

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**EFFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE
Spatoglossum sp (PHAEOPHYCEAE, DICTYOTALES) EN LA
PROLIFERACIÓN DE HEMOCITOS Y SU RESISTENCIA A
Aeromonas sp EN MACHOS ADULTOS DE *Cryphiops caementarius*
“CAMARÓN DE RÍO”, EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. ANA MELY POCCORI ESPINOZA

Bach. MIRIAN VIVIANA SÁNCHEZ VALENCIA

ASESOR:

Dr. CARLOS AZAÑERO DÍAZ

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**EFFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE
Spatoglossum sp (PHAEOPHYCEAE, DICTYOTALES) EN LA
PROLIFERACIÓN DE HEMOCITOS Y SU RESISTENCIA A
Aeromonas sp EN MACHOS ADULTOS DE *Cryphiops caementarius*
“CAMARÓN DE RÍO”, EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. ANA MELY POCCORI ESPINOZA

Bach. MIRIAN VIVIANA SÁNCHEZ VALENCIA

Revisado y Aprobado por el Asesor

Dr. CARLOS AZAÑERO DÍAZ

ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



**EFFECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO METANÓLICO DE
Spatoglossum sp (PHAEOPHYCEAE, DICTYOTALES) EN LA
PROLIFERACIÓN DE HEMOCITOS Y SU RESISTENCIA A
Aeromonas sp EN MACHOS ADULTOS DE *Cryphiops caementarius*
“CAMARÓN DE RÍO”, EN LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO ACUICULTOR

AUTORES:

Bach. ANA MELY POCCORI ESPINOZA

Bach. MIRIAN VIVIANA SÁNCHEZ VALENCIA

**APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SEÑORES MIEMBROS**

.....
Dr. GUILLERMO SALDAÑA ROJAS
PRESIDENTE

.....
Dr CARLOS AZAÑERO DÍAZ
INTEGRANTE

.....
Dr WALTER REYES AVALOS
INTEGRANTE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. Material de estudio.....	9
2.1.1. Población.....	9
2.1.2. Muestra.....	9
2.1.3. Unidad de análisis.....	9
2.2. Transporte de <i>C. caementarius</i>	9
2.3. Aclimatación.....	9
2.4. Selección y siembra.....	9
2.5. Acondicionamiento de sistema de crianza.....	10
2.6. Diseño experimental.....	10
2.7. Elaboración de extracto metanólico de <i>Spatoglossum</i> sp (EMS).....	11
2.7.1. Recolección, identificación y procesamiento de las macroalgas.....	11
2.7.2. Preparación del extracto metanólico.....	12
2.8. Elaboración del alimento balanceado.....	13
2.9. Determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos durante la alimentación	14
2.9.1. Extracción de hemolinfa.....	15
2.9.2. Procedimiento para la determinación del Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos.....	15
2.10. Dosis de infección.....	15
2.11. Activación de las <i>Aeromonas</i> sp e infección de los camarones.....	16
2.11.1. Activación de <i>Aeromonas</i> sp	16

2.11.2. Preparación del inóculo.....	16
2.11.3. Infección con <i>Aeromonas</i> sp	16
2.12. Evaluación de la resistencia a <i>Aeromonas</i> sp	17
2.12.1. Supervivencia.....	17
2.12.2. Número de bacterias.....	17
2.12.3. Determinación del Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos.....	17
2.12.4. Determinación de la actividad fenoloxidasa.....	18
2.13. Calidad física y química del agua de crianza	18
2.14. Limpieza y recambio de agua.....	18
2.15. Análisis estadístico de los datos.....	19
III. RESULTADOS.....	20
3.1. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos.....	20
3.2. Evaluación a la resistencia a <i>Aeromonas</i> sp	24
3.2.1. Supervivencia.....	24
3.2.2. Número de bacterias.....	24
3.2.3. Determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos después de la infección.....	26
3.2.4. Determinación de la actividad fenoloxidasa.....	29
3.3. Calidad física y química del agua de crianza.....	30
IV. DISCUSIÓN.....	31
V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII. ANEXOS	45

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre y hermanos (as), por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional. A mi padre, a pesar de su distancia física, siento que estás conmigo siempre y mis sobrinos(as).

ANA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional y con todo cariño dedico este trabajo: A mi padre que ha sabido guiarme con su apoyo incondicional y sus consejos durante toda mi vida, A mi madre por ser el pilar más importante y por demostrarme su cariño incondicional sin importar nuestras diferencias y opiniones. Y a Jhonny Delgado Lujan por apoyarme y estar a mi lado incondicionalmente.

VIVIANA

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A nuestro asesor, Dr. Carlos Azañero Díaz, Dr. Walter Reyes Avalos y Dr. Guillermo Saldaña Rojas por compartir su enorme experiencia con sus comentarios y consejos hacia el trabajo.

A nuestros profesores de la carrera profesional por su aporte a nuestra formación, por consejos, enseñanzas, apoyo incondicional y por su amistad.

A Oscar Chauca Quintana y Maribel Astete Reyna por su asistencia técnica, sugerencias y apoyo en la ejecución de esta investigación.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de esta investigación.

Los autores

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental.....	11
Tabla 2. Insumos base utilizados en la dieta para camarón <i>C. caementarius</i> (Reyes, 2012).....	13
Tabla 3. Composición por Kg. del premix Complexvit utilizado en la dieta experimental para camarón <i>C. caementarius</i>	14
Tabla 4. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS.....	20
Tabla 5. Número de bacterias ($\times 10^3$ UFC) en hemolinfa de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12, 24, 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp.	24
Tabla 6. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp.	26
Tabla 7. Actividad fenoloxidasa (Dopacromo/50 μ l de hemolinfa) en la hemolinfa de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12, 24, 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Flujoograma de la recolección, identificación y procesamiento de <i>Spatoglossum</i> sp.....	12
Fig. 2. Número total de hemocitos (NTH) x 10 ⁵ cél. mL ⁻¹ de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo.....	21
Fig. 3. Número de hemocitos granulocitos x 10 ⁵ cél. mL ⁻¹ de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo	22
Fig. 4. Número de hemocitos semigranulocitos x 10 ⁵ cél. mL ⁻¹ de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo	23
Fig. 5. Número de hemocitos hialinocitos x10 ⁵ cél. mL ⁻¹ de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo	23
Fig. 6. Número de bacterias (x10 ³ UFC) en la hemolinfa de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp, a las 12; 24; 48 y 72 h.....	25
Fig. 7. Número total de hemocitos (NTH) x 10 ⁵ cél. mL ⁻¹ de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp.....	27
Fig. 8. Número diferencial de hemocitos (NDH) de machos adultos de <i>C. caementarius</i> alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con <i>Aeromonas</i> sp. A: Granulocitos; B: Semigranulocitos; C: Hialinocitos.....	28

Fig. 9. Determinación de la actividad fenoloxidasa (PO) (Dopacromo/50µl de hemolinfa) en la hemolinfa de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.....30

RESUMEN

El objetivo, fue evaluar efecto de una dieta suplementada con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp (EMS) que ocasione mayor proliferación de hemocitos y su resistencia a *Aeromonas* sp en machos adultos de *C. caementarius* camarón de río. Se emplearon 48 camarones obtenidos del Rio Pativilca, en estado de muda C y D₁, con un peso $5,29 \pm 0,93$ g y longitud promedio $5,59 \pm 0,42$ cm, los cuales se distribuirán en sistema de crianza individual. Se aplicó el diseño de estímulo creciente con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, con 6 repeticiones. Las muestras de hemolinfa fueron tomadas del sinus pericárdico. Se determinó a los 0, 15 y 30 días de alimentación el NTH y NDH; luego fueron inoculados 0,050 ml de la suspensión de células viables de 5×10^7 cél. mL⁻¹ de *Aeromonas* sp, determinándose a las 12; 24; 48 y 72 h la supervivencia, número de bacterias, NTH, NDH, y actividad fenoloxidasa (PO). En los camarones machos adultos alimentados con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS la proliferación del NTH ($107,79 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación a las demás concentraciones. En *C. caementarius* alimentados durante 30 días con la concentración de $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS se observó mayor resistencia, en relación al número de bacterias, incremento de NTH, supervivencia y la actividad PO.

Palabras Clave: *Spatoglossum*, macroalga, extracto, hemocitos, resistencia, camarón.

ABSTRACT

The aim was to evaluate the effect of a diet supplemented with different concentrations of methanol extract from seaweed *Spatoglossum* sp (EMS) that causes increased proliferation of hemocytes and resistance to *Aeromonas* sp adult male *C. caementarius* river shrimp. 48 shrimp obtained from the Rio Pativilca were used in molting C and D1', weighing 5.29 ± 0.93 g average 5.59 ± 0.42 cm length, which will be distributed system of individual upbringing. Increased stimulation design with three experimental treatments and a control treatment, with 6 repetitions was applied. Hemolymph samples were taken from the pericardial sinus. It was determined at 0, 15 and 30 days of feeding the NTH and NDH; were inoculated then 0.050 ml of the viable cell suspension of 5×10^7 cel. mL *Aeromonas* sp, determined at 12; 24; 48 and 72 h survival, number of bacteria, NTH, NDH, and phenoloxidase activity (PO). In adult males shrimp fed 1.5 g kg^{-1} proliferation EMS NTH (107.79×10^5 cél. mL⁻¹) was significantly higher ($p < 0.05$) compared to the other concentrations. *C. caementarius* fed for 30 days with a concentration of 1.5 g kg^{-1} of EMS increased resistance was observed, compared to the number of bacteria increase NTH, PO activity and survival.

