentó aproximadamente 10×10^6 células y el tratamiento IV aproximadamente 11×10^6 (Fig. 5). El número promedio de las células del tratamiento II con la mezcla de inulina y *U. lactuca* fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los tratamientos I, III y IV.

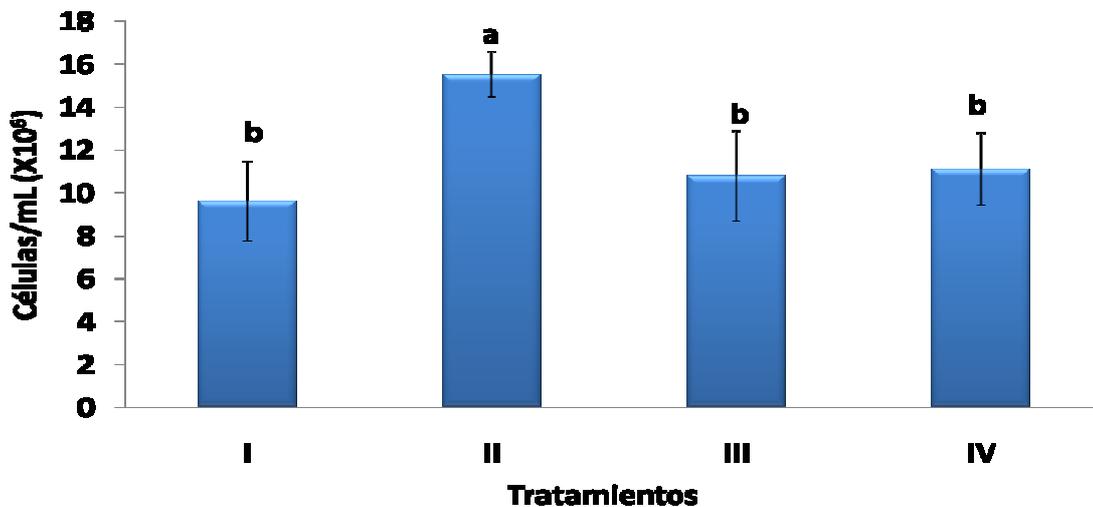


Figura 5. Promedio de hemocitos de cada tratamiento. Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Mezcla (Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Las barras de error indican el promedio \pm EE.

7.3.4.2. Actividad de la fenoloxidasa total (proFO total) plasma más SLH

La actividad de la FO total (proFO total) [(U/min/mg de proteína) $\times 10^2$] en el tratamiento I (control) fue de 125.55 ± 0.21 U, en el tratamiento II 238.37 ± 0.20 U, en el tratamiento III 232.22 ± 0.27 U y para el tratamiento IV 107.57 ± 0.10 U (Fig. 6). Los tratamientos II y III fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los tratamientos I (control) y IV. La actividad de la FO en los tratamientos I y IV fue similar ($p > 0.05$).

