



Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the diet of male shrimp *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) on total and differential hemocytes count

Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta de machos del camarón *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) sobre la cuenta total y diferencial de hemocitos

Cornejo Sagástegui, J.¹, Pérez Pérez, L.¹, Reyes Avalos, W.^{2*}

¹Egresados de la Escuela de Biología en Acuicultura. Universidad Nacional del Santa, Perú.

²Laboratorio de Acuicultura. Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Av. Universitaria s/n Urb. Bellamar, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* activated autolyzed yeast, and β -glucans in the diet of male *Cryphiops caementarius* on total and differential counts of hemocytes. 24 male shrimp captured in the Pativilca River of 7.05 ± 1.09 g and 5.9 ± 0.43 cm were used. The shrimp were kept in individual cultivation systems. Three experimental diets (3 % activated yeast, 3 % autolyzed yeast and 0.6 % β -glucans) and a control diet with six replications were used. The total number of hemocytes (33.05×10^5 cell mL^{-1}) was significantly higher ($p < 0.05$) at 30 days with activated yeast than with autolyzed yeast (18.54×10^5 cell mL^{-1}) and with β -glucans (14.53×10^5 cell mL^{-1}). Semigranulocytes and granulocytes hemocytes were significantly higher ($p < 0.05$) at 15 days (14.38×10^5 cell mL^{-1}) and 30 days (18.91×10^5 cell mL^{-1}), respectively with activated yeast. The hyalinocytes decreased with the experimental diets and the atypical hemocytes almost disappear with activated and autolyzed yeast. The results demonstrate that the activated yeast in the diet of male shrimp improves the number hemocytes.

KEY WORDS

Saccharomyces, *Cryphiops caementarius*, β -glucans and hemocytes.

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 22th 2014.

Accepted/Aceptado: December 2st 2014.

*Corresponding Author:

Reyes Avalos, W. Av. Universitaria s/n Urb. Bellamar, Nuevo Chimbote, Ancash, Perú. Phone: +51 989 993 299. E-mail: wreyes_avalos@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* activada, autolizada y los β -glucanos en la dieta de machos de *Cryphiops caementarius* sobre el conteo de hemocitos totales y diferenciales. Se emplearon 24 camarones machos capturados del río Pativilca de 7.05 ± 1.09 g y 5.9 ± 0.43 cm. Los camarones se mantuvieron en sistema de cultivo individual. Se emplearon tres dietas experimentales (3 % levadura activada, 3 % levadura autolizada y 0.6 % β -glucanos) y una dieta control, con seis repeticiones. El número total de hemocitos (33.05×10^5 cel mL^{-1}) fue significativamente más alta ($p < 0.05$) a los 30 días con levadura activada que con levadura autolizada (18.54×10^5 cel mL^{-1}) y con β -glucanos (14.53×10^5 cel mL^{-1}). Los hemocitos granulocitos y semi-granulocitos fueron significativamente altos ($p < 0.05$) a los 15 días (14.38×10^5 cel mL^{-1}) y 30 días (18.91×10^5 cel mL^{-1}), respectivamente, con levadura activada. Los hialinocitos disminuyeron con las dietas experimentales y los hemocitos atípicos casi desaparecen con levadura activada y autolizada. Los resultados demuestran que la levadura activada en la dieta de machos del camarón mejora el número de hemocitos.

PALABRAS CLAVE

Saccharomyces, *Cryphiops caementarius*, β -glucano y hemocitos.

Introduction

Cryphiops caementarius shrimp (Molina, 1782) is a type of species that can stand intense fishery (Zacarias and Yepez, 2008) and possess a wide latitude distribution from the River Taymi in Peru (06° 32' S, Méndez, 1981) until the River Maipo in Chile (33° 26' S, Jara, 1997). In Arequipa-Peru (16° 23' S) this species is abundant (Zacarias and Yepez, 2008) and it has been studied in growth (Aybar, 1982) and reproduction (Bazán *et al.*, 2009); however, there is no information regarding the use of yeast in its diet.

Saccharomyces cerevisiae yeast is used in the production of feed for aquatic organisms (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2002), but it has been limited due to its deficient nutritional value, indigestibility of its cell wall (Lavens and Sorgeloos, 1996) and by palatability, using up to 5 % on the diet of *Penaeus vannamei* (Aguirre, 1994), 2 % on *Macrobrachium amazonicum* (Hisano *et al.*, 2008) and 0.5 % on *M. rosenbergii* (Prasad *et al.*, 2013).

Palatability of *S. cerevisiae* in feed is improved by cellular agglomeration (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2002), cellular fractioning (Comabella *et al.*, 2004) and autolysis, by means of which cell walls and yeast extract with high protein content, essential and no essential amino acids (Perdomo *et al.*, 2004), nucleotides, oligosaccharides, peptides and β -glucans from the internal walls of lysed cells (Comabella *et al.*, 2004) which are joint to chitin and mananos (Aguilar *et al.*, 2005) are obtained. β -glucans stimulate the liberation of superoxide anion, prophenoloxidase (Chang *et al.*, 2000; Sajeevan *et al.*, 2009) and the proliferation of hemocytes (Montesdeoca *et al.*, 2002).

Hemocytes are produced in the hematopoietic tissue in crustaceans (Johansson *et al.*, 2000), and the total and differential number of hemocytes is an indicator of immune alert (Gullian and Rodríguez, 2002) and the state of health (Rodríguez *et al.*, 2000). Granulocyte, semi-granulocyte and hyalinocyte hemocytes have been characterized and quantified in females of *C. caementarius* (Azañero *et al.*, 2006). Granulocyte hemocytes participate in the storage and liberation of prophenoloxidase and cytotoxicity; semi-granulocytes in encapsulation, phagocytosis, cytotoxicity and the prophenoloxidase system; and hyalinocytes in phagocytosis (Johansson *et al.*, 2000).

Lipopolysaccharides, peptidoglycans and β -glucans are immunostimulants (Dehasque *et al.*, 1997) that increase stress and infection resistance in fishes and crustaceans

Introducción

El camarón *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) es una especie que soporta intensa pesquería (Zacarias y Yépez, 2008) y tiene amplia distribución latitudinal desde el río Taymí en Perú (06° 32' S, Méndez, 1981) hasta el río Maipo en Chile (33° 26' S, Jara, 1997). En Arequipa-Perú (16° 23' S) abunda esta especie (Zacarias y Yépez, 2008), habiéndose estudiado la nutrición en el crecimiento (Aybar, 1982) y en la reproducción (Bazán *et al.*, 2009); sin embargo no hay informes del uso de levaduras en la dieta.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada en la formulación de alimentos para organismos acuáticos (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2002), pero ha sido limitada por el deficiente valor nutricional, la indigestibilidad de su pared celular (Lavens y Sorgeloos, 1996) y por la palatabilidad, empleándose hasta 5 % en la dieta de *Penaeus vannamei* (Aguirre, 1994), 2 % en *Macrobrachium amazonicum* (Hisano *et al.*, 2008) y 0.5 % en *M. rosenbergii* (Prasad *et al.*, 2013).

La palatabilidad de *S. cerevisiae* en los alimentos es mejorada mediante la aglomeración celular (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2002), el fraccionamiento celular (Comabella *et al.*, 2004) y la autólisis con el cual se obtienen paredes celulares y extracto de levadura con alto contenido de proteínas, de aminoácidos esenciales y no esenciales (Perdomo *et al.*, 2004), nucleótidos, oligosacáridos, péptidos y los β -glucanos de las paredes internas de las células lisadas (Comabella *et al.*, 2004) que se encuentran unidos a la quitina y a los mananos (Aguilar *et al.*, 2005). Los β -glucanos estimulan la liberación del anión superóxido, la profenoloxidasas (Chang *et al.*, 2000; Sajeevan *et al.*, 2009) y la proliferación de hemocitos (Montesdeoca *et al.*, 2002).