Key Words: *Spatoglossum*, seaweed, abstract, hemocytes, endurance, shrimp.

I. INTRODUCCIÓN

Cryphiops caementarius (Molina, 1782) o camarón de río es un crustáceo endémico vertiente occidental, habita los cuerpos de agua loticos costeros del Perú al sur del río chancay – Lambayeque y litoral del norte de Chileno (32° 55') (Bahamonde & Vila, 1971, Meruane *et al.*, 2006), Estos presentan un marcado dimorfismo sexual; los machos son más grandes que las hembras y presentan la quela del segundo par de periópodos izquierdo de mayor tamaño que la derecha, alcanzando una longitud mayor que el cefalotórax y abdomen (Modesto, 1997).

El camarón de río alcanza un valor comercial muy interesante en el mercado (Zacarías & Yépez, 2007). Sin embargo los estudios están enfocados mayormente a la producción de semilla, crecimiento y desarrollo (Meruane *et al.*, 2006), por lo que hace falta estudios enfocados a la prevención y control de enfermedades, teniendo en cuenta el aumento del consumo y cultivo de estos organismos (Meruane *et al.*, 2006; Zacarías & Yépez, 2007).

El sistema inmune de los invertebrados se diferencia del sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides, su circulación es abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre de los vertebrados, a su vez presentan células de defensa llamados hemocitos (Muñoz *et al.*, 2000). Los hemocitos son análogos a los glóbulos blancos en vertebrados, ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa, baña los tejidos denominándose hemocele a los sitios donde ella circula. La hemolinfa presenta un color azul verdoso a causa de la hemocianina (Rendón *et al.*, 2003).

El mecanismo innato de defensa de los artrópodos está basado en la inmunidad humoral y celular (Muñoz *et al.*, 2000); éstos juegan un papel importante en la detección y eliminación de microorganismos y parásitos dañinos (Rendón *et al.*, 2003). La inmunidad celular consiste en la activación de una gran cantidad de hemocitos, por medio de moléculas capaces de reconocer estructuras en las paredes celulares de los organismos invasores como proteínas de fijación y reconocimiento de β -1,3-glucanos, lipopolisacáridos y peptidoglicanos (Vargas & Yepiz, 2000; Lin *et al.*, 2006). Después de detectar los organismos invasores, los hemocitos son activados y consecuentemente

una serie de mecanismos entran en acción para controlar o eliminar al agente extraño y destruirlo (Lin *et al.*, 2006). Además de participar en la regulación de diferentes funciones fisiológicas incluyendo endurecimiento del exoesqueleto, cicatrización de daños en la cutícula, coagulación, metabolismo de carbohidratos, transporte y almacenamiento de proteínas y aminoácidos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico (Rendón *et al.*, 2003) y son obtenidas a partir de varias fuentes naturales y también por síntesis química con base en la estructura molecular de los propios productos naturales. Entre estos compuestos, se encuentran muchos derivados de microorganismos o de algas, destacándose los componentes de la pared celular de diferentes bacterias y hongos (Rondon, 2004). Durante los últimos años, el uso de inmunoestimulante ha ganado mayor interés contra el uso de antibióticos y vacunas en la lucha contra las enfermedades infecciosas de peces y camarones para cultivo (Dehaske *et al.*, 1998).

Vázquez *et al.* (1998) señalan que los niveles de respuesta inmune varían entre las diferentes especies de crustáceos, por lo cual se considera que ciertos factores tanto ambientales, como fisiológicos contribuyen de manera importante en la inmunidad de estas especies. Estos factores son: condiciones de estrés (Jussila *et al.*, 2001), aclimatación (Lignot *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2002), condiciones ambientales y sustancias tóxicas o contaminantes (Celso, 2000), así también estadios de desarrollo y cercanía a la etapa de ecdisis (Vázquez *et al.*, 1998). La estimulación del sistema inmune permite al camarón mejorar su respuesta frente a patógenos ya sean virales o bacterianos (Vargas & Yepiz, 2000; Cedeño & Rodríguez, 2006). Además, Montesdeoca *et al.* (2002), señalan que el sistema inmune del camarón es muy manejable y responde favorablemente a la inmunoestimulación.

La respuesta a los inmunoestimulantes pueden variar significativamente, dependiendo de su estructura química o del número de receptores presentes en las membranas celulares del camarón (Bowie & O'Neill, 2000). Los peptidoglucanos, lipopolisacáridos, lipopéptidos y polisacáridos sulfatados son los principales principios activos capaces de generar una inmunoestimulación (Aguirre *et al.*, 2009). Las macroalgas son fuentes de compuestos bioactivos, ya que son capaces de producir una

gran variedad de metabolitos secundarios se caracteriza por una amplia espectro de actividades biológicas (Gupta & Abu-Ghannam, 2011).

Los polisacáridos sulfatados de algas marinas presentan actividades antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, reducción de lípidos en la sangre, antioxidantes, anticoagulante, antitrombótica e inmunoestimulante (Bo *et al.*, 2008). Las Phaeophyta, macroalgas pardas, tales como *Eisenia arbórea*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria brasiliensis* producen polisacáridos sulfatados compuestos por fucosa grupos sulfato y cantidades menores de otros azúcares como xilosa, galactosa y ácidos urónicos (Muñoz, 2006). Uno de los polisacáridos sulfatados es el Fucooidanos, polisacáridos ricos en L-fucosa que pueden contener pequeñas cantidades de otros azúcares como galactosa, xilosa, manosa y ácidos urónicos. Los fucooidanos sólo se encuentran en las macroalgas pardas (Bo *et al.*, 2008). El Fucooidan forma las paredes de algas pardas, interviene en la capacidad de retención de agua en el alga, teniendo implicaciones en la cantidad de minerales retenidos por esta, y se utiliza como inmunoestimulantes para *Penaeus vannamei* (Scholz *et al.*, 1999). El extracto de macroalgas pardas como *Sargassum polycystum*, *S. glaucescens*, *Vermelha botryocladia*, *Spatoglossum schroedem*, *Macrocystis pyrifera* es ampliamente estudiado, presentando resultados prometedores en sobrevivencia y actividad inmunoestimulante, ya sean obtenidos con solvente etanólico o metanólico (Takahashi *et al.*, 1998; Chotigeat *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2007; Manilal *et al.*, 2009; Walger *et al.*, 2009; Ferdinand *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010; Ghaednia *et al.*, 2011).

La inclusión de *Cladosiphon okamuranus* en alimentos para camarón *Penaeus japonicus*, demuestra la eficacia de la administración oral por su contenido de fucooidan utilizado para el control del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), obteniendo sobrevivencia del 79 % con 60 mg kg⁻¹ camarones de peso corporal d⁻¹, previniendo de esta forma la infección y posterior desarrollo de la enfermedad (Takahashi *et al.*, 1998).

En *Litopenaeus vannamei* alimentados con harina de *Macrocystis pyrifera* aumenta al doble el consumo y el crecimiento, además la harina de *M. pyrifera* muestra un contenido de fucooidan entre 5,2 y 5,4 %, una actividad vibriostática a niveles de inclusión de 0,1% y una capacidad aglutinante sobre los pellets que disminuyó la

lixiviación de oxitetraciclina en el agua. (Rivera *et al.*, 2002). En *P. monodon*, Chotigeat *et al.* (2004), determinan que al emplear el fucoidan crudo extraído de *Sargassum polycystum* mezclado con la dieta de los camarones (5-8 y 12-15 g) alimentados antes y después de la infección de WSSV, la supervivencia fue del 46 % y 93 %, respectivamente. Mientras que Ferdinand *et al.*, (2010), observan que el fucoidan de *U. pinnatifida* a una dosis de 500 mg kg⁻¹ en la dieta proporciona un aumento en la supervivencia, en el crecimiento, mayor proliferación de hemocitos, así también como un aumento en la actividad fenoloxidasa y la actividad antibacteriana en *Marsupenaeus japonicus*.

Además de la actividad inmunoestimulante, los extractos de algas poseen actividades antibiótica, obteniéndose mayor halo de inhibición en *Caulerpa sp*, *Caulerpa mexicana*, *Acanthopora sp*, *Gracilaria sp* y *Ulva sp* (Ríos *et al.*, 2009). De igual manera se registra actividad en el alga *Petalonia fascia* (Scytosiphonales); y en las Chlorophyta, en la especie *Bryopsis plumosa* (Briopsidales) (Magallanes, 2003). También, Manilal *et al.*, (2009), encontraron que los polisacáridos extraídos de *Orientalis Acrosiphonia*, incluidos en la dieta a una concentración de 4 g kg⁻¹, obtuvieron una supervivencia 88 % y un aumento en el número total de hemocitos 6,87 x10³ cél. mL⁻¹ en *Penaeus monodon*.

