

NOTA CIENTÍFICA

Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio

Response of metabolites in hemolymph and productive performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured at high densities in laboratory

Dámaris Rubio-Gastélum¹, Wenceslao Valenzuela-Quiñónez³,
Gaspar M. Parra-Bracamonte² y Apolinar Santamaria-Miranda³

¹Programa de Doctorado en Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa 81101, México. drubiog1100@alumno.ipn.mx

²Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamaulipas, C.P. 88710, México

³Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Departamento de Acuicultura, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa 81101, México

Abstract.- In shrimp farming, one of the most important challenges is to increase shrimp production, which has encouraged increased seeding rates. In this study, the response of metabolites in hemolymph and performance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown at high densities was evaluated, using total protein, lactate and glucose concentrations as stress indicators. At the beginning of the bioassay, lactate was high, while growth and specific survival were poorer, which is inferred as a response to seeding- time stress. At the end of the bioassay was obtained statistical difference in total protein levels, with an increase of final weight and survival.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, stress, metabolites, productivity

INTRODUCCIÓN

La camaronicultura cada vez es más intensiva, realizándose a altas densidades de cultivo, donde los organismos están expuestos a cambios ambientales, que alteran su condición de homeostasis, representando un estado de estrés en los camarones (Lee & Wickins 1992).

Actualmente se utilizan una gran variedad de parámetros bioquímicos en hemolinfa para evaluar y monitorear las condiciones fisiológicas de algunas especies de camarones, tanto del medio natural como bajo condiciones de cultivo. Entre estos se encuentran el lactato, la glucosa y las proteínas, los cuales son indicadores en la evaluación del estrés. De éstos, el lactato y la glucosa se han descrito como los más confiables indicadores en el estrés producido por la extracción repetida de muestras de hemolinfa e inyección de serotonina (Racotta & Palacios 1998), y la transferencia a condiciones de laboratorio (Sánchez *et al.* 2001).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar experimentalmente la respuesta fisiológica del camarón

blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado a diferentes densidades, a través de indicadores fisiológicos y productivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

BIOENSAYO

Se utilizaron 84 camarones blancos provenientes de una granja de cultivo comercial con un peso promedio de $5,14 \pm 0,36$ g, los cuales fueron colocados en tinas ovaladas de plástico (100 L) con 60 L de agua de mar filtrada (20 µm) y se alimentaron a razón del 4% del peso corporal en 2 raciones diarias. El bioensayo tuvo una duración de 90 días y éste constó de 3 tratamientos, en los cuales varió la densidad de organismos por tina, cada uno con 4 réplicas: 1) 3 org/tina; 2) 6 org/tina; 3) 12 org/tina.

Las variables estudiadas fueron: Peso inicial (PI, g), Peso final (PF, g), Proteína inicial (PTI, mg mL⁻¹), Proteína final (PTF, mg mL⁻¹), Glucosa inicial (GI, mg dL⁻¹), Glucosa

final (GF, mg dL⁻¹), Lactato inicial (LI mg dL⁻¹), Lactato final (LF mg dL⁻¹), Hemocitos inicial (HI, (# de células mL⁻¹)*1000) y Hemocitos final (HF, (# de células mL⁻¹)*1000).

ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

El día 3 del bioensayo, se tomó hemolinfa de los sacos hemolinfáticos ventrales en cada organismo de las réplicas de los tratamientos utilizando jeringas con anticoagulante SIC-EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.3) a 4°C, para mantener una proporción de 2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen de hemolinfa (Vargas-Albores *et al.* 1993). Posteriormente se diluyeron 50 µL de la mezcla de hemolinfa y anticoagulante, en 150 µL de formaldehído (4%) y se almacenaron a 4°C para el conteo de hemocitos. El resto de la mezcla, hemolinfa y anticoagulante, se centrifugó a 800 g en 4°C por 4 min y el plasma se almacenó a -20°C para después analizar la concentración los metabolitos indicadores. Para la determinación de proteínas, se diluyó el plasma en relación 1:100 siguiendo la metodología propuesta por Bradford (1976) adaptada a microplaca por Hernández-López & Vargas-Albores (2003) utilizando albúmina sérica de bovino como estándar. En la determinación de glucosa y lactato, se utilizaron los kits comerciales (GOD-PAP, Radox) y (PAP, Radox) respectivamente. El conteo de hemocitos se realizó utilizando 20 µL de la mezcla de hemolinfa, anticoagulante y formaldehído en un hematocitometro (cámara de Neubauer) y se utilizó un microscopio de luz para el conteo total de hemocitos.