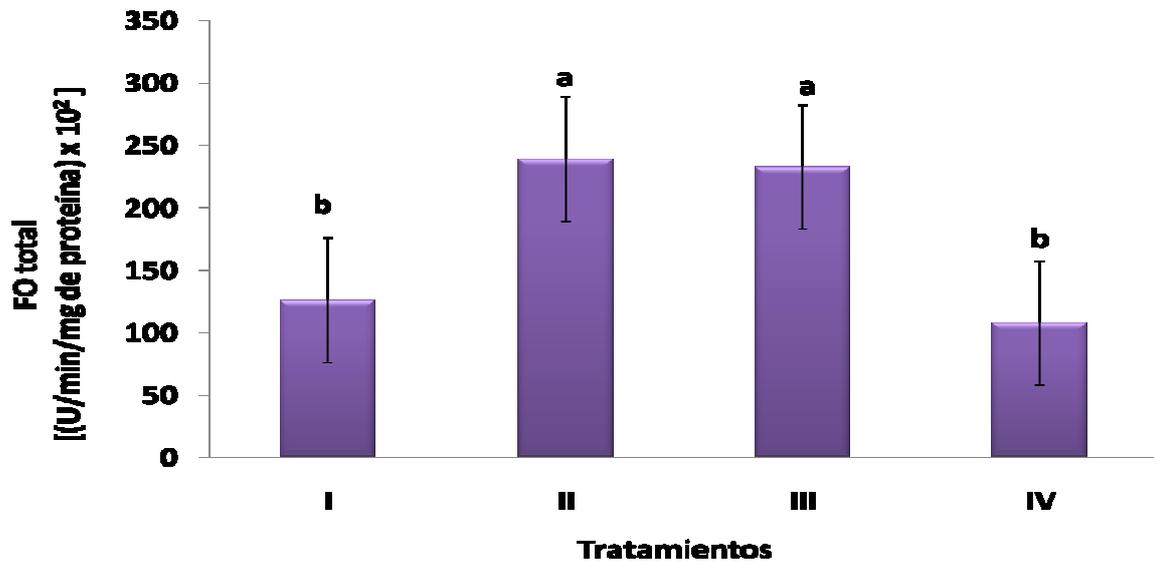


Figura 6. Actividad de la fenoloxidasa total de plasma más SLH. Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Mezcla (Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error= promedio \pm DE.

7.3.4.3. Actividad de la fenoloxidasa (FO)

La actividad de la FO en el SLH (proFo) [(U/min/mg de proteína) x 10²] para el tratamiento I fue de de 125.32 \pm 21.03 U, para el tratamiento II 237.99 \pm 20.95 U, para el tratamiento III 231.65 \pm 33.18 U y en el tratamiento IV 107.33 \pm 37.07 U. Los tratamientos II y III fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) al tratamiento I (control) y al IV. La actividad de la FO en el tratamiento I y IV fue similar ($p > 0.05$) (Fig. 7).

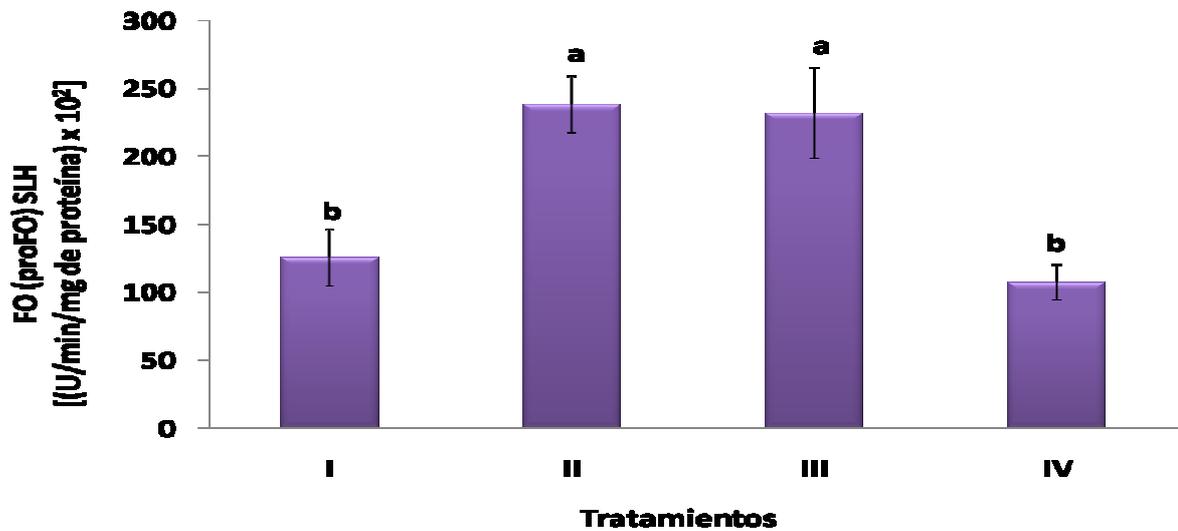


Figura 7. Actividad de la fenoloxidasa en el SLH (proFO). Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Mezcla (Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error = promedio \pm EE.

7.3.4.4. Actividad de la fenoloxidasa en plasma

La actividad de la FO en plasma [(U/min/mg de proteína) $\times 10^2$] para el tratamiento I (control) fue de 0.22 ± 0.03 U, en el tratamiento II 0.38 ± 0.07 U, en el tratamiento III 0.56 ± 0.10 U, en el tratamiento IV 0.24 ± 0.06 U. Los tratamientos II, III fueron similares entre sí, pero significativamente diferentes ($p < 0.05$) al tratamiento I (control). No hubo diferencias entre los tratamientos I, II y IV ($p > 0.05$) (Fig. 8).