Las enfermedades en los cultivos son el principal factor que limita actualmente la producción de camarón en el mundo, sobre todo las infecciones donde las bacterias son uno de los principales agentes causales de mortalidades, tanto el cultivo larvarios como en los de engorda (Sinderman & Lightner, 1988). Las principales bacterias encontradas en camarones son del tipo halofílico, de las cuales muchas habitan en los sedimentos y en su tracto digestivo, además la mayoría de estas bacterias, forman parte de la flora normal de los camarones (Vanderzant *et al.*, 1971). Estas bacterias, bajo algunas condiciones especiales de cultivo se constituyen en agentes patógenos capaces de generar grandes mortalidades de los organismos (Johnson, 1995).

Dentro de la población bacteriana que componen los ecosistemas acuícolas, la familia Vibrionaceae representa el grupo más importante por su patogenicidad y abundancia (Gómez *et al.*, 2000), esta ocupa la posición fundamental entre las enfermedades bacterianas de los camarones (Sinderman & Lightner, 1988).

El género de las *Aeromonas* pertenece dentro de la familia Vibrionaceae y comparte algunas propiedades con otros géneros de esta familia. Estas *Aeromonas* son (Janda, 1991). *Aeromonas hydrophila* es un miembro importante de la familia Vibrionaceae que causan enfermedades como la condición de enfermedad del caparazón, la Enteritis hemocítica, la Septicemia y las infecciones de heridas menores (Sinderman & Lightner, 1998). Informes de ocurrencia de *Aeromonas* sp se han encontrado en *P. japonicus*, *P. indicus* y *Stylirostris* (Yasuda & Kiyao, 1980; Lewis *et al.*, 1982).

Vibrio y *Aeromonas* son bacterias quitinoclasticas, que provocan la enfermedad de erosión bacteriana del caparazón (EBC) presentándose en etapas juveniles y adultos de todas las especies de camarones Peneidos (Ponce *et al.*, 2005), se manifiesta en forma de manchas cafés o negras en áreas que han sido erosionadas por acción de las cuales se producen por la acumulación de la melanina que es el producto final de respuesta inflamatoria en crustáceos. Fonseca (2010), refiere característica más notable del EBC consiste en la aparición de manchas de color carmelita de diferentes tonalidades en la superficie del cuerpo del camarón. Esta enfermedad es uno de los problemas más comunes y aparece con mayor intensidad en los sistemas con altas densidades de siembra (Ponce *et al.*, 2005). Usualmente la infección es autolimitante y es un problema serio sólo para los camarones fuertemente infectados o poblaciones muy estresadas (Meruane *et al.*, 2006).

Así mismo la Enteritis hemocítica (EH) aparece en cultivos intensivos, la cual aparentemente es un síndrome generalizado. Las lesiones por EH son siempre sépticas y las infecciones bacterianas secundarias son una parte importante de la patogénesis de la enfermedad. La reducción de la habilidad de absorción en el intestino y del hepatopáncreas, da como resultado un pobre crecimiento, letargia y poca resistencia al estrés (Johnson, 1995).

Otra enfermedad, es el camarón manchado o “brown spot disease”, es un síndrome, en el cual se incluyen aquellos problemas relacionados con infecciones en la cutícula, apéndices o branquias. Se presentan lesiones localizadas en tonos de café a negro, en las cuales la cutícula se encuentra erosionada. Es una enfermedad autolimitante y cuando el camarón muda es generalmente eliminada. Esta infección, además de estar asociada a

Vibrio sp, también involucra a otras bacterias oportunistas como *Aeromonas* sp, y *Flavobacterium* sp, representa una amenaza para las poblaciones de camarones cuando éstas se encuentran bajo severo estrés. Si no es controlada, esta enfermedad se vuelve más grave dando lugar al desarrollo de “astillas negras”, que a su vez puede llegar a convertirse en una “vibriosis sistémica” (Gómez *et al.*, 2000). *Aeromonas* sp se aislaron a partir de una serie de condiciones en *P. indicus*. Ellos también se han asociado con crustáceos marinos (Baticadas *et al.*, 1986). *Aeromonas* sp tiene una posición dominante en los tanques de crianza de los camarones (Huang & Chiu, 1994) y con frecuencia aislados de *P. monodon* y *P. indicus* (Chang *et al.*, 1996).

La actividad acuícola camaronera está limitada en diferentes partes del mundo por enfermedades infecciosas provocadas entre otros, por bacterias, virus, parásitos y por el uso regular de antibióticos que han dirigido progresivamente a las poblaciones de cultivo a una situación crítica de resistencia, siendo las enfermedades infecciosas la principal amenaza para su desarrollo, haciéndose necesario la instalación de programas de manejo sanitario cada vez más importante, involucrando estrategias para prevenir las pérdidas por agentes infecciosos tales como: las practicas básicas de buen manejo, quimioterapia, vacunación, probióticos e inmunoestimulantes, todas las formas de actuar contra los invasores patógenos (Gómez *et al.*, 2000).

En el desarrollo de la acuicultura, es común el uso de antibióticos tradicionales en la prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas que se presenta en el desarrollo del cultivo, a través del tiempo se ha podido comprobar que el uso de estos ya no son efectivos por cuanto las bacterias han desarrollado mecanismo de autodefensa y han generado residuos químicos que deterioran la calidad y seguridad de los cultivos, teniendo implicancia para la salud humana, animal y el medio ambiente; por lo que su uso fue severamente restringido, lo que ha generado la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para el control de patógenos (Gopa *et al.*, 2005). La necesidad de utilizar métodos alternativos para la regulación de bacterias patógenas en los tanques de cultivo ha llevado a los investigadores a utilizar tratamientos con probióticos e inmunoestimulantes (Scholz *et al.*, 1999).

El potencial que muestran los inmunoestimulantes es grande como: ausencia de toxicidad o residuos, no generan resistencia, facilidad de dosificación y por no ocasionar

un impacto negativo, ni en el animal cultivado, ni en el entorno o el consumidor. Por otro lado, la utilización de estas sustancias puede ayudar a reducir las oportunidades de ataques de patógenos, en los casos previsibles de estrés como manipulaciones, cosechas parciales, transferencias; Así como, en variaciones ambientales por recambios de aguas u otros (Celso, 2000). El estudio del sistema inmune en crustáceos es una herramienta muy útil para el diseño de estrategias que permitan determinar y mejorar la respuesta del sistema de defensa del hospedero hacia los patógenos potenciales.

Con relación a los camarones, muchas sustancias descritas como inmunoestimulantes han sido utilizadas con el propósito de aumentar la resistencia natural, en vista de la imposibilidad de vacunar estos animales, a fin de ser utilizadas en la prevención de enfermedades bacterianas sino también para prevenir el uso de antibióticos (Vanderzant *et al.*, 1971; Scholz *et al.*, 1999; Gopa *et al.*, 2005), sin embargo, no se ha realizado trabajos en la estimulación para la proliferación de hemocitos en *C. caementarius* utilizando extracto metanólico de la macroalga *Spatoglossum* sp.

La investigación de especies de macroalgas que presentan actividad inmunoestimulante, es importante ya que en el país pocos son los investigadores dedicados al estudio farmacológico de algas y por ende la información es muy pobre acerca de estas propiedades. El Perú es uno de los países con gran diversidad de especies algales, siendo un país potencial en la explotación macroalgal, con utilidad en la industria de alimentos, en la cosmetología y perfumería, en la medicina y en la farmacología, sintetizando sustancias inmunoestimulantes como alternativa para la prevención de las enfermedades.

Visto los antecedentes del presente estudio se planteó el siguiente problema de investigación: ¿Qué efecto tiene una dieta suplementada con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp en la proliferación de hemocitos y su resistencia a *Aeromonas* sp en machos adultos de camarón de río *C. caementarius* “camarón de río”, en condiciones de laboratorio? Y como hipótesis de trabajo se tuvo que “Si, en condiciones de laboratorio, evaluamos una dieta suplementada con 1,0; 1,5 y 2,0 g Kg⁻¹ de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp, se obtendrá una mayor proliferación de hemocitos y mayor resistencia contra *Aeromonas* sp. a 1,5 g Kg⁻¹ de

extracto metanólico de *Spatoglossum* sp en machos adultos de camarón de río *Cryphiops caementarius*".

OBEJTIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar el efecto de una dieta suplementada con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp en la proliferación de hemocitos y su resistencia a *Aeromonas* sp en machos adultos de camarón de río *Cryphiops caementarius*, en laboratorio

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp que ocasione mayor proliferación en el número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos durante la alimentación.
- Determinar la concentración de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp que ocasione mayor resistencia a *Aeromonas* sp en adultos de camarón de río *Cryphiops caementarius*, en laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material de estudio

2.1.1. Población

Los camarones machos adultos de la especie *C. caementarius* fueron capturados del río Pativilca (distrito de Pativilca, provincia de Barranca, departamento de Lima, Perú).