ANÁLISIS DE PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS Y CALIDAD DE AGUA

Al inicio y al final del bioensayo se determinó la cantidad de amonio presente en el agua de cada una de las tinas experimentales mediante la técnica descrita por Strickland & Parsons (1972). 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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron las variables estudiadas mediante el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (2001) utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + \varepsilon_{ij}$$

donde: Y_{ij} = variable dependiente (PI, PF, PTI, PTF, GI, GF, LI, LF, HI y HF), μ = media general, D_i = efecto de la i -ésima densidad de cultivo, ε_{ij} = error experimental. Posteriormente, se estimaron las medias de mínimos cuadrados y se compararon utilizando la prueba de mínima diferencia significativa.

La variable supervivencia fue analizada con el procedimiento FREQ (SAS 2001) utilizando una prueba de Chi cuadrado con nivel $\alpha = 0,05$.

La tasa de crecimiento específico (TCE) = $[(\ln W_f - \ln W_0) / T] \times 100$ donde T es la duración del experimento, W_0 es el peso de los animales al comienzo del experimento, y W_f es el peso final de los animales al final del ensayo.

El factor de conversión alimenticia fue calculado mediante la siguiente fórmula (FCR) = $F / (W_f - W_0)$, donde F es el peso de la alimentación suministrada a los camarones durante el ensayo. W_0 es el peso de los animales al comienzo del experimento, y W_f es el peso final de los animales al final del mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VARIABLES METABÓLICAS

En la Tabla 1, se muestra el concentrado de todas las variables evaluadas durante el desarrollo del bioensayo. Al analizar los resultados de las mediciones de proteína inicial (PI), no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en las concentraciones de proteína inicial entre los tratamientos, sin embargo, las concentraciones de proteína final (PF) si mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos 1 y 3. Perazzolo *et al.* (2002), mencionan que los niveles de proteína son buenos indicadores para monitorear la salud de los camarones. En el presente estudio se observaron niveles de proteínas totales en hemolinfa que van desde $236,18 \pm 21,03$ mg mL⁻¹ hasta $632,38 \pm 29,65$ mg mL⁻¹ para los muestreos inicial y final respectivamente, encontrándose dentro del amplio rango reportado para niveles de proteínas circulantes (de 70 a 700 mg mL⁻¹) (Sánchez *et al.* 2001, Rosas *et al.* 2002).

En las mediciones de glucosa, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) para ninguno de los tratamientos y tiempos de muestreo. Un aumento de la glucosa en la hemolinfa de los camarones peneidos como respuesta al estrés es bien conocido y fue demostrado en relación a muestreos repetidos de hemolinfa (Racotta & Palacios 1998), y sometidos al estrés en los tanques de

Tabla 1. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de las variables fisiológicas de camarón blanco sometido a diferentes densidades de cultivo / Least squares means and standard error of physiological variables of white shrimp subjected to different culture densities

Indicador	3 org/tina	6 org/tina	12 org/tina	Valor de <i>P</i>
Proteína Inicial (PTI, mg mL ⁻¹)	236,18 ± 21,03	274,70 ± 21,03	240,80 ± 21,03	(> 0,05)
Proteína Final (PTF, mg mL ⁻¹)	632,38 ± 29,65 ^a	556,88 ± 29,65 ^{ab}	409,78 ± 66,31 ^b	(< 0,05)
Glucosa Inicial (GI, mg dL ⁻¹)	1,25 ± 0,06	1,39 ± 0,06	1,44 ± 0,06	(> 0,05)
Glucosa Final (GF, mg dL ⁻¹)	1,39 ± 0,02	1,44 ± 0,02	1,36 ± 0,04	(> 0,05)
Lactato Inicial (LI, mg dL ⁻¹)	2,28 ± 0,28 ^a	3,70 ± 0,28 ^b	3,23 ± 0,28 ^{ab}	(< 0,05)
Lactato Final (LF, mg dL ⁻¹)	3,37 ± 0,24	3,17 ± 0,24	3,45 ± 0,54	(> 0,05)
Hemocitos Inicial (HI, # cel mL ⁻¹)*1000	12219,00 ± 5590,53	13086,00 ± 5590,53	16224,00 ± 5590,53	(> 0,05)
Hemocitos Final (HF, # cel mL ⁻¹)*1000	17467,92 ± 2755,17	15724,80 ± 2755,17	16236,00 ± 6160,00	(> 0,05)

Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Promedio ± error estándar

plástico (Mercier *et al.* 2006). Bajo condiciones de estrés crónico, ningún aumento significativo o incluso una disminución de glucosa ha sido reportada para *Penaeus monodon* mantenidos 4 semanas a altas densidades de cultivo (Hall & van Ham 1998) y para *L. setiferus* silvestres mantenidos 7 días bajo condiciones de laboratorio (Sánchez *et al.* 2001). Todo lo anterior indica que el aumento en las concentraciones de glucosa durante un estrés crónico puede no ser tan pronunciado como el que ocurre durante un estrés agudo y se ve confirmado por los resultados en los análisis obtenidos en los cuales no existió diferencia significativa entre los niveles iniciales y finales del bioensayo.