En los crustáceos, los hemocitos son producidos en el tejido hematopoyético (Johansson *et al.*, 2000), y el número total y diferencial de hemocitos son indicadores de alerta inmunitaria (Gullian y Rodríguez, 2002) y del estado de salud (Rodríguez *et al.*, 2000). En hembras de *C. caementarius* se han caracterizado y cuantificado los hemocitos granulocitos, semigranulocitos y hialinocitos (Azañero *et al.*, 2006). Los hemocitos granulocitos participan en almacenamiento y liberación de profenoloxidasas y en citotoxicidad; los semigranulocitos en encapsulación, fagocitosis, citotoxicidad y en el sistema profenoloxidasas; y los hialinocitos en fagocitosis (Johansson *et al.*, 2000).

Los lipopolisacáridos, péptidoglicanos y β -glucanos son inmunostimulantes (Dehasque *et al.*, 1997) que aumentan la resistencia al estrés y a las infecciones en peces y crustáceos (Doñate *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2013). Sin embargo, las res-

(Doñate *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2013). However, responses vary depending on its chemical structure or the number of receptors in the shrimp membrane (Bowie and O'Neill, 2000). β -glucans improve growth and survival of *Litopenaeus vannamei* (Chang *et al.*, 2000), and *M. amazonicum* (Hisano *et al.*, 2008), and yeast improves the immune response of *M. rosenbergii* (Parmar *et al.*, 2012).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* activated autolyzed yeast, and β -glucans in the diet of male *Cryphiops caementarius* on total and differential counts of hemocytes.

Materials and Methods

Fish tanks: four glass fish tanks (0.60 m length; 0.31 m width; 0.35 m height; 0.186 m² area and effective water volume of 55 L) were used, each with a water recirculation system Air-water-lift type, with biological trickling filter and water flow of 1.5 L min⁻¹. Six breeding containers distributed in 2 groups of 3 levels each were installed in each fish tank. Breeding containers of transparent plastic material with lid (21 cm diameter, 284 cm² area and 8 cm depth) had openings (3 cm length x 0.5 cm width) to allow water flow. PVC tubes of ½" diameter which protruded 10 cm from the water level were placed in every breeding container, by which feed was introduced.

Shrimp: they came from the River Pativilca (10°49'59"S – 77°43'09"W) district of Pativilca, Barranca Province, Department of Lima, Peru. Shrimp were transported individually in holey plastic vases of 200 mL, which were set in plastic tanks of 150 L. Duration of transportation was 4 hours and there was no mortality.

Identification and acclimation: species (Méndez, 1981) and sex (Guerra, 1974) of shrimp were identified and then acclimated during a week in fish tanks with dechlorinate potable water and continuous aeration; feeding began at third day of acclimation with commercial balanced feed (30 % total protein).

Selection and seeding: control consisted of 24 male shrimp with complete cephalothorax appendices, with no sign of laceration in the body and molting stages between C and D₁ (Reyes and Lujan, 2003), which were selected randomly from a lot of 50 adults. Selected shrimp were 7.05 ± 1.09 g and 5.9 ± 0.43 cm of total length (TL: Postorbital opening – Rear end of the telson). A randomly chosen shrimp was assigned to each breeding container, meaning six shrimp per fish tank

puestas varían dependiendo de su estructura química o del número de receptores de membrana del camarón (Bowie and O'Neill, 2000). Los β -glucanos mejoran el crecimiento y la supervivencia de *Litopenaeus vannamei* (Chang *et al.*, 2000) y de *M. amazonicum* (Hisano *et al.*, 2008), y la levadura mejora la respuesta inmune de *M. rosenbergii* (Parmar *et al.*, 2012).

Por consiguiente, el objetivo fue evaluar el efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* activada, autolizada y los β -glucanos en la dieta de machos de *C. caementarius* sobre el conteo de hemocitos totales y diferenciales.

Materiales y Métodos

Acuarios: se utilizaron cuatro acuarios de vidrio (0.60 m de largo; 0.31 m de ancho; 0.35 m de alto; con área de 0.186 m² y volumen efectivo de agua 55 L) cada uno con un sistema de recirculación de agua de tipo Air-water-lift, con filtro biológico percolador y con flujo de agua de 1.5 L min⁻¹. En cada acuario se instalaron seis recipientes de crianza, distribuidos en 2 grupos de 3 niveles cada uno. Los recipientes de crianza de material plástico transparente con tapa (21 cm de diámetro, 284 cm² de área y 8 cm de profundidad) tuvieron aberturas (3 cm de largo x 0.5 cm de ancho) para permitir el flujo de agua. En cada recipiente de crianza se colocó un tubo de PVC de ½" de diámetro que sobresalió 10 cm sobre el nivel del agua, por donde se introdujo el alimento.

Camarones: procedieron del río Pativilca (10°49'59"S – 77°43'09"W) distrito de Pativilca, Provincia de Barranca, Departamento de Lima, Perú. Los camarones se transportaron individualmente en vasos plásticos agujereados de 200 mL que se acondicionaron dentro de finas de plástico de 150 L. La duración del transporte fue de 4 h y no hubo mortalidad.

Identificación y aclimatación: se identificó la especie (Méndez, 1981) y el sexo (Guerra, 1974) de los camarones y luego se aclimataron durante una semana en acuarios con agua potable de clorada y con aireación continua; y la alimentación se inició al tercer día de aclimatación con balanceado comercial (30 % de proteína total).

Selección y siembra: la muestra consistió de 24 camarones machos con apéndices cefalotorácicos completos, sin ningún signo de laceraciones en el cuerpo y en estados de muda entre C y D₁ (Reyes y Lujan, 2003) que se seleccionaron al azar de un lote de 50 adultos. Los camarones seleccionados fueron de 7.05 ± 1.09 g y 5.9 ± 0.43 cm de longitud total (LT: Escotadura postorbital – Extremo posterior del telson). En

were seeded (32 shrimp/m²). Each shrimp constituted a unit of analysis.

Diet: basal diet was the one formulated by Reyes (2012) and the yeast and its derivatives were used as supplements. Commercial yeast Fleishmann® was used. Activation of yeast was made using the method of Martínez-Rodríguez *et al.*, (2001) and Perdomo *et al.*, (2004) which was modified in incubation by 24 h at 37 °C. Yeast was autolized with the method of Tangüler and Erten (2009) which was modified in centrifuging by 5000 rpm during 15 min. The β -glucans were obtained with the method of Li *et al.*, (2006), with the modification in pressure of 1 Kg cm⁻¹ during 45 min in autoclave and centrifuging was 2000 rpm during 15 min.

Experimental design: three experimental diets were used: supplemented diet with 3 % activated yeast, 3 % autolized yeast and 0.6 % of β -glucans of yeast. As control only basal diet was used. There were six repetitions in all treatments.

Feeding: shrimp were fed from the first day of seeding until the end of the working with the elaborated diet (30 % total protein). Daily portion was 8 % of the humid weight of the shrimp, they were fed twice a day (08:00 and 18:00 h) and during six days a week.

Extraction of hemolymph: hemolymph was extracted from the pericardial sinus of living animals by using a 1 mL syringe (Insulin Syringe 26 G^{1/2}) according to Jussila (1997), likewise, preparations in fresh of hemolymph with storage solution of Alsever at 4 °C were made.