2.1.2. Muestra

la muestra seleccionada consistió de 48 camarones de $5,59 \pm 0,42$ cm de longitud total (escotadura post orbital hasta el extremo posterior del telson), $5,29 \pm 0,93$ g de peso, seleccionados al azar de un lote de 100 adultos transportados individualmente en depósitos plásticos agujereados los que fueron acondicionados dentro de cajas de plástico con agua del mismo río.

2.1.2. Unidad de análisis

Todos los camarones sembrados fueron muestreados

2.2. Transporte de *C. caementarius*

Para el transporte de cada camarón fueron colocados en depósitos plásticos agujereados dentro de cajas de plástico con agua del mismo río. El transporte tuvo una duración de 5 h aproximadamente hasta el Laboratorio de Acuarística de la Universidad Nacional del Santa (UNS) (Anexo 1), no hubo mortalidad durante el transporte.

2.3. Aclimatación

La aclimatación de los organismos fue realizada en el laboratorio de Acuarística de la UNS, parte de los organismos transportados fueron transferidos a depósitos de plástico de 100 L de capacidad, para disminuir la densidad (Anexo 2). Se hizo el recambio del 50% del total del agua del río por agua dulce declorada y pre aireada. Los mismos que fueron aclimatados por 4 días, durante ese tiempo a los camarones no se alimentaron.

2.4. Selección y siembra

Después de la aclimatación los camarones fueron seleccionados de acuerdo al sexo (Guerra, 1974), talla, peso y estado de muda (Reyes & Luján, 2003) (Anexo 3).

Fueron seleccionados 48 camarones de $5,59 \pm 0,42$ cm de longitud total (escotadura post orbital hasta el extremo posterior del telson), $5,29 \pm 0,93$ g de peso y estado de muda C y D₁, los cuales fueron distribuidos al azar a los diferentes tratamientos, a una densidad de 6 camarones por tratamiento (Anexo 4).

2.5. Acondicionamiento de sistema de crianza

El sistema de crianza individual se utilizó según el diseño de Reyes, (2012), por ello se emplearon 8 acuarios de vidrio (0,60 m de largo x 0,31m de ancho x 0,30 m de alto), con un volumen efectivo de agua de $0,053 \text{ m}^3$ y se utilizaron 48 recipientes plásticos circulares de 16 cm de diámetro y 7,5 cm de profundidad, con un área de 284 cm^2 , las paredes de los recipientes estuvieron agujereadas (3 cm de largo x 0,5 cm de ancho) para permitir el flujo del agua. A cada recipiente se le adicionó un codo y un tubo de PVC de $\frac{1}{2}$ " de diámetro que sobresale 10 cm el nivel del agua, por donde se suministró el alimento balanceado en pellets. Además fueron construidos 8 filtros utilizando recipientes de plástico rectangulares de 3 l, conteniendo tres capas, la primera de espuma sintética para la retención de las partículas, la segunda capa estuvo compuesta por conchuelas partida (500 g) y la ultima capa con grava de 10 – 20 mm de diámetro (500 g) para permitir el crecimiento microbiano. Los filtros fueron activados antes de iniciar el proyecto, con la finalidad de madurar estos.

El sistema de recipientes individuales se instaló en cada unidad experimental el cual consistió de 6 recipientes, distribuidos en 2 grupos de 3 niveles cada uno y asentados en el fondo del acuario. Todos los acuarios tuvieron un sistema de recirculación tipo air-lift con un filtro biológico de goteo con flujo de agua de $1,5 \text{ l min}^{-1}$. Además se instalaron 2 piedras difusoras de aire por acuario por circulación y oxigenación del agua (Anexo 5)

2.6. Diseño experimental

Se empleó el diseño completamente al azar y para el diseño de contrastación de la hipótesis se empleó el diseño de estímulo creciente en tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, con seis repeticiones por tratamiento.

Tabla 1. Diseño experimental.

Tratamientos	Especificaciones
T _c	Dieta sin extracto
T ₁	Dieta con 1,0 g de extracto kg ⁻¹ de alimento
T ₂	Dieta con 1,5 g de extracto kg ⁻¹ de alimento
T ₃	Dieta con 2,0 g de extracto kg ⁻¹ de alimento

Se hizo un experimento previo para evaluar el efecto de inclusión del Extracto Metanólico de *Spatoglossum* sp (EMS) y determinar las concentraciones a utilizar en la alimentación de los camarones, las concentraciones utilizadas fueron (0,0; 0,5; 1,0 y 1,5 g kg⁻¹ de EMS).

2.7. Elaboración de extracto metanólico de *Spatoglossum* sp (EMS)

2.7.1. Recolección, identificación y procesamiento de las macroalgas

La macroalga *Spatoglossum* sp fue recolectada manualmente en la zona intermareal y submareal de la playa Tortugas (Anexo 6), en la bahía de Tortugas e identificada con la ayuda de guías taxonómicas (Setchell & Gardner, 1924; Taylor, 1960; Acleto, 1973).

Las macroalgas recolectadas, se limpiaron con agua de mar, del exceso de arena y se recolectaron en bolsas de plástico rotuladas con fecha y lugar. Fueron mantenidos en un cooler con hielo minutos después de la colecta para evitar su descomposición y pérdida de metabolitos manteniéndose en este estado hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de la Universidad Nacional del Santa.

En el laboratorio, las macroalgas fueron mantenidas a temperatura ambiente, se lavaron con agua corriente y agua destilada para eliminar impurezas. Las muestras se limpiaron con ayuda de un estereoscopio para eliminar las epifitas y otros organismos animales que pudieran alterar los resultados.

Las macroalgas se colocaron en una estufa a 40 °C por un periodo de 12 h. Luego con la ayuda de un molino de mano, se trituró y se tamizó para obtener una muestra homogénea de la harina algal (Fig 1).

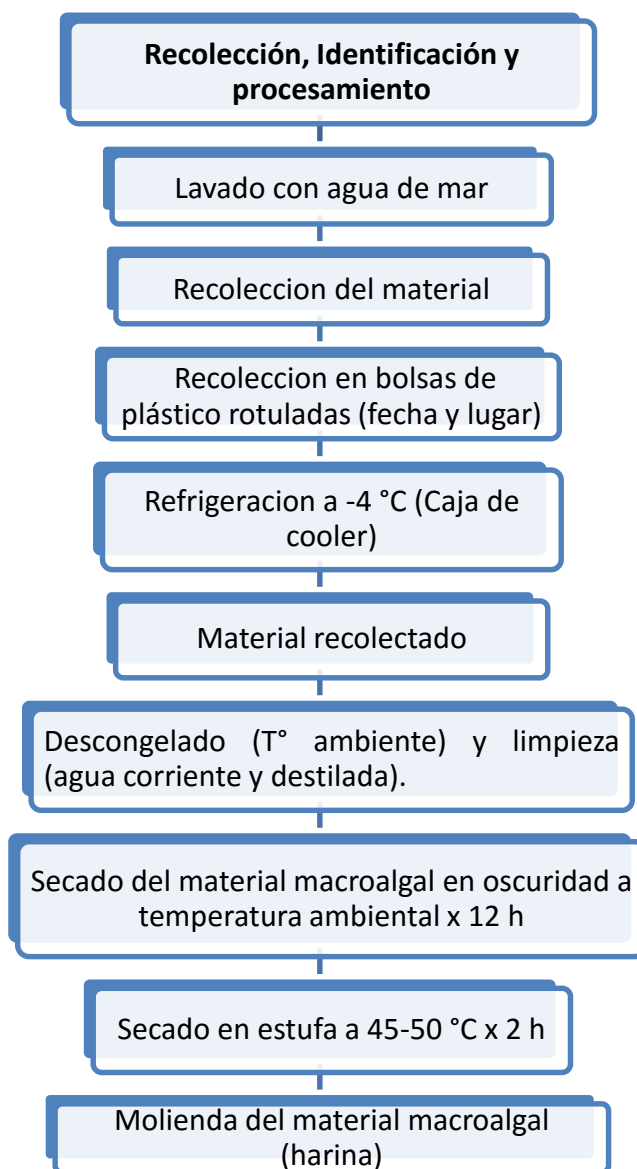


Fig. 1. Flujograma de la recolección, identificación y procesamiento de la macroalga *Spatoglossum* sp.

2.7.2. Preparación del extracto metanólico

Se mezcló 10 g de harina de macroalga con 50 mL de metanol 100 % (Hernández, 1993), posteriormente se hizo una destilación de reflujo durante 2 h, el mezclado se filtró con papel filtro y el sobrenadante se depositó en una placa petri

esterilizada donde se dejó evaporar en una estufa a 40 °C por un periodo de 12 h (Anexo 7). Los cristales fueron recolectados para ser utilizados en la elaboración de la dieta.