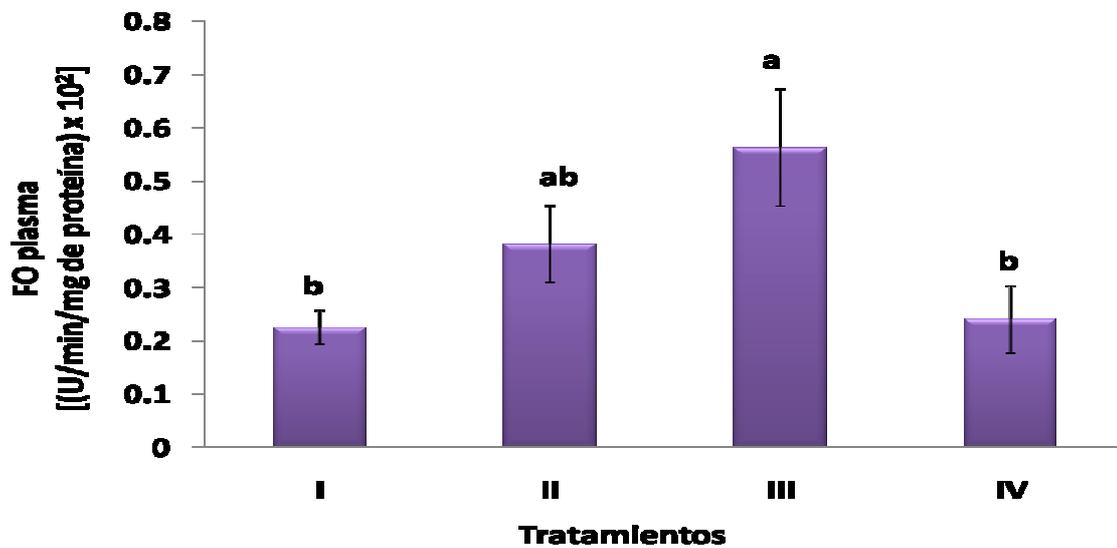


Figura 8. Actividad de la fenoloxidasa en plasma. Tratamientos: I) Control (Camaronina + DO); II) Mezcla (Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento); III) Camaronina + inulina 2.5 g/kg de alimento; IV) Camaronina + *U. lactuca* 200 g/kg de alimento. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error= promedio \pm EE.

8. DISCUSIÓN

En el bioensayo uno no se observó una ganancia significativa en peso en los camarones alimentados con inulina con respecto a los del control sin prebiótico y la supervivencia fue alta en todos los tratamientos con inulina, incluido el control. Esto coincide con Li *et al.* (2007) quienes, no observaron un aumento significativo en el crecimiento y la supervivencia de *L. vannamei* alimentado con fructooligosacáridos (prebiótico derivado de la inulina) incluidos en la dieta y se contrapone con, Zhou *et al.* (2007) que si obtuvieron un aumento significativo en el crecimiento de *L. vannamei* alimentado con fructooligosacáridos. En estos dos trabajos la adición de fructooligosacáridos en el alimento incrementó el número de bacterias presentes en el intestino de los camarones, lo que no ocurrió en este estudio al no presentarse una tendencia clara en el número UFC de BAL y levaduras por gramo de intestino.

La inulina adicionada en el alimento disminuyó la prevalencia del WSSV en los tratamientos III y IV lo que ocurrió en camarones con baja carga viral (PCR anidada) y con camarones aparentemente sanos. No existen reportes sobre lo encontrado en camarones o en otros crustáceos o invertebrados, aunque en medicina humana en estudios *in vitro* que los oligosacáridos (OS) de la leche materna tienen una estructura semejante a la de los receptores específicos hidrocarbonados de bacterias, toxinas y virus, que actúan como receptores competitivos en las células intestinales de superficie del huésped, previniendo la adhesión de patógenos. Se ha demostrado que los OS-2 inhiben el enlace con ligandos de células del huésped con *Campylobacter jejuni*, *Calicivirus*, *enterotoxina ST* de *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Helicobacter pylori* (Vitoria-Miñana, 2007).

En el segundo bioensayo con *U. lactuca*, no generó una ganancia significativa en peso en los tratamientos con la macroalga con respecto al control; pero la supervivencia fue alta (90-100 %) en todos los tratamientos, lo cual indica que *U. lactuca* no afectó de forma negativa el crecimiento, la sustitución de harina por algas ha reportado aumento en el consumo del alimento, el crecimiento y la producción de biomasa (Cruz *et al.*, 2000) funcionando como atrayente, aglutinante y texturizante (Cruz *et al.*, 2000; Casas-Valdez *et al.*, 2006). Es importante mencionar que en el

presente trabajo no se fabricó una dieta en sí sino que se sustituyeron diferentes porcentajes de todo el alimento comercial por la macroalga a diferencia de estos trabajos mencionados.

