

Resumen en extenso

Efecto dosis/frecuencia de la administración de *Dunaliella* sp. a la dieta de *Litopenaeus vannamei* durante una infección con *Vibrio parahaemolyticus*.

Medina Félix, D.*, Campa Córdova, A.I., López Elías, J.A., Martínez Córdova, L.R., Figueroa Preciado, G., Cortés Jacinto, E., Luna González, A., Mendoza Cano, F., Huerta Aldaz, N.

Universidad Estatal de Sonora, Av. Ley Federal del Trabajo SN. Hermosillo, Sonora. CP. 83100. México.

*E-mail: diana.medina@ues.mx



Cite this paper/Como citar este artículo: Medina Félix, D., Campa Córdova, A. I., López Elías, J. A., Martínez Córdova, L. R., Figueroa Preciado, G., Cortés Jacinto, E., Luna González, A., Mendoza Cano, F., Huerta Aldaz, N. (2021). Efecto dosis/frecuencia de la administración de *Dunaliella* sp. a la dieta de *Litopenaeus vannamei* durante una infección con *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Bio Ciencias* 8: (Suppl) Memorias del 3er Coloquio de Nutrigenómica y Biotecnología Acuícola 2020 (CONYBA) e1100. <http://doi.org/10.15741/revbio.08Suppl.e1100>

Resumen

La administración de carotenos a la dieta de camarón ha demostrado ser efectiva para mejorar la supervivencia, el crecimiento, reproducción, resistencia a estrés y disminución del impacto de enfermedades. *Dunaliella* sp. es conocida por contener grandes cantidades de β -caroteno con función pro-vitamina A que mejora la respuesta inmune. Es necesario evaluar la administración de *Dunaliella* sp. en la dieta y determinar una adecuada dosis/frecuencia de administración para optimizar el rendimiento del cultivo. Se compararon tres concentraciones de *Dunaliella* sp. (1.5, 2 y 3%), administrada a tres diferentes tiempos: diario, cada 3 días y cada 7 días. Los camarones fueron alimentados durante 20 días previo a la infección con *Vibrio parahaemolyticus* (1×10^6 UFC/mL). Se analizó la supervivencia y parámetros bioquímicos en hemolinfa: proteína, glucosa, lactato, colesterol y triglicéridos para determinar el estado de estrés. Adicionalmente se evaluó la respuesta inmune de *L. vannamei* por medio de la actividad: profenoloxidasa (proFO), fenoloxidasa (FO) y superóxido dismutasa (SOD) en hemolinfa. La supervivencia después de la infección por *V. parahaemolyticus* fue mayor en los camarones alimentados con las dietas 2% de *Dunaliella* sp. administradas cada 3 y 7 días. Los organismos alimentados con el de 2% y 3% de *Dunaliella* sp. administradas cada tercer día mostraron respuestas fisiológicas e inmunológicas positivas a la infección.

Abstract

Carotenoid sources in shrimp diets have shown to be effective for improving survival, growth, reproductive capacity, stress resistance, and also for diminishing disease. *Dunaliella* sp. is known to have high levels of β -carotenes, which works as pro-vitamin A, enhancing the immune response in shrimp. However, the administration of *Dunaliella* sp. in shrimp diet needs to be evaluated to determine the appropriate dose/frequency of administration needed to optimize performance in cultured shrimp. Diets with three different concentrations of *Dunaliella* sp. (1.5, 2 and 3%) were tested, and each one was administered at three different time frequencies: daily, and at 3- and 7-days intervals. After 20 days shrimps were infected with *Vibrio parahaemolyticus* (1×10^6 CFU/mL). Survival and hemolymph parameters: protein, glucose, lactate, cholesterol and triglycerides were analyzed to evaluate shrimp stress status. Additionally, *L. vannamei* innate immune response was examined by activity of profenoloxidase (proPO), phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD) in hemolymph. Survival after infection with *V. parahaemolyticus* was higher for shrimp fed with diets consisting of 2% *Dunaliella* sp. administered every 3 and 7 days. Shrimp fed a diet consisting of 2% and 3% *Dunaliella* sp. administered every third day showed positive physiological and immune responses to infection.