2.8. Elaboración del alimento balanceado

Todos los tratamientos y el control tuvieron la misma cantidad de cada uno de los insumos utilizados para la preparación de la dieta (Tabla 2), primero se mezclaron todas las harinas vegetales, luego se agregó la harina de pescado con un poco de agua tibia para ser mezclados, se procedió a agregar la lecitina de soya libres de sus capsulas al mismo tiempo los aceites, por ultimo fueron agregados la sal, premix (tabla 3), zeolita y la melaza, de acuerdo a Tabla 2 (Reyes, 2012), todos los insumos se mezclaron continuamente hasta que se obtuvo una masa muy uniforme, esta fue dividida en cuatro partes iguales (bolos de masa), a las cuales fueron agregados las respectivas concentraciones del EMS para ser mezclado uniformemente. Luego fue peletizado haciendo uso de un molino de carne manual (Anexo 8) y fueron secados a temperatura ambiente (Anexo 9).

Tabla 2. Insumos base utilizados en la dieta para camarón *C. caementarius* (Reyes, 2012).

Insumos	%
Harina de pescado	30,00
Harina de soya	21,00
Harina de maíz	16,70
Polvillo de arroz	22,00
Zeolita	2,00
Melaza	3,00
Aceite de pescado	2,00
Aceite de soya	0,50
Aceite de maíz	0,50
Lecitina de soya	1,00
Sal	1,00
Premix minerales y vitaminas	0,30

Tabla 3. Composición por Kg. del premix Complexvit utilizado en la dieta experimental para camarón *C. caementarius*.

Composición	Contenido(g)
Vitamina A	8
Vit. E	7
Vit. B1	8
Vit. B2	16
Vit. B6	11,6
Vit. B12	0,02
Vit. C	5
Vit. D3	5
Vit. K3	1
Nicotinamina	10
Niacina	6
Biotina	0,3
DL Metionina	20
Pantotenato de calcio	47
Cloruro de Sodio	2,7
Cloruro de Potasio	34
Sulfato de Magnesio	7
Maca	5
Excipientes	1.000

Se empleó el alimento elaborado según Tabla 2 con 30 % de proteínas con una ración diaria al 5 % del peso total y la frecuencia de alimentación fue dos veces al día (8:00 y 19:00 h), durante 30 días.

2.9. Determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos durante la alimentación

Durante la alimentación con la dieta suplementada con extracto metanólico de *Spatoglossum* sp antes de la infección con *Aeromonas* sp se determinaron el NTH y NDH hemocitos tres veces, al inicio (antes del estímulo), a los 15 y 30 días.

2.9.1. Extracción de hemolinfa

Doce horas antes de la toma de muestra de la hemolinfa se suspendió la alimentación y una vez transcurrido ese lapso se colocaron 3 camarones por 10 min en un recipiente de plástico de 8 L con agua dulce de clorada, pre aireada y a temperatura ambiente según Rosas *et al.* (2002).

Los camarones fueron suavemente extraídos del recipiente de aclimatación y colocados en una toalla secante con el fin de eliminar el agua en exceso (Rosas *et al.*, 2002). La hemolinfa fue extraída del seno ventral de los animales vivos (Anexo 10) usando una jeringa de 1 mL, según Jussila *et al.* (1997), En estado C y D₁'.

2.9.2. Procedimiento para la determinación del Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos

El reconocimiento de los tipos de hemocitos se hizo según Azañero *et al.* (2006). Para la determinación del NTH y NDH, se extrajo 20 µL de hemolinfa y se adicionó a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 80 µL de solución Alsever modificado a 4 °C, según Van de Braak. (2002a).

Se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2 de luz convencional de campo luminoso provisto de contraste de fases (Anexo 11).

El NTH y NDH fue expresado en 10^5 cél. mL⁻¹, teniendo en cuenta la formula según Jussila *et al.* (1997). Los resultados del NTH y NDH fueron sometidos a modelo descriptivo de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

2.10. Dosis de infección

Se realizó una previa evaluación utilizando dos concentraciones 10^7 y 10^8 UFC mL⁻¹ de *Aeromonas* sp (se determinó la concentración de UFC mL⁻¹ mediante turbidimetría) y una repetición, estas concentraciones fueron inoculadas en el seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal (Anexo 12). Luego se hizo las respectivas observaciones, obteniendo 20% y 100% de mortalidad, respectivamente.

2.11. Activación de las *Aeromonas* sp e infección de los camarones

Los camarones adultos de *C. caementarius* luego de haber sido alimentados durante 30 días con la dieta suplementada con EMS, fueron infectados con *Aeromonas* sp para determinar su resistencia, teniendo en cuenta los siguientes pasos:

2.11.1. Activación de *Aeromonas* sp

Fue empleada el cultivo de *Aeromonas* sp aislada de larvas enfermas de *C. caementarius* e identificada por sistema microbiológico automatizado VITEX 2 BIOERIEUX, el cual fue conservada en medio TSA a 4 °C en el laboratorio de Microbiología.

La activación de la bacteria *Aeromonas* sp se hizo mediante el sembrado en agar TSA en cuatro frascos de penicilina (Fig. 14), los cultivos fueron incubados por 24 h a 30°C, para ser utilizados a la brevedad posible.

2.11.2. Preparación del inóculo

A partir de los cultivos previamente activados se realizó una suspensión en solución salina fisiológica estéril y se determinó la concentración de UFC mL⁻¹ mediante turbidimetría, utilizando el tubo N° 3 del Nefelómetro de Mc Farland, (9x10⁸ bacterias mL⁻¹) (Anexo 14).

2.11.3. Infección con *Aeromonas* sp

Se utilizó en total 8 acuarios de 35 L y 48 camarones. Se colocaron 6 camarones por acuario, cada organismo dentro de un recipiente plástico pequeño (Anexo 15).

Los camarones fueron inoculados con 0,050 mL de la suspensión de células viables de 5x10⁷ bacterias mL⁻¹ de *Aeromonas* sp en el seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal (Anexo 16), luego fueron trasladados a los acuarios con agua declorada y aireada para la posterior evaluación de la resistencia.

Todos los materiales (frascos de penicilina, jeringas de 1 mL) utilizadas durante la experiencia fueron depositados en un vaso de precipitación que contenía alcohol yodado para desinfectar. Para el caso de los camarones infectados, estos fueron

sacrificados agregando hipoclorito de sodio a los acuarios, para luego enterrarlos y así evitar la contaminación.

2.12. Evaluación de la resistencia a *Aeromonas* sp

La evaluación de la resistencia se hizo teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

2.12.1. Supervivencia

La supervivencia se determinó al final del experiencia, se hicieron muestreos de todos las concentraciones (0,0; 1,0; 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS) y sus respectivas repeticiones a las 12, 24, 48 y 72 h después de la infección, se extrajo a los organismos muertos.

Fueron evaluadas algunos cambios, como coloración del cuerpo y comportamiento (nado) en los organismos infectados.

2.12.2. Número de bacterias

El Número de bacterias de la hemolinfa de los camarones se determinó tomando 0,1 mL de muestra de hemolinfa a partir del seno ventral a través de la base del primer pleópodo del segmento abdominal. Se analizó tres camarones por tratamiento con micropipetas, a las 12, 24, 48 y 72 h después de la inoculación.

La hemolinfa se trasladó de inmediato a placas de agar TSA con su respectiva repetición y las unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) fueron contadas después de 24 h de incubación a 28 °C (Anexo 17). Los resultados fueron analizados por agrupamiento de los datos de cada tratamiento

2.12.3. Determinación del Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos

Para la determinación del NTH y NDH se extrajo 50 µL de una dilución de 100 µL de hemolinfa y 900 µL de solución anticoagulante, luego se procedió como se menciona anteriormente en la determinación del NTH y NDH.

2.12.4. Determinación de la actividad fenoloxidasa

Para la determinación de la actividad fenoloxidasa, se inició con la preparación de la suspensión celular, se extrajo 100 μL de hemolinfa y se adicionó a un microtubo (Eppendorf) conteniendo 900 μL de solución anticoagulante, luego se centrifugó a 4 $^{\circ}\text{C}$ x 10 min (900 rpm), después se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de Buffer Cacolidato – Citrato, volviendo a centrifugar y eliminar el sobrenadante, luego se volvió a resuspender en 200 μL de Buffer Cacolidato. Una vez obtenida la suspensión celular, se adicionó 100 μL a un microtubo por duplicado (para la muestra y el control), luego se procedió a agregar 50 μL de Trypsina para la muestra y para el control se agregó Buffer Cacolidato en la misma cantidad, se dejó reposar a 25 – 26 $^{\circ}\text{C}$ x 10', luego se agregó 50 μL de L-Dopa, se dejó reposar durante 5 min, por último se agregó 800 μL de Buffer Cacolidato, y se realizaron las lecturas a 490 nm (Hernandez- Lopez *et al.*, 1996).

Los resultados de la actividad fenoloxidasa fueron sometidos a modelo descriptivo de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar).