Counting of hemocytes: for the determination of the total number of hemocytes (TNH) and the differential number of hemocytes (DNH), 20 μ L of extracted hemolymph were measured and added to a microtube (Eppendorf) containing 80 μ L of modified Alsever solution according to Rodríguez *et al.*, (2000) and Van de Braak (2002). Samplings were made at the beginning, at 15 days and at 30 days. TNH and DNH (HH hyalinocyte, SGH semi-granulocyte and GH granulocyte hemocytes) were determined according to Azañero *et al.*, (2006) and with the formulas of Jussila (1997). The counting was made in a Neubauer chamber and a microscope LEICA DM LS2 of conventional light in a lighting field provided with phasing contrast.

Water quality: cleaning of the fish tanks was made daily by syphoning of the solid wastes. 30 % of the water of each fish tank was renovated twice a week.

cada recipiente de crianza se asignó un camarón al azar, es decir, se sembraron seis camarones por acuario (32 camarones m²). Cada camarón constituyó una unidad de análisis.

Dietas: la dieta basal fue la formulada por Reyes (2012) y la levadura y sus derivados se emplearon como suplementos. Se empleó levadura comercial Fleishmann®. La activación de la levadura se realizó con el método de Martínez-Rodríguez *et al.*, (2001) y Perdomo *et al.*, (2004) que se modificó en la incubación por 24 h a 37 °C. La levadura fue autolizada con el método de Tangüler y Erten (2009) que se modificó en la centrifugación por 5000 rpm por 15 min. Los β -glucanos fueron obtenidos con el método de Li *et al.*, (2006), con la modificación en la presión de 1 Kg cm⁻¹ por 45 min en autoclave y la centrifugación fue de 2000 rpm por 15 min.

Diseño experimental: se emplearon tres dietas experimentales: Dietas suplementada con 3 % de levadura activada, 3 % de levadura autolizada y con 0.6 % de β -glucanos de levadura. Como control se empleó solo la dieta basal. En todos los tratamientos hubo seis repeticiones.

Alimentación: los camarones se alimentaron desde el primer día de siembra hasta el final del trabajo con la dieta elaborada (30 % de proteína total). La ración diaria fue del 8 % del peso húmedo por camarón, se alimentaron dos veces por día (08:00 y 18:00 h) y durante seis días a la semana.

Extracción de hemolinfa: la hemolinfa se extrajo del seno pericárdico de los animales vivos usando una jeringa de 1 mL (Insulin Syringe 26 G^{1/2}) según Jussila (1997) así mismo se realizaron preparaciones en fresco de la hemolinfa con solución de Alsever almacenada a 4 °C.

Recuento de hemocitos: para la determinación del número total de hemocitos (NTH) y el número diferencial de hemocitos (NDH), se midieron 20 μ L de hemolinfa extraída y se adicionaron a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 80 μ L de solución de Alsever modificado según Rodríguez *et al.*, (2000) y Van de Braak (2002). Los muestreos se realizaron al inicio, a los 15 y 30 días. El NTH y el NDH (hemocitos hialinocitos HH, semigranulocitos HSG y granulocitos HG) se determinaron según Azañero *et al.*, (2006) y con las fórmulas de Jussila (1997). El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y un microscopio LEICA DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases.

Calidad del agua: la limpieza de los acuarios se realizó diariamente por sifoneo de los desechos sólidos. El 30 % del agua de cada acuario se renovó dos veces por semana. La calidad del agua se monitoreó cada seis

Water quality was monitored every six days. Temperature was determined with digital thermometer (± 0.01 °C), dissolved oxygen was determined with Portable Hach Oximeter LDO (± 0.01 mg L⁻¹), pH with a digital pH-meter 110 (± 0.01 units), total ammonium and nitrites were determined with the Nutrafin Test (± 0.1 mg L⁻¹).

Statistical analysis: numeric data per sampling were submitted to variance homogeneity, variance analysis of one way and Tukey test, in both cases, with 5 % significance. Results are presented as a mean \pm standard deviation. Statistical analysis were made using the SPSS software version 18 for Windows.

Results and Discussion

Basal TNH of shrimp were $3.26 \pm 0.09 \times 10^5$ cell mL⁻¹, but at 15 days there was a significant increase ($p < 0.05$) between 5 to 6 times with the experimental diets, control did not vary. At 30 days, TNH of the ones fed with activated yeast increased significantly ($p < 0.05$) 10 times in relation with the basal, and during this time it was significantly higher ($p < 0.05$) than with autolyzed yeast and β -glucans, which were kept constant during this 15 days, except the control, which increased significantly ($p < 0.05$) (Figure 1).

Basal GH of shrimp were $0.72 \pm 0.02 \times 10^5$ cell mL⁻¹, but at 15 days there was a significant increase ($p < 0.05$) 20 times in the ones fed with activated yeast, 14 times with autolyzed yeast and 11 times with β -glucans; during

días. Se determinaron la temperatura con termómetro digital (± 0.01 °C), el oxígeno disuelto con Oxímetro Hach Portátil LDO (± 0.01 mg L⁻¹), el pH con un pH-metro digital 110 (± 0.01 unidades), el amonio total y los nitritos con el Test Nutrafin (± 0.1 mg L⁻¹).

Análisis estadístico: los datos numéricos por cada muestreo fueron sometidos a homogeneidad de varianza, análisis de varianza de una vía y a la prueba de Tukey, en ambos casos con significancia del 5 %. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se efectuaron con el Software SPSS versión 18 para Windows.

Resultados y Discusión

El NTH basales de los camarones fueron de $3.26 \pm 0.09 \times 10^5$ cel mL⁻¹, pero a los 15 días hubo incremento significativo ($p < 0.05$) entre 5 a 6 veces con las dietas experimentales, no existió variación en el control. A los 30 días el NTH de los alimentados con levadura activada se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en 10 veces en relación al basal y en este tiempo fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que con levadura autolizada y con β -glucanos que se mantuvieron constantes en estos últimos 15 días, excepto el control que incrementó significativamente ($p < 0.05$) (Figura 1).

Los HG basales de los camarones fueron de $0.72 \pm 0.02 \times 10^5$ cel mL⁻¹, pero a los 15 días hubo incremento significativo ($p < 0.05$) de 20 veces en los alimentados con levadura activada, de 14 veces con levadura autolizada

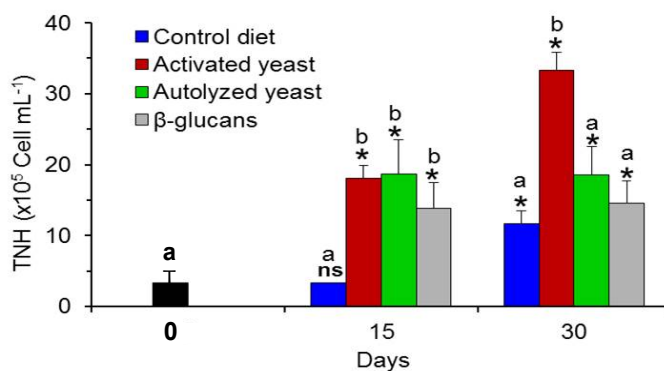


Figure 1. Variation on the total number of hemocytes (TNH) in males of *C. caementarius*, according to treatments. Same letters on bars indicate there is no significant difference ($p > 0.05$) for each sampling, and asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation with the initial value and ns means non-significant to the initial value.

Figura 1. Variación del número total de hemocitos (NTH) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) por cada muestreo y los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al valor inicial y ns es no significativo al valor inicial.

this time there were significant differences ($p < 0.05$) between the ones fed with activated yeast and β -glucans; in contrast, control kept constant. At 30 days, GH were almost constant in the ones fed with activated yeast, thus significantly higher ($p < 0.05$) than the other diets which even decreased in number with no significant differences ($p > 0.05$) during this last 15 days, except the control, which increased significantly ($p < 0.05$) (Figure 2).