Introducción

La presencia de enfermedades en los cultivos es uno de los principales retos a enfrentar para evitar

mortalidades y cosechar una producción exitosa. En el año 2013 la producción de camarón en México se vio gravemente afectada por la aparición del síndrome de muerte temprana o EMS, se determinó que el agente causal es la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. *L. vannamei* tiene un sistema inmune innato sin capacidad de memoria, así mismo, el uso de antibióticos es muy limitado, debido a esto la atención se ha puesto en la adición al alimento de compuestos con función inmunoestimulante, que sean capaces de mejorar la respuesta a infecciones y el rendimiento de los organismos. Diversos compuestos están siendo estudiados por estos efectos, algunos con resultados muy alentadores para la industria acuícola como: lipopolisacáridos, glicoproteínas, productos de β -1,3/1,6 glucano, vitaminas (C, E, A, D), carotenos, minerales y probióticos.

La microalga *Dunaliella* sp. carece de una pared celular rígida de polisacáridos, lo que le permite una acumulación elevada de carotenos, estos son producidos por el alga a través de diversos métodos de manipulación en su cultivo, como privación de nutrientes y alteraciones en iluminación. Trabajos realizados previamente mostraron la eficiencia de *Dunaliella* sp. al ser utilizada como aditivo en el alimento de *L. vannamei* durante una infección con WSSV (Medina-Félix *et al.*, 2014). Mientras que Madhumathi y Rengasamy (2011), reportan la habilidad de *Penaeus monodon* de convertir el β -caroteno en astaxantina, reflejado en una mejora de la actividad inmunológica y resistencia a enfermedades. En este trabajo se evaluó la adición dosis/frecuencia de *Dunaliella* sp. cultivada en un medio limitado en nitrógeno para la acumulación masiva de β -carotenos, con la finalidad de aumentar la respuesta fisiológica e inmune de *L. vannamei* frente a una infección con *V. parahaemolyticus*.

Materiales y Métodos

La microalga *Dunaliella* sp. se cultivó en un sistema escalonado con medio f/8, que contiene una cuarta parte de nitratos y fosfatos necesarios para su óptimo desarrollo. La biomasa de *Dunaliella* sp. se almacenó a -80°C para ser liofilizada y obtener la harina para la elaboración del alimento. Las dietas se formularon mediante el software 5Pro para contener el 37% de proteína (Tabla I). Las dietas se elaboraron en el laboratorio de nutrición acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La cepa *Vibrio parahaemolyticus* fue proporcionada por CIIDIR-PN-Sin. Para preparar el inóculo, la bacteria se sembró por método masivo en medio TSA y se recuperó en solución salina estéril (3% NaCl) hasta llegar a una absorbancia de uno (longitud de onda de 540 nm.) Se evaluaron once tratamientos experimentales, con las dosis de 1.5, 2 y 3% de *Dunaliella* sp. a tres frecuencias de alimentación: diaria (1), cada tres (3) y siete (7) días, un control positivo (C+; sin

Dunaliella sp. e infectado con *V. parahaemolyticus*) y un control negativo (C-; sin *Dunaliella* sp. y sin infección con *V. parahaemolyticus*), cada uno por triplicado. Después de 20 días de alimentación, los organismos fueron infectados con la bacteria (1×10^6 UFC/mL) por método de inmersión.

Para este bioensayo se utilizaron acuarios de plástico con 15L de capacidad y 10L de agua de mar filtrada. En cada acuario fueron colocados 15 juveniles de *L. vannamei* con un peso promedio inicial de 3.1 g, fueron alimentados con el 5% de su biomasa, con recambios del 80% cada tres días. Las muestras de hemolinfa (anticoagulante citrato trisódico pH 7.5) fueron tomadas a las 0, 12, 24, 36 y 48 hpi (horas post infección). La concentración de proteína, triglicéridos, glucosa y lactato, se determinaron mediante Kits comerciales de diagnóstico RANDOX® siguiendo las especificaciones del fabricante. La actividad de proFO, FO y SOD, se determinaron siguiendo la metodología de Gollas-Galván *et al.* (1997). Para realizar el análisis estadístico, los datos obtenidos se analizaron con el software JMP® mediante MANDEVA, se evaluó: dieta, frecuencia y tiempo de infección, se utilizaron las pruebas a posteriori de Tukey para supervivencia y Dunnett para la comparación de dietas y frecuencias. Valores $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