En el muestreo inicial de lactato, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos 1 y 2. En el muestreo final no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los niveles obtenidos de lactato en hemolinfa fueron menores que los niveles basales reportados para *L. vannamei* bajo condiciones experimentales (Racotta & Palacios 1998, Racotta & Hernández-Herrera 2000, Racotta *et al.* 2002, Mercier *et al.* 2006), encontrando diferencias solo en la toma de muestras inicial con respecto a las diferentes densidades de cultivo pero no al final del bioensayo para ninguna de las densidades con lo cual queda demostrado un nivel de adaptación al estrés por parte de los organismos.

En el conteo de hemocitos, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) para ninguno de los tratamientos y tiempos de muestreo. En los camarones, como en otros invertebrados, los hemocitos son indicadores importantes de parámetros inmunológicos que pueden ser usados como indicadores de salud en los organismos (Zhang *et al.* 2009). En el presente análisis, no se observaron diferencias en los conteos iniciales ni finales.

DESEMPEÑO PRODUCTIVO

En el muestreo inicial de peso (g), se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el tratamiento 2 con respecto a los demás tratamientos. Para el peso final, se mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos 1 y 3 (Tabla 2). Esto coincide con Balakrishnan *et al.* (2011) y Mercier *et al.* (2006) los cuales mencionan que el estrés crónico de manipulación tiene algunos efectos negativos sobre los camarones, ya que en experimentos realizados, los camarones sometidos a estrés tuvieron un menor crecimiento.

La tasa de crecimiento específico de los organismos presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los 3 tratamientos, mostrando una mayor tasa de crecimiento específico para el tratamiento 1 en comparación con los tratamientos 2 y 3, esto coincide nuevamente con Mercier *et al.* (2006) donde se obtuvieron mejores resultados de

Tabla 2. Medias de mínimos cuadrados y error estándar del desempeño productivo de camarón blanco sometido a diferentes densidades de cultivo. Porcentajes de supervivencia y prueba de Chi cuadrado con un nivel $\alpha=0,05$ / Least squares means and standard error of the productive performance of white shrimp subjected to different culture densities. Survival percentages and Chi-square test with a level $\alpha=0.05$

Indicador	3 org/tina	6 org/tina	12 org/tina	Valor de <i>P</i>
Peso Inicial (PI) (g)	5,03 ± 0,07 ^a	5,39 ± 0,07 ^b	4,93 ± 0,12 ^a	(< 0,05)
Peso Final (PF) (g)	11,44 ± 1,02 ^a	9,06 ± 1,10 ^{ab}	6,86 ± 1,58 ^b	(< 0,05)
Tasa de Crecimiento Específica (g)	1,11 ^a	0,76 ^b	0,79 ^b	(< 0,05)
Supervivencia (%)	83,30 ^a	41,66 ^b	4,15 ^c	(< 0,05)
Factor de Conversión Alimenticia (FCA)	8,40 ± 0,97 ^a	22,14 ± 5,76 ^b	36,42 ± 11,56 ^c	(< 0,05)

Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Para Peso Inicial, Peso Final, Tasa de Crecimiento Específica, Promedio ± error estándar

Tabla 3. Promedios de parámetros fisicoquímicos del agua durante el bioensayo / Average of physicochemical parameters of the water during the bioassay

Indicador	OPTIMO	3 org/tina	6 org/tina	12 org/tina	Valor de <i>P</i>
Oxígeno Disuelto (OD, mg mL ⁻¹)	4,0 a 10,0	6,04 ± 0,16	5,86 ± 0,27	6,19 ± 0,16	> 0,05
Temperatura (T, °C)	23 a 30	30,0 ± 0,57	30,3 ± 0,26	30,0 ± 0,17	> 0,05
pH (UpH)	8,1 a 9,0	8,2 ± 0,05	8,2 ± 0,02	8,2 ± 0,04	> 0,05
Salinidad	15 a 35	35 ± 0,00	35 ± 0,00	35 ± 0,00	> 0,05
AMONIO (mg mL ⁻¹)	0,1 a 1,0	0,54 ± 0,29	0,50 ± 0,10	0,44 ± 0,14	> 0,05

Promedio ± error estándar

crecimiento en tanques con menor densidad de organismos cultivados.