Basal SGH of shrimp were of $2.10 \pm 0.92 \times 10^5$ cell mL^{-1} and at 15 days there was a slight significant increase ($p < 0.05$) with experimental diets, 4 times more than with autolyzed yeast, 3 times with β -glucans and 2 times with activated

y de 11 veces con β -glucanos; y durante este tiempo hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los alimentados con levadura activada y β -glucanos; en cambio en el control se mantuvo constante. A los 30 días los HG se mantuvieron casi constante en los alimentados con levadura activada, siendo significativamente alto ($p < 0.05$) que las demás dietas que incluso disminuyeron en número sin diferencias significativas ($p > 0.05$) en estos últimos 15 días, excepto el control que incrementó significativamente ($p < 0.05$) (Figura 2).

Los HSG basales de los camarones fueron de $2.10 \pm 0.92 \times 10^5$ cel mL^{-1} y a los 15 días hubo ligero incremento significativo ($p < 0.05$) con las dietas experimentales, de 4 veces con levadura autolizada, de 3 veces con β -glucanos y de 2 veces con

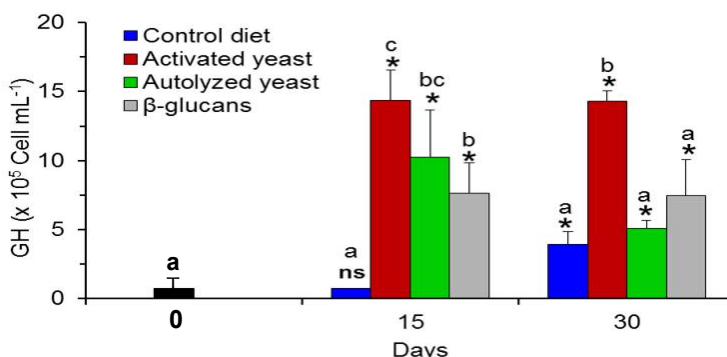


Figure 2. Variation on the number of granulocyte hemocytes (GH) in males of *C. caementarius*, according to treatments. Same letters on bars indicate there is no significant difference ($p > 0.05$) for each sampling, and asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation with the initial value and ns means non-significant to the initial value.

Figura 2. Variación del número de hemocitos granulocitos (HG) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) por cada muestreo y los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al valor inicial y ns es no significativo al valor inicial.

yeast; control did not vary. At 30 days, SGH on the ones fed with activated yeast increased significantly ($p < 0.05$) 9 times in relation with the basal, and during this time it was statistically similar ($p > 0.05$) with autolyzed yeast, which increased 6 times in relation with basal; the ones fed with β -glucans remained constant and control increased thus significantly ($p < 0.05$) 3 times in the last 15 days (Figure 3).

Basal HH of shrimp were $0.19 \pm 0.31 \times 10^5$ cell mL^{-1} and at 15 days they decreased to almost half with activated yeast and there was a decrease with autolyzed and in

levadura activada; en el control no varió. A los 30 días los HSG de los alimentados con levadura activada se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en 9 veces en relación al basal y en este tiempo fue estadísticamente similar ($p > 0.05$) con levadura autolizada que se incrementó en 6 veces en relación al basal; los alimentados con β -glucanos permanecieron constantes y el control incrementó significativamente ($p < 0.05$) 3 veces en los últimos 15 días (Figura 3).

Los HH basales de los camarones fueron de $0.19 \pm 0.31 \times 10^5$ cel mL^{-1} y a los 15 días disminuyeron casi a la mitad con levadura activada y hubo una ligera disminución con autolizada y en el control pero sin diferencias significativas

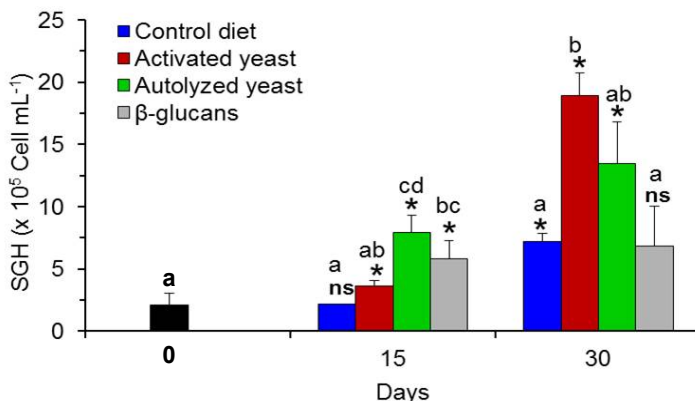


Figure 3. Variation on the number of semi-granulocyte hemocytes (SGH) in males of *C. caementarius*, according to treatments. Same letters on bars indicate there is no significant difference ($p > 0.05$) for each sampling, and asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation with the initial value and ns means non-significant to the initial value.

Figura 3. Variación del número de hemocitos semi granulocitos (HSG) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) por cada muestreo; los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al valor inicial y ns es no significativo al valor inicial.

the control, with no significant differences ($p > 0.05$) with basal or amongst them; in contrast, with β -glucans it decreased significantly ($p < 0.05$) 11 times in relation with the basal. At 30 days, HH of the ones fed with experimental diets decreased significantly ($p > 0.05$) in relation with the basal and during this time there was no significant difference ($p < 0.05$) amongst them, but the highest tendency to decrease was obtained by the β -glucans; in contrast, HH of control were kept similar to the basal but significantly higher ($p < 0.05$) than the ones with the experimental diets (Figure 4).

($p > 0.05$) con los basales ni entre ellas; en cambio con β -glucanos disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en 11 veces en relación con el basal. A los 30 días los HH de los alimentados con las dietas experimentales disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en relación a los basales y durante este tiempo no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellas, pero la mayor tendencia a disminuir fue obtenida con β -glucanos; en cambio en el control los HH se mantuvieron similar al basal pero significativamente alto ($p < 0.05$) en relación con las dietas experimentales (Figura 4).

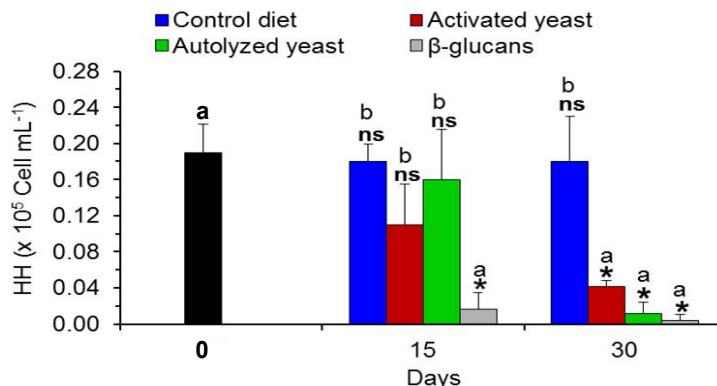


Figure 4. Variation on the number of hyalinocyte hemocytes (HH) in males of *C. caementarius*, according to treatments. Same letters on bars indicate there is no significant difference ($p > 0.05$) for each sampling, and asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation with the initial value and ns means non-significant to the initial value.

Figura 4. Variación del número de hemocitos hialinocitos (HH) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) por cada muestreo; los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al valor inicial y ns es no significativo al valor inicial.

HA basal of shrimp were $0.28 \pm 0.07 \times 10^5$ cell mL^{-1} and at 15 days they decreased abruptly ($p < 0.05$) in the ones fed with activated yeast until almost disappearing at 30 days, differing significantly ($p < 0.05$) with the basal both times. In contrast, with autolyzed yeast, β -glucans and control there was no significant difference ($p > 0.05$) amongst them nor with the basal at 15 days. At 30 days, HA of the ones fed with activated and autolyzed yeast almost disappeared, in contrast with β -glucans it decreased slightly and in control it increased slightly, in both cases there was no difference ($p > 0.05$) with basal but they did differ significantly ($p < 0.05$) amongst them (Figure 5).