Se registró una alta mortalidad para todos los tratamientos infectados con *V. parahaemolyticus* a las 48 hpi, con diferencias significativas entre los tratamientos: control positivo (C+), 3%(1) y 3%(7) comparado con el control negativo (C-). Las dietas con 2% *Dunaliella* sp. suministradas cada 3 (2%(3)) y cada 7 días (2%(7)), resultaron en la mayor supervivencia (52% y 57% respectivamente) (Figura 1). En el conteo de hemocitos, se reportaron diferencias significativas entre tratamientos, la dieta 3% (3) presentó el conteo de hemocitos más alto (11 237 500 cel/mL), mientras que el control negativo (C-) reportó la menor concentración (2 458 333 cel/mL). Se reportan altos niveles de proteína en hemolinfa a las 12 hpi en camarones alimentados con la dieta 2% (7) (266 mg/mL) con diferencias significativas en comparación a las dietas: 2% (1), C- y 3% (3). En cuanto a los niveles de glucosa en hemolinfa no se reportaron diferencias entre tratamientos, las concentraciones se mantienen constantes (entre 1.3 y 1.5 mg/mL). En los niveles de lactato se reportan diferencias significativas, con una alta variación antes y después de la infección; los valores más altos se observaron en las dietas: 2%(7) (0.88 mg/mL) y 3%(7) (0.84 mg/mL) a las 0 hpi. En el análisis de lípidos se reporta una disminución en la concentración de colesterol después de la infección con la bacteria, mientras que la concentración de triglicéridos permanece constante a lo largo de la infección con un

incremento drástico a las 48 hpi. en las dietas que contienen el alga (Fig. 3).

Se observó una alta actividad de la enzima fenoloxidasa al activarse la profenoloxidasa en camarones infectados y alimentados con el alga (Figura 2). En la actividad de profenoloxidasa se

reportan diferencias significativas en las dietas: 1.5%, 2% y 3% alimentados diariamente con una actividad mayor que la reportada en los grupos control. Respecto a la actividad de la enzima SOD, no se reportaron diferencias durante el tiempo de infección o entre tratamientos ($p > 0.05$).