2.13. Calidad física y química del agua de crianza

Fueron realizados controles semanales de temperatura (termómetro de mercurio de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de sensibilidad) y el oxígeno (oxímetro marca Hanna $\pm 0,1$). La dureza total, alcalinidad total y CO_2 fueron analizados semanalmente según Fukushima *et al.* (1982) (Anexo 19); el amonio y nitrato fue determinado con un kit (kit Nutrafin).

2.14. Limpieza y recambio de agua

La limpieza de los acuarios fue realizada una vez por semana, mediante sifoneo, retirando los desechos sólidos del fondo, utilizando una manguera de plástico de 3 mm de diámetro, reponiendo el agua que se extrae y los recambios de agua fueron al 50 %.

El alimento no consumido y los productos sólidos de excreción fueron extraídos con sifón a la primera hora de la mañana.

2.15. Análisis estadístico de los datos

Para el diseño estadístico se empleó el diseño completamente al azar. Fue aplicada el análisis de varianza (ANOVA) para establecer diferencias entre promedios. Para comparar si existían o no diferencias significativas entre tratamientos y el control, se aplicó la prueba Tukey, en ambos casos se empleó el nivel de significancia de 0,05 utilizando el programa SPSS versión 19.0. Se construyó figuras para la composición hemocitaria para comparar cada uno de los tratamientos. Todos los datos fueron expresados en medias con su respectiva desviación estándar.

III. RESULTADOS

Todos los muestreos fueron realizados en condiciones similares, cada camarón fue muestreado sólo una vez durante el experimento.

3.1. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos

NTH y NDH fueron determinados durante 30 días de alimentación, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS.

DÍAS	TIPO DE HEMOCITO	EMS (g kg ⁻¹)			
		0	1,0	1,5	2,0
0	G	6,979 ±0,320 ^a	6,979 ±0,320 ^a	6,979 ±0,320 ^a	6,979 ±0,320 ^a
	SG	19,125 ±0,536 ^a	19,125 ±0,536 ^a	19,125 ±0,536 ^a	19,125 ±0,536 ^a
	H	1,688 ±0,282 ^a	1,688 ±0,282 ^a	1,688 ±0,282 ^a	1,688 ±0,282 ^a
	NTH	27,792 ±0,631 ^a	27,792 ±0,631 ^a	27,792 ±0,631 ^a	27,792 ±0,631 ^a
15	G	5,000 ±0,657 ^c	5,146 ±0,644 ^c	10,708 ±1,036 ^a	9,000 ±0,932 ^b
	SG	21,875 ±0,908 ^d	30,688 ±1,224 ^c	68,563 ±1,030 ^a	49,583 ±2,238 ^b
	H	1,313 ±0,190 ^b	1,458 ±0,323 ^b	2,708 ±1,002 ^a	3,729 ±1,008 ^a
	NTH	28,188 ±0,710 ^d	37,292 ±0,828 ^c	81,979 ±1,880 ^a	62,313 ±1,262 ^b
30	G	5,875 ±1,126 ^b	6,167 ±1,060 ^b	12,104 ±1,171 ^a	5,750 ±0,894 ^b
	SG	21,438 ±1,565 ^d	36,563 ±0,879 ^c	93,167 ±1,855 ^a	76,521 ±1,026 ^b
	H	1,896 ±0,668 ^a	1,167 ±0,129 ^b	2,208 ±0,065 ^a	1,125 ±0,112 ^b
	NTH	29,208 ±1,128 ^d	43,896 ±1,426 ^c	107,479 ±2,322 ^a	83,396 ±1,833 ^b

Promedio ± desviación estándar

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa (p<0,05)

G: Granulocitos; SG: Semigranulocitos; H: Hialinos; NTH: Número total de hemocitos

El número total de hemocitos (NTH) de *C. caementarius* al inicio, fue de $27,792 \pm 0,631 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ para todos los tratamientos. A los 15 y 30 días todas las concentraciones de EMS mostraron aumento significativo, siendo mayor el NTH para las concentraciones de 1,5 ($81,979 \pm 1,880 \times 10^5$ - $107,479 \pm 2,322 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) seguido de 2,0 g kg⁻¹ de EMS ($62,313 \pm 1,262 \times 10^5$ - $83,396 \pm 1,833 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) y 1,0 ($37,292 \pm 0,828 \times 10^5$ - $43,896 \pm 1,426 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) (Fig. 2).

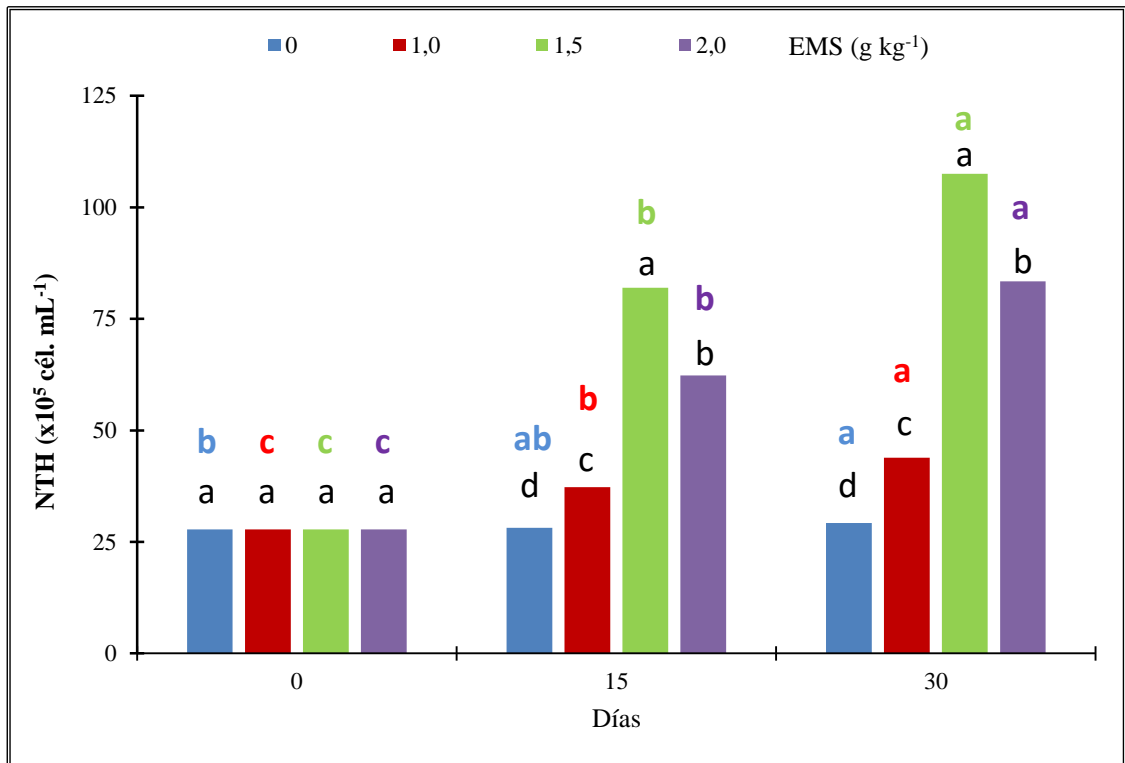


Fig. 2. Número total de hemocitos (NTH) x 10⁵ cél. mL⁻¹ de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo.

El número diferencial de hemocitos (NDH) varía en relación a las concentraciones utilizadas (Anexo 18). En todas las concentraciones los hemocitos granulados o granulocitos (G) fueron los que se encontraron en cantidades intermedias (Fig. 3). Los hemocitos semigranulosos o semigranulocitos (SG) en todos los casos constituyen los más numerosos, los cuales aumentan para todas las concentraciones de EMS (Fig. 4). Los hemocitos hialinos o hialinocitos (H) fueron los que se encontraron en menor cantidad (Fig. 5).

En lo que respecta al NDH, al inicio, los G, SG y H fueron de $6,979 \pm 0,320 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ (25,11 %), $19,125 \pm 0,536 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ (68,82 %) y $1,688 \pm 0,282 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ (6,07 %) respectivamente.