During the study there was no record of shrimp mortality in any of the treatments. Water quality parameters measured during the experiments did not show significant variation ($p > 0.05$) amongst treatments, which assures the results obtained with the diets. Temperature varied from 22.28 to 24.54°C, pH from 7.05 to 7.21, dissolved oxygen from 3.82 to 5.28 mg L^{-1} , nitrites were 0.1 mg L^{-1} and there was no total ammonium.

In this study, the rapid increase of TNH and SGH at 30 days, GH at 15 days and the decrease of HH and mainly of HA from the 15 days of experimentation, constitute the first

Los HA basales de los camarones fueron de $0.28 \pm 0.07 \times 10^5$ cel mL^{-1} y a los 15 días disminuyeron abruptamente ($p < 0.05$) en los alimentados con levadura activada hasta casi desaparecer a los 30 días difiriendo significativamente ($p < 0.05$) con el basal en ambos tiempos. En cambio, con levadura autolizada, con β -glucanos y el control no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos ni con el basal a los 15 días. A los 30 días los HA de los alimentados con levadura activada y autolizada casi desaparecieron, en cambio con β -glucanos disminuyó ligeramente y en el control aumentó ligeramente en ambos casos no hubo diferencia ($p > 0.05$) con el basal pero si difirieron significativamente ($p < 0.05$) entre ellos (Figura 5).

Durante el estudio no se registró mortalidad de camarones en ninguno de los tratamientos. Los parámetros de calidad del agua medidos durante la experiencia no mostraron variación significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos lo que asegura los resultados obtenidos con las dietas. La temperatura varió de 22.28 a 24.54°C, el pH de 7.05 a 7.21, el oxígeno disuelto de 3.82 a 5.28 mg L^{-1} , los nitritos fue de 0.1 mg L^{-1} y no hubo amonio total.

En el presente estudio, el rápido incremento del TNH y de HSG a los 30 días, de HG a los 15 días, y la disminución de HH y principalmente de HA a partir de los 15 días de

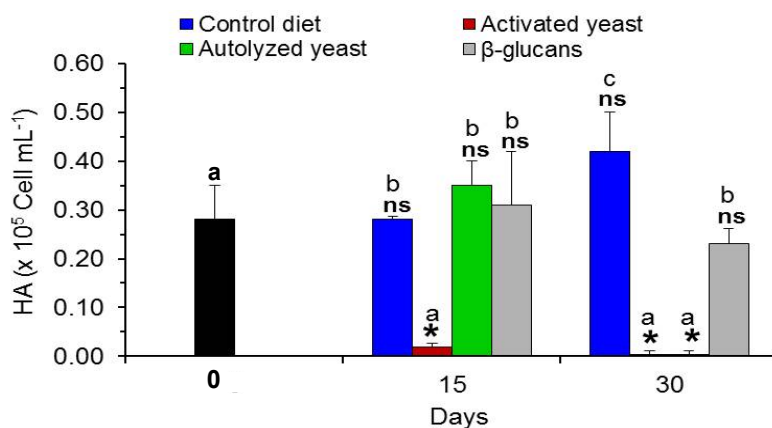


Figure 5. Variation on the number of atypical hemocytes (AH) in males of *C. caementarius*, according to treatments. Same letters on bars indicate there is no significant difference ($p > 0.05$) for each sampling, and asterisks indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation with the initial value and ns means non-significant to the initial value.

Figura 5. Variación del número de hemocitos atípicos (HA) en machos de *C. caementarius*, según tratamientos. Letras iguales sobre las barras indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) por cada muestreo; los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) con relación al valor inicial y ns es no significativo al valor inicial.

evidence of use of activated, autolyzed yeast and β -glucans on the diet on variation of number of total and differential hemocytes in males of *C. caementarius*.

The basal TNH and DNH analysis shows the numeric deficiency of hemocytes in *C. caementarius* from the River Pativilca. Hence, basal TNH (3.63×10^5 cell mL⁻¹) were seven times lower in relation with the reported for females of the same species (25.50×10^5 cell mL⁻¹) from the River Lacramarca (Azañero et al., 2006), which could be due to genre, proceeding of organisms and, as it will be explained later, the immune state. TNH and DNH in crustaceans depends on the species, sex, proceeding, season, lab conditions, count methods, water quality (Gelibolu et al., 2009), feed, stimulating substances (Sarlin and Philip, 2011) and the state of immune response (Yao et al., 2006). In crustaceans, THN seem to be specific species as in males of *Callinectes sapidus* (216.43×10^4 cell mL⁻¹; Gelibolu et al., 2009) and *Carcinus aestuarii* (6.4×10^6 cell mL⁻¹; Matozzo and Marin, 2010), and in postlarvae of *M. rosenbergii* (7.81×10^6 cell mL⁻¹; Parmar et al., 2012).

Likewise, the basal number of GH (0.71×10^5 cell mL⁻¹) as well as basals of SGH (2.10×10^5 cell mL⁻¹) and HH (0.19×10^5 cell mL⁻¹) of shrimp were respectively 14 and 7 times lower than the reported by Azañero et al., (2006) for female of the same species (10.54×10^5 cell mL⁻¹; 13.71×10^5 cell mL⁻¹ and 1.25×10^5 cell mL⁻¹, respectively), which would indicate the deficient immune state of shrimp, since GH participate in storing and liberation of prophenoloxidase and cytotoxicity; SGH in encapsulation, phagocytosis, cytotoxicity and prophenoloxidase system; and HH in phagocytosis (Johansson et al., 2000). In males of *C. sapidus* high values of GH (82.63×10^4 cell mL⁻¹), SGH (112.35×10^4 cell mL⁻¹) and HH (21.44×10^4 cell mL⁻¹) (Gelibolu et al., 2009) are reported.

In addition, the initial presence of HA in all shrimp and the significant increase only in control treatment at 30 days, would also sustain the deficient initial immune state of shrimp that aggravated in captivity. The high concentration of HA shows a deficient immune state, a low replacement capacity with new hemocytes and a free circulation of worn-out or apoptotic cells (Maldonado, 2003). However, the rapid decrease of HA in only 15 days, when fed with activated and autolyzed yeast, would show the rapid effect that both forms of using yeast had to increase TNH, GH and SGH.

experimentación, constituye la primera evidencia del uso de levadura activada, autolizada y β -glucanos en la dieta sobre la variación del número de hemocitos totales y diferenciales en machos de *C. caementarius*.

El análisis del NTH y NDH basales muestra la deficiencia numérica de hemocitos de *C. caementarius* del río Pativilca. Así, el NTH basales (3.63×10^5 cel mL⁻¹) fueron siete veces más bajo en relación con lo reportado para hembras de la misma especie (25.50×10^5 cel mL⁻¹) del río Lacramarca (Azañero et al., 2006), lo cual podría deberse al género, a la procedencia de los organismos y como se explicará más adelante al estado inmunológico. El NTH y el NDH en crustáceos depende de la especie, sexo, procedencia, estación, condiciones de laboratorio, métodos de conteo, calidad del agua (Gelibolu et al., 2009), alimento, sustancias estimulantes (Sarlin y Philip, 2011) y el estado de respuesta inmune (Yao et al., 2006). En los crustáceos el NTH parece especie específica como en machos de *Callinectes sapidus* (216.43×10^4 cel mL⁻¹; Gelibolu et al., 2009) y de *Carcinus aestuarii* (6.4×10^6 cel mL⁻¹; Matozzo y Marin, 2010), y en postlarvas de *M. rosenbergii* (7.81×10^6 cel mL⁻¹; Parmar et al., 2012).