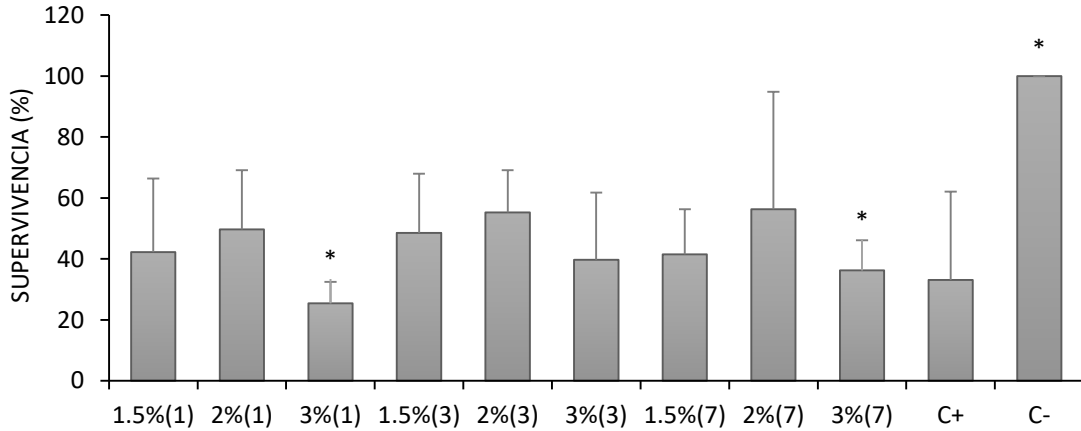
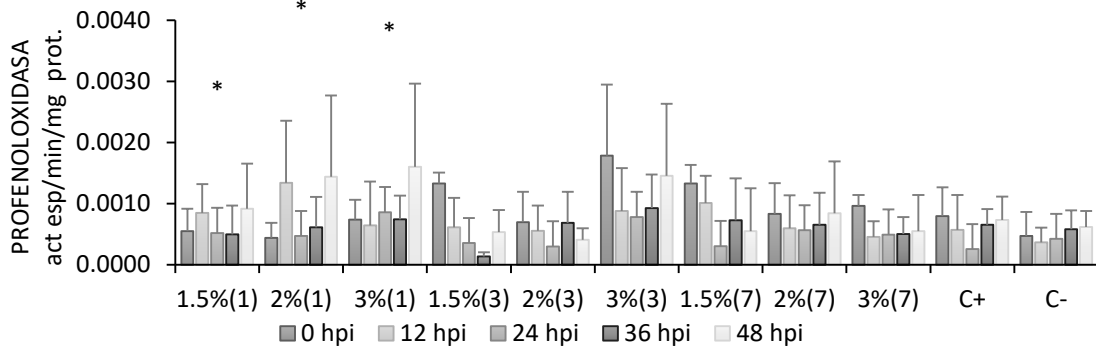
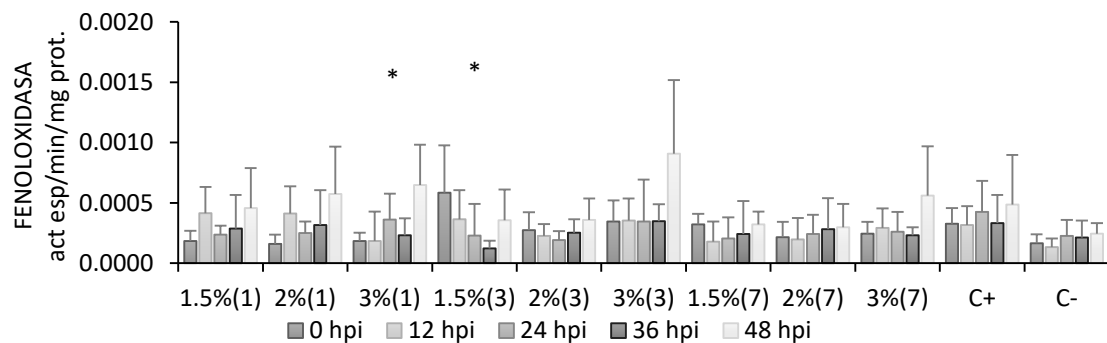


Figura 1. Supervivencia



A



B

Figura 2. Actividad específica de profenoloxidasa (A) y fenoloxidasa (B) en *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección por *V. parahaemolyticus* en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

Discusión

La mortalidad ocasionada por *V. parahaemolyticus* fue muy alta, las dietas adicionadas con 2 y 3% *Dunaliella* sp. suministradas cada tres días reportaron la mayor supervivencia, mientras que la mayor mortalidad se observa en la dieta 3%(1) como resultado de la sobre-inmunoestimulación de los organismos. Un aumento en el número de hemocitos en hemolinfa está relacionado con una mejor respuesta inmune en crustáceos, haciéndolos más resistentes a enfermedades. En este experimental se registró que organismos alimentados con 3% *Dunaliella* sp. en todas sus frecuencias de administración presentaron altas concentraciones de hemocitos, sin embargo, este aumento no se vio reflejado en una mayor supervivencia, ya que la dieta 3%(1) mostró una alta tasa de mortalidad.

La proteína disponible en hemolinfa es utilizada como una fuente de energía y como compuesto base para la formación de moléculas relacionadas con el sistema inmune, en este trabajo se reportó una disminución en los niveles de proteína a través del tiempo en los tratamientos infectados, debido al estrés ocasionada por la alta virulencia de *V. parahaemolyticus*. Los niveles de lactato disminuyen en las dietas 2%(3), 3%(1), 3%(3) y 3%(7) a las 48 hpi. al mismo tiempo se observó una recuperación en los niveles de glucosa en estos tratamientos, lo que muestra la habilidad de *L. vannamei* para recuperar su metabolismo energético por medio de otras rutas metabólicas. Se observó un aumento en el nivel de triglicéridos

a las 48 hpi (Fig. 3), en las dietas que contienen la microalga y no en los grupos control, debido a una disminución en la oxidación de lípidos gracias a la acción antioxidante de *Dunaliella* sp.