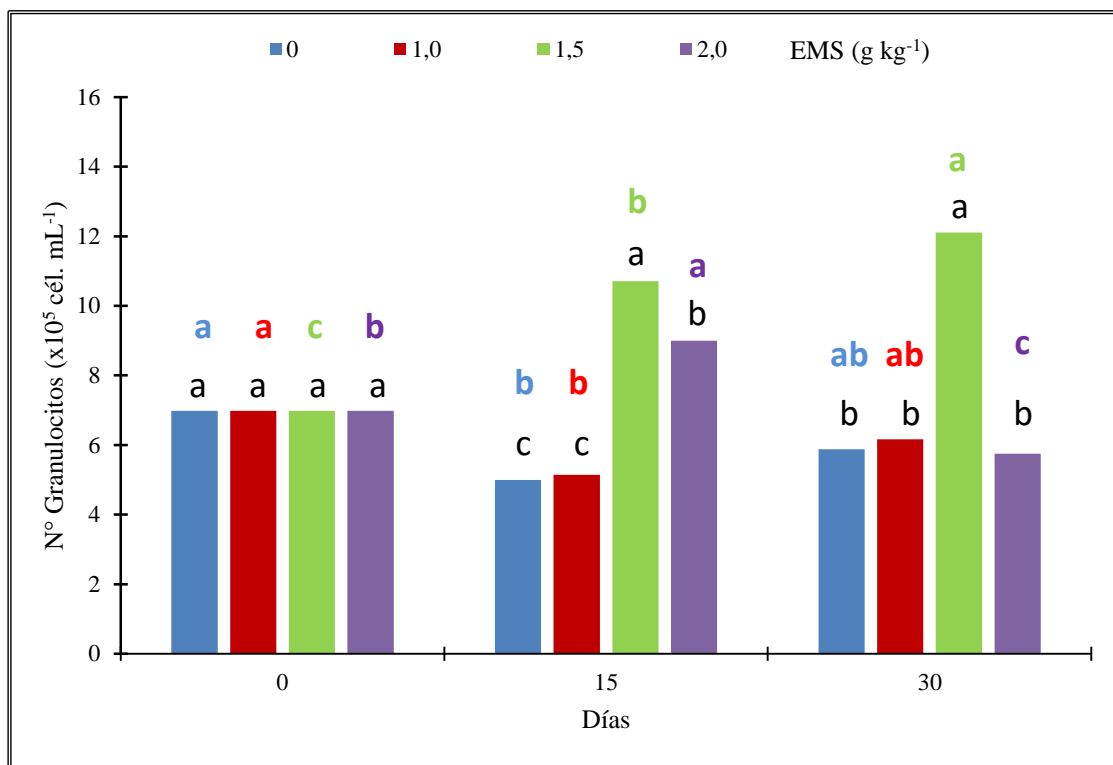


Fig. 3. Número de hemocitos granulocitos $\times 10^5$ cél. mL^{-1} de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo.

Los G se encontraron en cantidades intermedias con 1,5 g kg^{-1} de EMS (Fig. 3) ($10,708 \pm 1,036 \times 10^5$ cél. mL^{-1}); 2,0 g kg^{-1} de EMS ($9,00 \pm 0,93 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y 1,0 g kg^{-1} de EMS ($5,14 \pm 0,64 \times 10^5$ cél. mL^{-1}), a los 15 días, de igual manera y a los 30 días con 1,5 g kg^{-1} de EMS ($12,10 \pm 1,17 \times 10^5$ cél. mL^{-1}); 2,0 g kg^{-1} de EMS ($5,75 \pm 8,94 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y 1,0 g kg^{-1} de EMS ($6,167 \pm 1,06 \times 10^5$ cél. mL^{-1}). Además en los camarones alimentados con 1,5 g kg^{-1} de EMS se observó diferencias significativas entre los 15 y 30 días.

Los SG se encontraron en cantidades elevadas en todas las concentraciones (Fig. 4), siendo significativamente alto ($p < 0,05$) con 1,5 g kg^{-1} de EMS ($68,563 \pm 1,030 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) seguido por 2,0 g kg^{-1} de EMS ($49,583 \pm 2,238 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y 1,0 g kg^{-1} de EMS ($30,688 \pm 1,224 \times 10^5$ cél. mL^{-1}). De igual manera a los 30 días, aumentan para la concentración de 1,5 g kg^{-1} de EMS ($93,167 \pm 1,855 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y seguido por 2,0 g kg^{-1} de EMS ($76,521 \pm 1,026 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y 1,0 g kg^{-1} de EMS ($36,563 \pm 0,879 \times 10^5$ cél. mL^{-1}). Además se observó diferencias significativas a los 15 y 30 días en todas las concentraciones de EMS (Anexo 23).

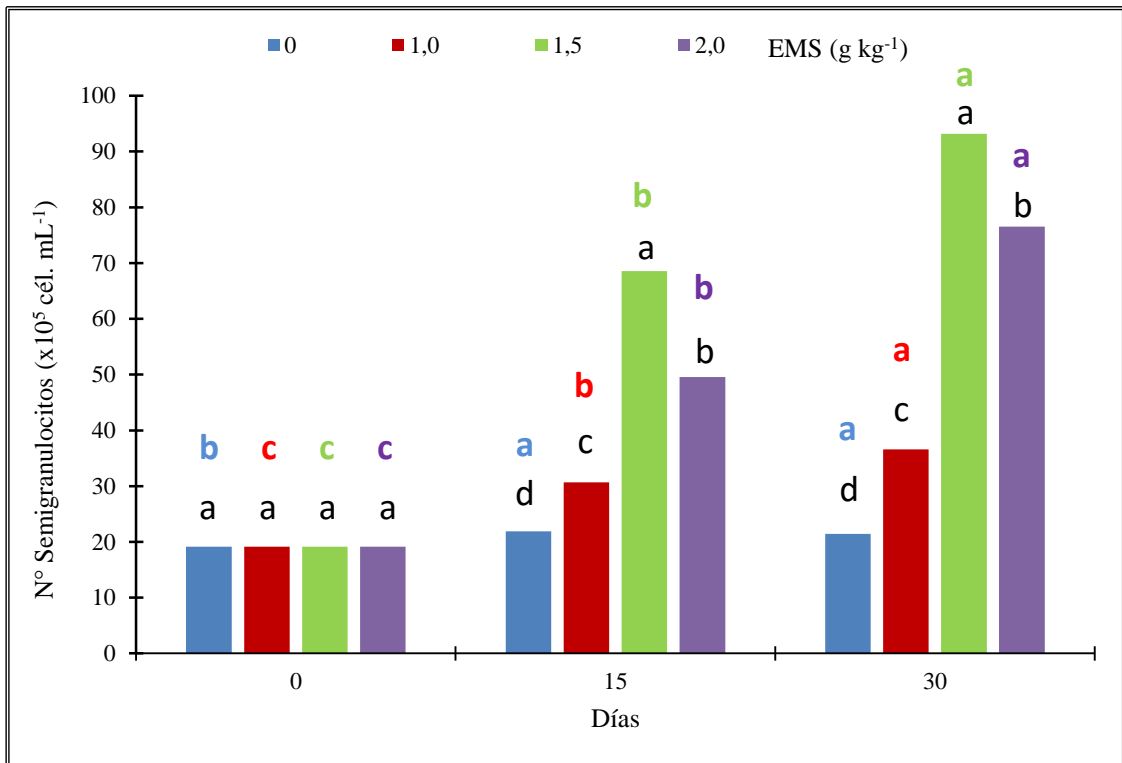


Fig. 4. Número de hemocitos semigranulocitos $\times 10^5$ cél. mL⁻¹ de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo.

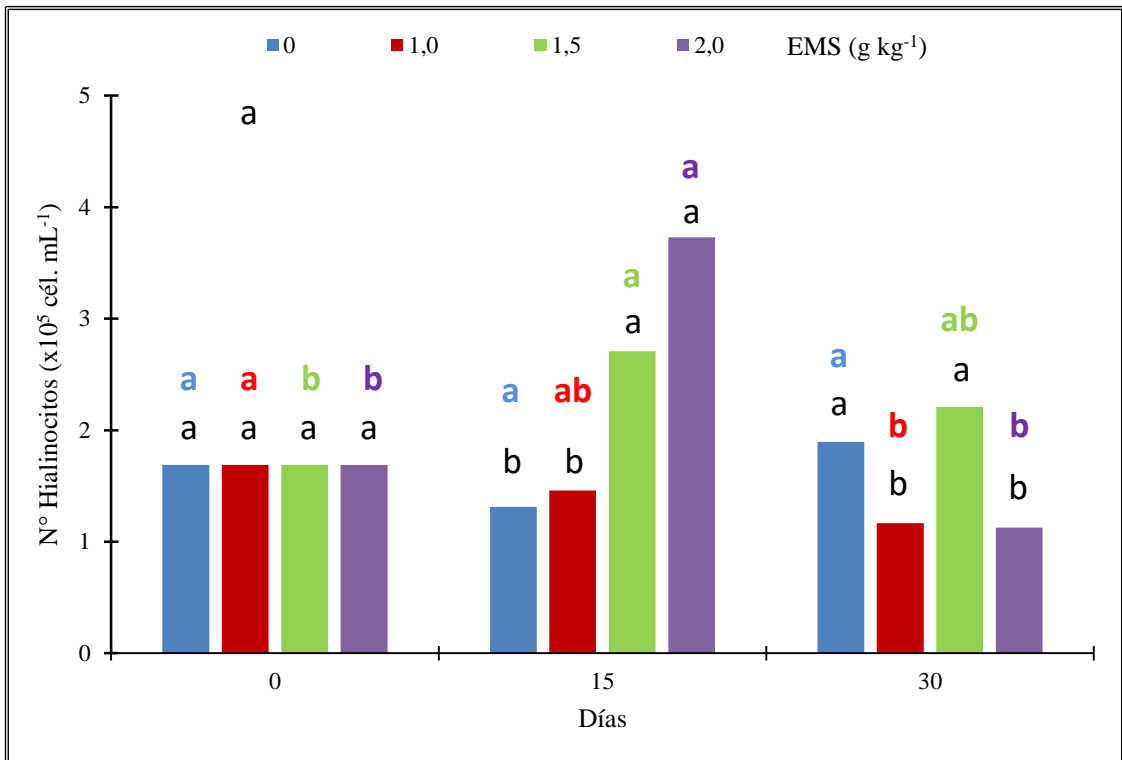


Fig. 5. Número de hemocitos hialinocitos $\times 10^5$ cél. mL⁻¹ de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS a través del tiempo.