De igual manera, el número basal de los HG (0.71×10^5 cel mL⁻¹) así como los basales de HSG (2.10×10^5 cel mL⁻¹) y HH (0.19×10^5 cel mL⁻¹) de los camarones fueron, respectivamente, 14 y 7 veces más bajos que lo reportado por Azañero et al., (2006) para hembras de la misma especie (10.54×10^5 cel mL⁻¹; 13.71×10^5 cel mL⁻¹ y 1.25×10^5 cel mL⁻¹, respectivamente), lo que indicaría el deficiente estado inmunitario de los camarones; pues los HG participan en almacenamiento y liberación de profenoloxidasas y en citotoxicidad; los HSG en encapsulación, fagocitosis, citotoxicidad y en el sistema profenoloxidasas; y los HH en fagocitosis (Johansson et al., 2000). En machos de *C. sapidus* se reportan altos valores de HG (82.63×10^4 cel mL⁻¹), HSG (112.35×10^4 cel mL⁻¹) y HH (21.44×10^4 cel mL⁻¹) (Gelibolu et al., 2009).

Además, la presencia inicial de HA en todos los camarones y el incremento significativo solo en el tratamiento control a los 30 días sustentaría también el deficiente estado inmunitario inicial de los camarones que se agravaron con el cautiverio. La alta concentración de HA demuestra un deficiente estado inmunitario, una baja capacidad de reemplazo con hemocitos nuevos y una libre circulación de células inmunitarias desgastadas o apoptóticas (Maldonado, 2003). Sin embargo, la rápida disminución de los HA en solo 15 días, cuando se alimentaron con levadura activada y autolizada, demostraría el rápido efecto que tuvieron ambas formas de usar la levadura para incrementar el NTH, los HG y HSG.

As the experiment advanced and up to the 30 days, TNH of shrimp fed with activated yeast had an exponential increase 10 times more (33.63×10^5 cell mL⁻¹) to the basal count; in contrast, with autolyzed yeast and β -glucans the increase was of only 5 times but with tendency to stabilize within time, which would prove the capacity that activated yeast has to rapidly and progressively increase TNH in the species, improving so its immune state. Le Moullac *et al.*, (2000), consider that shrimp with a high level of TNH resists better to infection, and ascent of TNH count is due to the additive used. In addition, digestion of full yeast within the digestive tract of shrimp must have glucans of the internal wall of cells of yeast, as reported by Zlatkovic *et al.*, (2003), which would have allowed an adequate immune stimulation, as happens in *L. vannamei* (Burgents *et al.*, 2004).

Even when β -glucans of yeast are used as immunostimulants in diverse crustaceans (Chang *et al.*, 2000; Maldonado, 2003), they were not capable to continue increasing TNH in the species as activated yeast did, probably due to the modification of the used technique. Zlatkovic *et al.*, (2003) consider that one of the highest difficulties in the purification of glucans of yeast is its separation, since they are associated to chitin and mananos. Similar difficulty must have happened with autolyzed yeast. Therefore, β -glucans and activated yeast obtained in this study were not able to continue stimulating hemocytes proliferation, being convenient to experiment with this additives but of certified quality.

The highest and most significant number of GH were obtained with activated yeast (14.37×10^5 cell mL⁻¹) within the first 15 days, maintaining in similar concentration of GH or also with the maximum capacity that activated yeast would have to stimulate, in short time, the proliferation of GH, hence the immune system would improve. Johansson *et al.*, (2000) consider that GH prepare shrimp to face invasion of microorganisms through the liberation of prophenoloxidase and by cytotoxicity.

In the case of diets with autolyzed yeast and β -glucans, they provoked increase of GH at 15 days of feeding, but the decrease at 30 days would indicate they are not adequate to stimulate proliferation of GH in the species. Low concentration of GH obtained with β -glucans could be related to the used concentration (0.6 %) in the diet, since Lanz *et al.*, (1993) found that a high concentration

Conforme avanzó la experimentación y hasta los 30 días, el NTH de los camarones alimentados con levadura activada tuvo un incremento exponencial que fue 10 veces más (33.63×10^5 cel mL⁻¹) al conteo basal; en cambio con levadura autolizada y con β -glucanos el incremento fue solo de 5 veces pero con tendencia a estabilizarse con el tiempo, lo que demostraría la capacidad que tendría la levadura activada para incrementar en forma rápida y progresiva el NTH en la especie, mejorando con ello su estado inmunológico. Le Moullac *et al.*, (2000), consideran que el camarón con un alto NTH resiste mejor la infección y el ascenso en el conteo del NTH es debido al aditivo empleado. Además, la digestión de la levadura entera dentro del tracto digestivo del camarón debe haber dejado expuestos los glucanos de la pared interna de las células de levadura, como es reportado por Zlatkovic *et al.*, (2003), lo que habría permitido una adecuada estimulación inmunológica, como sucede en *L. vannamei* (Burgents *et al.*, 2004).

Aun cuando los β -glucanos de levadura son empleados como inmunostimulantes en diversos crustáceos (Chang *et al.*, 2000; Maldonado, 2003), estos no fueron capaces de continuar incrementando el NTH en la especie como lo hizo la levadura activada, probablemente por la modificación de la técnica empleada. Zlatkovic *et al.*, (2003) consideran que una de las mayores dificultades en la purificación de glucanos de levadura es su separación, desde que ellos están asociados a la quitina y a los mananos. Similar dificultad debe haber ocurrido con la levadura autolizada. Por consiguiente, los β -glucanos y la levadura autolizada obtenidos en este estudio no fueron capaces de continuar estimulando la proliferación de hemocitos, siendo conveniente experimentar con estos aditivos pero de calidad certificada.

El más alto y significativo número de HG se obtuvieron con levadura activada (14.37×10^5 cel mL⁻¹) en los primeros 15 días manteniéndose en similar concentración hasta los 30 días, lo que sugiere que ésta podría ser la máxima concentración de HG o también la máxima capacidad que tendría la levadura activada para estimular, en corto tiempo, la proliferación de los HG, con lo cual se mejoraría el estado inmunitario. Johansson *et al.*, (2000) consideran que los HG preparan a los camarones para enfrentar la invasión de microorganismos a través de la liberación de prophenoloxidasa y mediante citotoxicidad.

En el caso de las dietas con levadura autolizada y β -glucanos ocasionaron incremento de HG a los 15 días de alimentación, pero la disminución a los 30 días indicaría que no son adecuados para estimular la proliferación de HG en la especie. La baja concentración de HG obtenida con β -glucanos podría estar relacionado con la concentración empleada en la dieta (0.6 %), toda vez que Lanz *et al.*, (1993) encontraron que alta

of β -glucans is ineffective in activating the prophenoloxidase system in *Procambarus clarkii*, and Le Moullac *et al.*, (2000) determined that there is a discussion on the feeding level with β -glucans and they recommend to use between 0.1 % and 1.0 % of β -glucans in the diet to obtain the effects on the immune response on Peneid.

Diets with autolyzed yeast and β -glucans slightly stimulated the proliferation of SGH at 15 days, but at 30 days the highest significant stimulations were obtained with activated yeast (18.91×10^5 cell mL⁻¹). In female of *C. caementarius* the number of SGH is 13.71×10^5 cell mL⁻¹ (Azañero *et al.*, 2006). Obtained results suggest that SGH of shrimp would require longer (30 days) to proliferate, even when fed with activated yeast, time in which shrimp would find in a better immune state. According to Lanz *et al.*, (1993) and Johansson *et al.*, (2000), SGH protect from the invasion of pathogens by the encapsulation, phagocytosis, cytotoxicity and liberation of prophenoloxidase.