La profenoloxidasasa es activada a fenoloxidasasa dentro de los hemocitos, para ser liberada a plasma donde cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles, y la oxidación de estos a o-quinonas, que lleva a la síntesis de melanina. En este experimento la actividad de fenoloxidasasa disminuye cuando la frecuencia de administración de la microalga en la dieta es menor, así también se observó que la actividad de fenoloxidasasa aumenta durante la infección con *V. parahaemolyticus* con valores elevados de actividad a las 48 hpi, mientras que la actividad de profenoloxidasasa disminuye y recupera valores a las 48 hpi.

Conclusión

La calidad del alimento es fundamental para el óptimo desarrollo de los organismos; la adición de la microalga *Dunaliella* sp. a la dieta de *L. vannamei*, muestra una mejora en la supervivencia. Como podemos observar en los resultados obtenidos se reitera la importancia de la determinación dosis/frecuencia, con el fin de evitar inmunosupresión. La adición de *Dunaliella* sp. en la dosis y frecuencia de 2%(3) a la dieta del camarón blanco del Pacífico tiene un efecto positivo en supervivencia, así como en la respuesta fisiológica e inmune frente a una infección con la bacteria *V. parahaemolyticus*.

Tabla I. Análisis proximal de las dietas a diferentes porcentajes de *Dunaliella* sp. (Se indica el promedio y DE).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (cal/g)
<i>Dunaliella</i> sp.	3.92	18.97	0.10	0.10	56.22	24.61	1111.64
	0.04	0.22	0.00	0.00	0.00		4.09
Dieta control	7.38	36.19	7.04	0.70	7.89	48.17	4625.67
	0.15	0.12	0.05	0.10	0.02		2.05
Dieta 1.5%	8.63	36.39	7.38	0.77	8.73	46.73	4592.97
	0.06	0.11	0.08	0.06	0.03		3.92
Dieta 2%	9.15	36.40	7.44	0.77	9.15	46.24	4571.74
	0.05	0.09	0.05	0.06	0.03		1.72
Dieta 3%	7.36	36.67	7.46	0.63	9.80	45.44	4549.47
	0.07	0.07	0.06	0.06	0.04		7.86

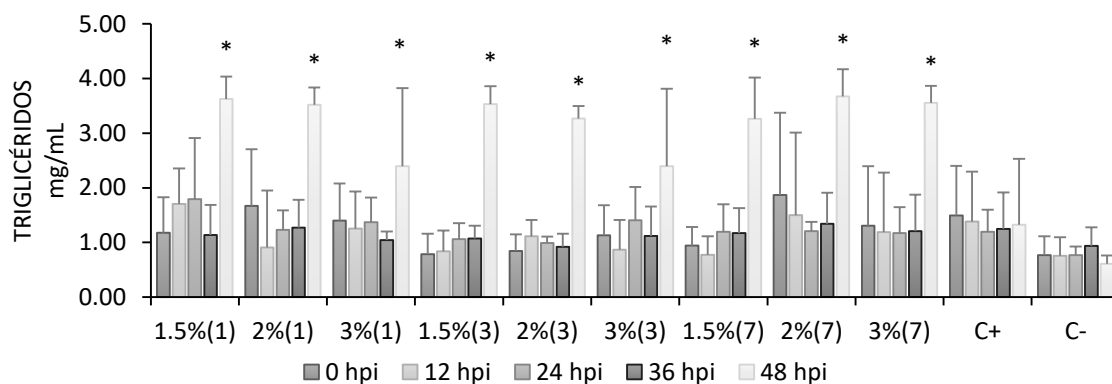


Figura 3. Actividad de triglicéridos en plasma de *L. vannamei* alimentado con *Dunaliella* sp. durante una infección por *V. parahaemolyticus* en todas las dietas (frecuencia). *Diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se indica el promedio \pm DE.

Referencias

- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. (1997). Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 117:419-425. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00363-5](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00363-5)
- Madhumathi, M. & Rengasamy, R. (2011). Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with *Dunaliella salina* supplemented diet and resistance against WSSV. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 3:7249-7259. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AV2012071074>
- Medina-Félix, D., López-Eliás, J. A., Martínez-Córdova, L. R., López-Torres, M., Hernández-López, J., Rivas-Vega, M. and Mendoza-Cano, F. (2014). Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. *J. Invertebr. Pathol.* 117:9-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.12.004>