Respecto a la prevalencia del WSSV, ésta no se determinó pues el bioensayo fue realizado en los meses de julio-agosto donde las temperaturas fueron mayores (31-34°C) al intervalo óptimo (23-30 °C) y está documentado que la hipertermia inhibe la replicación de WSSV. Según Rahaman *et al.* (2006), el camarón blanco cultivado a temperaturas del agua de 33 °C no mostró signos de la enfermedad después de ser retado con WSSV. Además, obtuvieron mortalidades bajas (0-30%) y los camarones vivos y muertos fueron negativos para WSSV.

En el bioensayo tres se observó que los tratamientos con inulina y *U. lactuca*, así como la mezcla de ambos, no tuvieron un efecto positivo significativo en la ganancia de peso y supervivencia, pero tampoco tuvieron un efecto negativo. La mezcla tuvo un efecto positivo en el sistema inmune ya que se observó un aumento significativo en el número de hemocitos en el tratamiento II mezcla (inulina 2.5 g/kg + *U. lactuca* 20 %) respecto al tratamiento control. La inulina y la macroalga individualmente no tuvieron un efecto significativo sobre el número de hemocitos, podemos asegurar entonces que el efecto significativo sobre el número total de hemocitos se debe a la mezcla y no a los aditivos por separado. Contrariamente a lo encontrado en este trabajo, Zhou *et al.* (2007) y Li *et al.* (2007) sí obtuvieron un aumento significativo del número de hemocitos con las dietas con prebióticos.

En este estudio se observó una mayor actividad de FO en plasma, SLH y total en los camarones alimentados con inulina, respecto al control (tratamiento I) ya que la macroalga sola no tuvo el mismo efecto. Li *et al.* (2007) mencionan que la adición de fructooligosacaridos aumenta significativamente la actividad fenoloxidasa en los camarones alimentados con 0.0 0.1, y 0.8 % de scFOS. De acuerdo a los resultados obtenidos la inulina tiene un efecto inmunoestimulante.

Los parámetros fisicoquímicos como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto juegan un papel importante en la biología de los crustáceos (Allan *et al.*, 2006). durante los 3 bioensayos se determinaron los parámetros físicos químicos los cuales mantuvieron dentro de los intervalos propuestos por Brock y Main (1994) para el

cultivo del camarón blanco, con excepción de la temperatura en el experimento I que estuvo ligeramente por debajo y el experimento II que anduvo por encima del intervalo óptimo. Sin embargo, no se presentaron mortalidades importantes. Respecto a la calidad de agua, en los tres bioensayos se observó que los nitritos, nitratos y amonio se mantuvieron por debajo de la concentración no toxica (Boyd y Tucker, 1998).

9. CONCLUSIONES

1. El crecimiento de los camarones no fue afectado (positiva o negativamente) significativamente en ninguno de los tratamientos.
2. La inulina no incrementó el número de BAL y levaduras en el intestino del camarón blanco.
3. *U. lactuca* puede sustituir al alimento comercial en un 20 % sin afectar el crecimiento.
4. La combinación de inulina y *U. lactuca* aumentó significativamente el número de hemocitos en los camarones.
5. La combinación de inulina y *U. lactuca* no aumentó significativamente la actividad de fenoloxidasa en los camarones; sin embargo, la inulina por sí sola sí lo hizo.

10. REFERENCIAS:

- Aguirre-Guzmán, G. 2004. ¿Los *vibrios* sp. son agentes patógenos importantes para el cultivo de camarón? Programa Nacional de Sanidad Acuícola y Red de Diagnostico 1(25):1-3.
- Allan, E.L.; P.W. Froneman y A.N. Hodgson. 2006. Effects of temperature and salinity on the standard metabolic rate (SMR) of the caridean shrimp *Palaemon peringueyi*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 337(1): 103-108.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteína utilizing the principle of proteína-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.
- Brock, J. y K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana, USA. 242 p.
- Casas-Valdez, M.; G. Portillo-Clark; N. Águila-Ramírez; S. Rodríguez-Astudillo; I. Sánchez-Rodríguez y S. Carrillo-Domínguez. 2006. Efecto del alga marina *Sargassum* spp. Sobre las variables productivas y concentración de colesterol en el camarón café, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41(1): 97-105.
- CONAPESCA. 2009. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. México.
- Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M. A. &

- Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional.
- Cruz-Suárez, L.E; M. Tapia-Salazar; M. G. Nieto-López y D. Ricque-Marie. 2008. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. Avances en Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. 303-333 p.
- Daniels, W.W. 1979. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Limosa. D.F. México. 485 pp.
- FAO, 2002. Fishery Information (Year Book of Fisher Statistics).
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.
- Gibson, G.R. y M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota; introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125: 1401-1412.
- Goarant, C.; Y. Reynaud; D. Ansquer; S.D. Saulnier y F. Le Roux. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and Applied Microbiology 29: 570-580.
- Irianto, A. y Y.B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases 5: 633–642.
- Jiravanichpaisal, P.; K. Söderhäll y I. Söderhäll. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of the white spot syndrome virus (wssv) in freshwater crayfish. Fish shellfish immunol. 17: 265-275.

- Jones, A.; Dennison, C. and G. Stewart. 1996. Macroalgal responses to nitrogen source and availability: aminoacid metabolic profiling as a bioindicator using *Gracilaria edulis* (Rhodophyta). *J. Phycology*, 32:757-766.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Montoyama, M. Hiraoka y K. Inouye. 1996. Deteccion of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish pathol.* 31: 93-98.
- Lahaye, M. y A. Robic. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *American Chemical Society* 8:6.
- Lemonier, H.; A. Herbcand; L. Salery y B. Soulard. 2006. "Summer syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* grow out ponds in New Caledonia: zootechnical and environmental factors. *Acuaculture* 261: 1039-1047.
- Lighther, D.V. y R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164:201-220.
- Li, P. y D.M. Gatlin III. 2005. Evaluation of the prebiotics GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone Chrysops-M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture* 248: 197-205.
- Li, P.; G.S. Burr; D.M. Gatlin; M.E. Home; S. Patnaik; F.L. Castille y A.L. Lawrence. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *Nutritional Immunology* 137:2763-2768.

- Madrigal, L. y E, Sangronis. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 57:387-396.
- Maldonado, M.; J. Rodríguez y C.I. de Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al wssv, su principal patógeno. Revista AcuaTic 21: 78-91.
- McHugh, D. 2002. Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO Circular de Pesca N° 968 FIIU/C968(Es). Roma, 2002.
- Partida-Arangure, B.O. 2009. Efecto de prebióticos y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. P.100.
- Rahman, M.M.; M. Corteel; M. Wille; V. Alday-Sanz; M.B. Pensaert; P. Sorgeloos y H.J. Nauwynck. 2007. The effect of raising water temperature to 33 °C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture 272: 240–245.
- Rendón, L. y J.L. Balcázar 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. Revista AcuaTic 19: 27-33.
<http://www.revistaacuatic.com/acuatic/art.asp?t=p&c=160>
- Ringo, E.; S. Sperstad; R. Myklebust; T.M. Myklebust y R.E. Olsen. 2006. The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture Research 37: 871-897.
- Takehashi, Y.; K. Uehara; R. Watanabe; T. Okumura; T. Yamashita; H. Omura; T. Yumo; T. Kawano; A. Kenemitsu; H. Narasaka; N. Suzuki y T. Itami. 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulphated polysaccharide, in

controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In Advances in shrimp biotechnology (Flegel T.W. Ed). National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bankuk.

Vargas-Albores, F.; M.A. Guzmán- Murillo y J.L. Ochoa. 1993. An anticogulant solution for haemolymph Collection and prophehoxidase Studies of penaeid shrimp (*Penaeus Californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. A 106: 299-303.

Vitoria-Miñana, I. 2007. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Pediatría Integral XI (5): 425-433.

Wang, W. y X, Zhang. 2008. Comparasion of antiviral effeciency of immune responses I shrimp. Fish y Shellfish Immunology 25:522-527.

Werner, A.; Clarke, D. and Kraan, S. 2004. Strategic Review of the Feasibility of Seaweed Aquaculture in Ireland. ND P Marine RTDI Desk Study Series. Irish Seaweed Centre, Martin Ryan Institute, National University of Ireland, Galway (Ed.).

Zhou, Z.; Z. Ding y L.V. Huiyuan. 2007. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 38: 2-8.