Even though basal HH of shrimp were low (0.19×10^5 cell mL⁻¹), when compared to what was reported for female of the same species (1.25×10^5 cell mL⁻¹, Azañero *et al.*, 2006), they decreased even more in all treatments during the experiment, except in control, which was constant. This decrease in HH seem to be due to the increase of GH and SGH, and also they could be an indicator on the improvement of the state of health and immune state of shrimp. In *L. vannamei* and *P. chinensis*, HH increase when there is a viral infection (Kim *et al.*, 1999; Montesdeoca *et al.*, 2002) and in *Eriocheir sinensis* due to the high phagocytic activity of HH (Lv *et al.*, 2014).

Results of this study suggest the use of activated yeast (*S. cerevisiae*) to improve TNH and DNH in males of *C. caementarius*, although it would be convenient to evaluate other immune parameters complemented with histopathological analysis to better understand the state of health of the species.

References

- Aguilar, B., Solis, J. and François, J. 2005. Estudio de la variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. e-Gnosis 3: 1-8. <http://www.redalyc.org/pdf/730/73000312.pdf>
- Aguirre, G. 1994. Evaluación nutricional de diferentes levaduras como fuente de proteínas y/o probiótico en la alimentación del camarón blanco *Penaeus vannamei*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Aguirre-Guzmán, G., Ricque-Marie, G.D. and Cruz-Suárez, L.E. 2002. Survival of agglomerated *Saccharomyces cerevisiae* in pelleted shrimp feeds. *Aquaculture* 208:125-135. <http://ac.els-cdn.com/S0044848601007116/1-s2.0->

concentración de β -glucanos es inefectiva en activar el sistema profenoloxidasas en *Procambarus clarkii*, y Le Moullac *et al.*, (2000) determinan que hay una discusión sobre el nivel de alimentación con β -glucanos y recomiendan emplear entre 0.1 % y 1.0 % de β -glucanos en la dieta para obtener los efectos en la respuesta inmune en peneidos.

Las dietas con levadura autolizada y con β -glucanos estimularon levemente la proliferación de HSG a los 15 días, pero a los 30 días la mayor estimulación significativa fue obtenida con levadura activada (18.91×10^5 cel mL⁻¹). En hembras de *C. caementarius* el número de HSG es de 13.71×10^5 cel mL⁻¹ (Azañero *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos sugieren que los HSG de los camarones requerirían más tiempo (30 días) en proliferar, aun alimentados con levadura activada, tiempo en el cual los camarones se encontrarían en un mejor estado inmunológico. Según Lanz *et al.*, (1993) y Johansson *et al.*, (2000) los HSG protegen de la invasión de patógenos mediante la encapsulación, fagocitosis, citotoxicidad y liberación de profenoloxidasas.

Aun cuando los HH basales de los camarones fueron bajos (0.19×10^5 cel mL⁻¹), si lo comparamos con lo reportado para hembras de la misma especie (1.25×10^5 cel mL⁻¹, Azañero *et al.*, 2006), estos disminuyeron aún más en todos los tratamientos durante el experimento, excepto en el control que se mantuvo constante. Esta disminución de los HH pareciera ser debido al incremento de los HG y los HSG, y que además podría ser indicador del mejoramiento del estado de salud y del estado inmunitario de los camarones. En *L. vannamei* y en *P. chinensis* los HH se incrementan cuando hay infección viral (Kim *et al.*, 1999; Montesdeoca *et al.*, 2002) y en *Eriocheir sinensis* debido a la alta actividad fagocítica de los HH (Lv *et al.*, 2014).

Los resultados del presente estudio sugieren el uso de levadura activada (*S. cerevisiae*) para mejorar el NTH y NDH en machos de *C. caementarius*, aunque sería conveniente evaluar otros parámetros inmunológicos complementados con análisis histopatológico para entender mejor el estado de salud de la especie.

- [S0044848601007116-main.pdf?_tid=d5275f82-edca-11e4-831e-00000aacb35d&acdnat=1430241794_b20c-83da66c790a56b8727a6f6514212](http://www.scribd.com/document/244484860/1007116-main.pdf?_tid=d5275f82-edca-11e4-831e-00000aacb35d&acdnat=1430241794_b20c-83da66c790a56b8727a6f6514212)
- Ayvar, F.K. 1982. Pruebas comparativas de raciones balanceadas de diferentes niveles de proteína en la crianza de camarones de río (*Cryphiops caementarius*) en ambientes cerrados. (Tesis de Título). Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú.
- Azañero, C., Reyes, W., Lujan, H., Oviedo, R. and Saucedo, F. 2006. Caracterización hemocitaria del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina, 1872 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) río Lacramarca (Provincia del Santa, Departamento de Ancash, Perú). Civa 2006. *Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2006*, pp. 774-781. Disponible en <http://www.revistaaquatic.com/civa2006/coms/completo.asp?cod=215> (Consultado el 19 de noviembre 2014).
- Bazán, M., Gámez, S. and Reyes, W.E. 2009. Rendimiento reproductivo de hembras de *Cryphiops caementarius* (Crustacea: Palaemonidae) mantenidas con alimento natural. *Revista Peruana de Biología*; 16(2): 191-193. <http://www.redalyc.org/pdf/1950/195014939011.pdf>
- Bowie, A. and O'Neill, L. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology* 67: 508-514. <http://www.jleukbio.org/content/67/4/508.abstract>
- Burgents, J.E., Burnett, K.G. and Burnett, L.E. 2004. Disease resistance of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture* 231: 1-8. http://www.researchgate.net/publication/222535097_Disease_resistance_of_Pacific_white_shrimp_Litopenaeus_vannamei_following_the_dietary_administration_of_a_yeast_culture_food_supplement
- Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S. and Liao, I.C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 505-514. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464800902663>
- Comabella, Y., García-Galano, T., Carrillo, O. and Mauri, Y. 2004. Empleo de fracciones celulares de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo alimentario para *Artemia franciscana*. *Rev. Invest. Mar.* 25(1): 65-72. http://www.researchgate.net/publication/236260419_EMPLEO_DE_FRACCIONES_CELULARES_DE_LA_LEVADURA_Saccharomyces_cerevisiae_COMO_ADITIVO_ALIMENTARIO_PARA_Artemia_franciscana
- Dehasque, M., Van Assche, J. and Deberse, B. 1997. Evaluación de los efectos de la administración oral de inmunoestimulantes en las enfermedades de especies para acuicultura. Avances en Nutrición acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11 al 13 de noviembre de 1996, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/III/archivos/6.pdf (Consultado el 19 noviembre 2014).
- Doñate, C., Balasch, J.C., Callol, A., Bobe, J., Tort, L. and MacKenzie, S. 2010. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity. *Mar Biotechnol*: 12: 88-99. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10126-009-9203-4>
- Gelibolu, S., Tureli, C. and Sahan, A. 2009. Determination of haemocytes amount and haemocytes type in mature blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896) captured in akyatan lagoon (Karataş/Adanaturkey). *Journal of Fisheries Sciences* 3(3): 181-186. http://www.academia.edu/3078082/DETERMINATION_OF_HAEMOCYTES_AMOUNT_AND_HAEMOCYTES_TYPE_IN_MATURE_BLUE_CRAB_Callinectes_sapidus_Rathbun_1896_CAPTURED_IN
- Guerra, A. 1974. Biología reproductiva de *Macrobrachium gallus* Holthuis, 1952 (Decapoda, Palaemonidae). (Trabajo de Habilitación). Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Gullian, M. and Rodríguez, J. 2002. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. *El Mundo Acuicola* 8(1): 47-49. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8744/1/12.pdf>
- Hisano, H., Rocha, D., Barros, M. and Edivaldo, L. 2008. Influence of yeast and yeast derivatives on growth performance and survival of juvenile prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Ciência Animal Brasileira* 9(3): 657-662. http://www.researchgate.net/publication/43530606_INFLUENCIA_DE_YEAST_YEAST_DERIVATIVES_ON_GROWTH_PERFORMANCE_AND_SURVIVAL_OF_JUVENILE_PRAWN_Macrobrachium_amazonicum_INFLUENCIA_DA_LEVEDURA_E_DERIVADOS SOBRE O DESEMPENHO E SOBREVIVENCIA DE JUVENIS DO CAMARÃO Macrobrachium_amazonicum
- Jara, C.G. 1997. Antecedentes sobre el desarrollo de la carcinología en Chile. *Investigaciones Marinas Valparaíso*, 25: 245-254. <http://www.scielo.cl/pdf/imar/v25/art17.pdf>