La supervivencia de los organismos, resultó significativamente afectada por los cambios de densidad de cultivo (Tabla 2). A este respecto, Mercier *et al.* (2006) mencionan que el estado de salud se ve reflejado en una disminución de la supervivencia de los organismos sometidos a diversos tipos de estresores tales como densidad de cultivo y manipulación.

En el factor de conversión alimenticia la diferencia significativa ($P < 0,05$) fue observada entre todos los tratamientos (Tabla 2). Esto coincide con Sookying *et al.* (2011) que obtuvieron factores de conversión alimenticia

significativamente más altos en densidades de cultivo mayores que en las menores densidades en su estudio en el que evaluaron los efectos de la densidad de cultivo de *L. vannamei* alimentado con harina de soya. De igual manera, Zarain-Herzberg *et al.* (2010), mencionan factores de conversión alimenticia menores a los obtenidos en nuestro estudio, esto puede deberse a que en condiciones de cultivo comercial los organismos se alimentan de productividad primaria de los sistemas de cultivo, lo que no ocurrió en este sistema de bioensayo ya que el agua fue desinfectada y tratada previamente al montaje del bioensayo y con esto se eliminó la productividad existente.

Se observó un mejor desempeño productivo (mayor peso, mayor tasa de crecimiento específico y menor tasa de conversión alimenticia) en los organismos cultivados a menor densidad.

PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS

Los parámetros fisicoquímicos (Tabla 3) se mantuvieron dentro de los intervalos óptimos para el cultivo del camarón blanco durante el desarrollo del experimento, los cuales, de acuerdo con Brock & Main (1994), son: oxígeno disuelto de 4,0 a 10,0 mg L⁻¹; temperatura de 23 a 30°C, pH de 8,1 a 9,0; salinidad de 15 a 35 y amonio de 0,1 a 1,0 mg mL⁻¹.

Por lo tanto, de acuerdo con los datos obtenidos en esta investigación se demuestra que el estrés ocasionado en cultivos a altas densidades altera los parámetros fisiológicos iniciales de los organismos y afecta el crecimiento de los mismos, con lo cual se ve directamente disminuida la producción en sistemas de cultivo. Se sugiere realizar mediciones de parámetros fisiológicos en cultivos comerciales, así como un mayor número de bioensayos con diferentes densidades.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Programa de Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (IPN), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por las becas otorgadas, así como a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) por el apoyo financiero para la realización de la presente investigación. De igual manera, agradece a la granja camaronera 'Aracelita Acuacultores, S. A. de C. V.' por el suministro de los camarones para la realización del experimento.

LITERATURA CITADA

Balakrishnan G, S Peyail, K Ramachandran, A Theivasigamani, KA Savji, M Chokkaiah & P Nataraj. 2011. Growth of cultured White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) in different stocking density. *Advances in Applied Science Research* 2(3): 107-113.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-253.

Brock J & KL Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*, 242 pp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Hall M & E Van Ham. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 290-299.

Hernández-López J & F Vargas-Albores. 2003. A microplate technique to quantify nutrients (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺ and PO₄³⁻) in seawater. *Aquaculture Research* 34: 1201-1204.

Lee DO & J Wickins. 1992. *Crustacean farming*, 464 pp. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

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

Perazzolo M, R Gargioni, P Ogliari & A Barroco. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214: 19-33.

Racotta I & R Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125A: 437-443.

Racotta I & E Palacios. 1998. Haemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29: 351-356.

Racotta I, E Palacios & L Méndez. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 35: 269-275.

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

Sánchez A, C Pascual, F Vargas-Albores, G Le Moullac & C Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimatation. *Aquaculture* 198: 13-28.

Sookying D, FSD Silva, DA Davis & TR Hanson. 2011. Effects of stocking density on the performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured under pond and outdoor tank conditions using a high soybean meal diet. *Aquaculture* 319: 232-239.

Strickland JDH & TR Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Researches Board of Canada, Bulletin 167: 1-310.

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

Zarain-Herzberg M, I Fraga, A Hernández-Llamas. 2010. Advances in intensifying the cultivation of the shrimp *Litopenaeus vannamei* in floating cages. Aquaculture 300: 87-92.

Zhang L, K Mai, B Tan, Q Ai, C Qi, W Xu, W Zhang, Z Liufu, X Wang & H Ma. 2009. Effects of dietary administration of probiotic *Halomonas* sp. B12 on the intestinal microflora, immunological parameters, and midgut histological structure of shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of the World Aquaculture Society 40: 58-66.

Recibida el 15 de octubre de 2013 y aceptada el 23 de septiembre de 2014

Editor: Claudia Bustos D.