- Johansson, M., Keyser, P., Sitrunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004484860000418X>
- Jussila, J. 1997. Physiology response of astacids and parastacid crayfishes (Crustacea; Decapoda) to conditional of intensive culture. Doctoral Dissertation. University of Kuopio. Western Australia.
- Kim, Y.J., Choi, W.C., Kim, H.R., Jung, S.R. and Oh, M.J. 1999. Changes in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bulletin European Association of Fish Pathol.* 19(5): 213-215. <http://eafp.squarespace.com/bulletin-archive/1999-volume-19/issue-5/>
- Lanz, H., Hernandez, S., Garrido-Guerrero, E., Tutsumi, V. and Aréchiga, H. 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology.* 17: 399-406. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0145305X9390031K>
- Lavens, P. and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper.* N° 361. 295 p. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/w3732e/w3732e00.pdf>
- Le Moullac, G., Phillip de Laborie, L., Saulnier, D., Goarant, C. and Dehasque, M. 2000. Principios y problemas envueltos en la evaluación de inmunoestimulantes en juveniles de camarón. pp 509-519. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998.* La Paz, B.C.S., México. http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/30moul.pdf
- Li, J., Li, D.F., Xing, J.J., Cheng, Z.B. and Lai, C.H. 2006. Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *American Society of Animal Science. All rights reserved. Journal of Animal Science.* 84: 2374-2381. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/84/9/0842374?highlight=&search-result=1>
- Luna-González, A., Moreno-Herrera, J.T., Campa-Córdova, A., González-Ocampo, H.A., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruiz, P., et al. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal Aquatic. Research.* 41(5): 898-907. <http://www.scielo.cl/pdf/lajar/v41n5/art10.pdf>
- Lv, S., Xu, J., Zhao, J., Yin, N., Lu, B., Li, S., et al. 2014. Classification and phagocytosis of circulating haemocytes in chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the effect of extrinsic stimulation on circulating haemocytes *in vivo*. *Fish & Shellfish Immunology* 39: 415-422. http://ac.els-cdn.com/S1050464814001934/1-s2.0-S1050464814001934-main.pdf?_tid=2bd2c75a-edde-11e4-973a-00000aab0f6b&acdnat=1430250100_a080119d0aca-9356da120697780e8da2
- Maldonado, M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. (Tesis de Magister). Instituto Nacional Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Martínez-Rodríguez, A.J., Polo, M.C. and Carrascosa, A.V. 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system ad in sparkling wines. *International Journal of Food Microbiology* 71: 45-51. http://www.researchgate.net/publication/11592701_Structural_and_ultrastructural_changes_in_yeast_cells_during_autolysis_in_a_model_wine_system_and_in_sparkling_wines
- Matozzo, V. and Marin, M.G. 2010. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 534-541. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464809003830>
- Méndez, M. 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Boletín Instituto del Mar Perú* 5: 1-170. <http://biblat.unam.mx/en/revista/boletin-instituto-del-mar-del-peru/articulo/claves-de-identificacion-y-distribucion-de-los-langostinos-y-camarones-crustacea-decapoda-del-mar-y-rios-de-la-costa-del-peru>
- Montesdeoca, M., Amano, Y., Echevarria, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., et al. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuicola* 8(1): 38-42. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8742/1/10.pdf>
- Parmar, P., Murthy, S., Tejpal, S., Naveen Kumar, B. 2012. Effect of brewer's yeast on immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its resistance to white muscle disease. *Aquacult. Int.* 20: 951-964. http://download-v2.springer.com/static/pdf/135/art%253A10.1007%252Fs10499-012-9520-x.pdf?token2=exp=1430253433~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F135%2Fart%25253A10.1007%25252Fs10499-012-9520-x.pdf*~hmac=60e69bc4223c737c9877cc431cf6dc4b6a4d395cf334916b9c86ed4a92504374

- Perdomo, M.C., Vargas, R.S. and Campos, J. 2004. Valor nutritivo de la levadura de cervecera (*Saccharomyces cerevisiae*) y de sus derivados, extracto y pared celular, en la alimentación aviar. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 12 (5): 89-95. <http://www.bioline.org.br/request?la04011>
- Prasad, L., Nayak, B.B., Srivastava, P.P., Reddy, A.K., Kohli, M.P.S. 2013. Use of brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoter in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) post larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 447-452. http://www.trifas.org/pdf/issue_13_03/0307.pdf
- Reyes, W. and Lujan, H. 2003. Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio. CIVA 2003. *Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003*. Disponible en http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/publicacionez/civa_2003_estadios_muda.pdf (Consultado el 19 de noviembre 2014).
- Reyes, W.E. 2012. Crecimiento y supervivencia de adultos de camarón de río *Cryphiops caementarius* criados en sistema de recipientes individuales con recirculación de agua. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, E., Sotomayor, M.A. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. p.: 67-72. En: Cruz-Suárez, L.E. Ricque-Merie, D. Tapia-Salazar, M. Olivera-Novoa & R. Civero-Cervecedo (Eds.) *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre 2000. Mérida, Yucatán. México. http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/
- Sajeevan, T.P., Philip, R. and Bright, I.S. 2009. Dose/frequency: A critical factor in the administration of glucan as immunostimulants to Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 287: 248-252. <http://dyuthi.cusat.ac.in/xmlui/bitstream/handle/purl/4029/Dosefrequency%20A%20critical%20factor%20in%20the%20administration%20of%20glucan%20as%20immunostimulant%20to%20Indian%20white%20shrimp%20Fenneropenaeus%20indicus.pdf?sequence=1>
- Sarlin, P.J. and Philip, R. 2011. Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study. *Aquaculture* 321(3-4): 173-178. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611006879>
- Tangüler, H. and Erten, H. 2009. The effect of different temperatures on autolysis of baker's yeast for the production of yeast extract. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 33: 149-154. <http://mistug.tubitak.gov.tr/bdyim/abs.php?dergi=tar&rak=0803-17>
- Van de Braak, K. 2002. Haemcytic defense in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (Tesis Ph.D). Wageningen Institute of Animal Science's, The Netherlands.
- Yao, C.L., Wang, Z.Y. and Xiang, J.H. 2006. Crustacean haemocytes and their function in immune responses. *Zoological Research* 27(5): 549-557. <http://www.bioline.org.br/abstract?id=zr06078>
- Zacarias, S. and Yépez, V. 2008. Monitoreo poblacional del camarón de río. Estimación de abundancia de adultos en ríos de la costa centro sur. Informe anual 2007. IMARPE. En: http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_26_informe_2007_camaron_de_rio_web.pdf, última consulta: 19 de noviembre de 2014.
- Zlatkovic, D., Jakovljevic, D., Zekovic, D. and Vrvic, M.M. 2003. A glucan from active dry baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A chemical and enzymatic investigation of the structure. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 68(11): 805-809. <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2003/0352-51390311805Z.pdf>

Cite this paper/Como citar este artículo: Cornejo Sagástegui, J., Pérez Pérez, L., Reyes Avalos, W. (2015). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the diet of male shrimp *Cryphiops caementarius* (Crustacea, Palaemonidae) on total and differential hemocytes count. *Revista Bio Ciencias* 3(3): 173-186. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/154>