Los H a los 15 días se encontraron en pequeñas cantidades en todas las concentraciones (Fig. 5); 1,0 ($1,458 \pm 0,323 \times 10^5$ cél. mL⁻¹), 1,5 ($2,708 \pm 1,002 \times 10^5$ cél. mL⁻¹), y 2,0 g kg⁻¹ de EMS ($3,729 \pm 1,008 \times 10^5$ cél. mL⁻¹), de igual manera, a los 30 días con 1,0 ($1,167 \pm 0,129 \times 10^5$ cél. mL⁻¹), 1,5 ($2,208 \pm 0,065 \times 10^5$ cél. mL⁻¹), y 2,0 g kg⁻¹ de EMS ($1,125 \pm 0,112 \times 10^5$ cél. mL⁻¹).

3.2. Evaluación a la resistencia a *Aeromonas* sp

3.2.1. Supervivencia

La supervivencia para los alimentados con 1,5 g kg⁻¹ de EMS fue $100,00 \pm 0,00\%$, con 2,0 g kg⁻¹ de EMS fue $99,50 \pm 0,71 \%$, y con 1,0 g kg⁻¹ de EMS fue $97,50 \pm 0,71 \%$ y para el grupo control fue $97,00 \pm 1,41$.

Se observaron ciertas manifestaciones postinfección con *Aeromonas* sp en algunos ejemplares adultos machos de *C. caementarius*, durante las 0, 12, 24, 48 y 72 h, presentaron un ligero oscurecimiento en el cuerpo a las 12 y 24 h de la infección, así mismo se observaron el cuerpo ligeramente encorvados a partir de las 24 h. Para, se mostraron poco activos frente al tacto. Estas manifestaciones fueron frecuentes en el grupo control que en los alimentados con EMS,

3.2.2. Número de bacterias

El número de bacterias en la hemolinfa (UFC mL⁻¹) de *C. caementarius* varían en relación a las concentraciones utilizadas y tiempos de exposición (12, 24, 48 y 72 h) después de la infección (Tabla 5).

Tabla 5. Número de bacterias ($\times 10^3$ UFC) en hemolinfa de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12, 24, 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

TIEMPO (h)	EMS (g kg ⁻¹)			
	0	1,0	1,5	2,0
12	$2,233 \pm 0,029^a$	$2,000 \pm 0,087^b$	$1,917 \pm 0,115^b$	$1,083 \pm 0,058^c$
24	$4,050 \pm 0,087^b$	$4,500 \pm 0,087^a$	$3,550 \pm 0,132^c$	$3,883 \pm 0,071^b$
48	$9,900 \pm 0,087^a$	$2,500 \pm 0,050^b$	$1,067 \pm 0,115^c$	$2,517 \pm 0,126^b$
72	$9,400 \pm 0,087^b$	$13,017 \pm 0,058^a$	$0,817 \pm 0,029^d$	$2,317 \pm 0,058^c$

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa ($p < 0,05$)

Para la concentración de 0,0 y 1,0 g kg⁻¹ de EMS, el número de bacterias fueron aumentando mientras aumentaba el tiempo de exposición, las UFC aumentaron de 2,233 x10³ UFC mL⁻¹ (12 h) hasta 9,400 x10³ UFC mL⁻¹ (72 h) y de 2,000 x10³ UFC mL⁻¹ (12 h) hasta 13,017 x10³ UFC mL⁻¹ de hemolinfa (72 h) respectivamente.

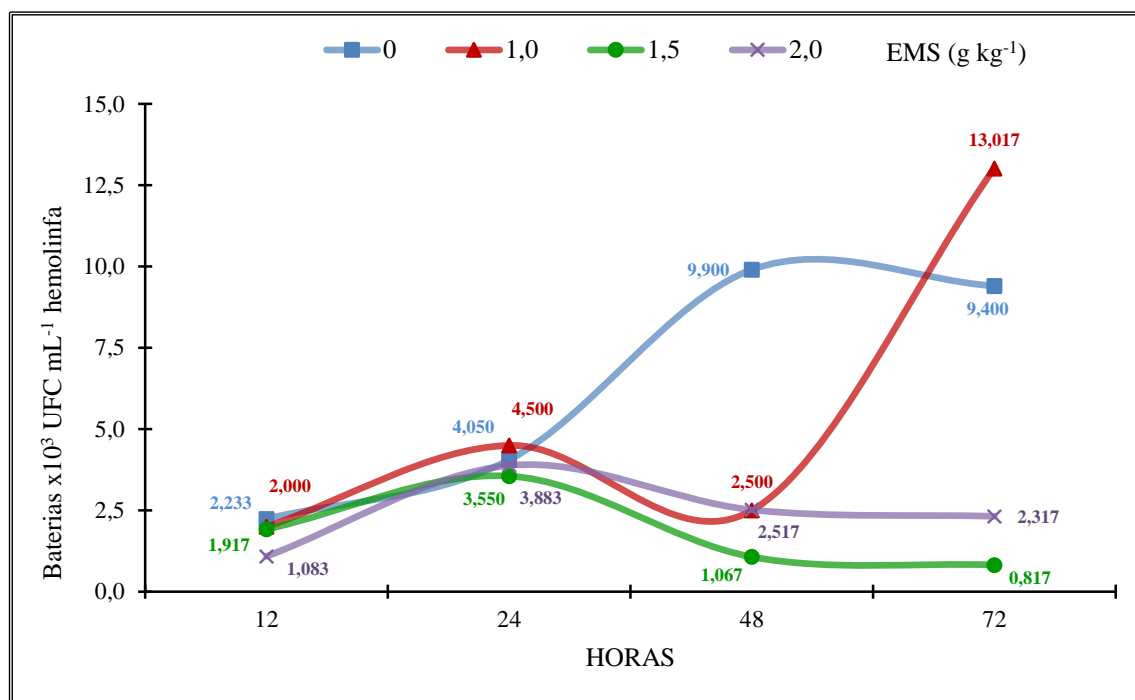


Fig. 6. Número de bacterias (x10³ UFC) en la hemolinfa de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp, a las 12; 24; 48 y 72 h.

A diferencia de 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS donde aumentaron hasta las 24 h y luego disminuyó a las 48 y 72 h de exposición, las UFC aumentaron de 1,917 x10³ UFC mL⁻¹ (12 h) hasta 3,550 x10³ UFC mL⁻¹ (24 h) y 1,083 x10³ UFC mL⁻¹ (12 h) hasta 3,883 x10³ UFC mL⁻¹ (24 h), respectivamente; para luego disminuir el número de bacterias hasta 0,817 x10³ UFC mL⁻¹ (72 h) y 2,317 x10³ UFC mL⁻¹ (72 h), respectivamente (Fig. 6).

3.2.3. Determinación del número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos después de la infección

El NTH y NDH después de la infección con *Aeromonas* sp se muestran en el Tabla 6, los cuales se realizaron a las 12, 24, 48 y 72 h, en todas las concentraciones (0,0; 1,0; 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS).

Tabla 6. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

HORAS	TIPO DE HEMOCITO	EMS (g kg ⁻¹)			
		0	1,0	1,5	2,0
0	G	5,875 ±1,126 ^b	6,167 ±1,060 ^b	12,104 ±1,171 ^a	5,750 ±0,894 ^b
	SG	21,438 ±1,565 ^d	36,563 ±0,879 ^c	93,167 ±1,855 ^a	76,521 ±1,026 ^b
	H	1,896 ±0,668 ^a	1,167 ±0,129 ^b	2,208 ±0,065 ^a	1,125 ±0,112 ^b
	NTH	29,208 ±1,128 ^d	43,896 ±1,426 ^c	107,479 ±2,322 ^a	83,396 ±1,833 ^b
12	G	1,042 ±0,072 ^a	1,000 ±0,125 ^a	1,042 ±0,072 ^a	1,000 ±0,000 ^a
	SG	1,417 ±0,191 ^b	1,250 ±0,000 ^b	2,125 ±0,250 ^a	1,375 ±0,125 ^b
	H	1,083 ±0,144 ^a	1,042 ±0,072 ^a	1,042 ±0,072 ^a	1,125 ±0,125 ^a
	NTH	3,542 ±0,191 ^b	3,292 ±0,144 ^b	4,208 ±0,315 ^a	3,500 ±0,250 ^b
24	G	1,000 ±0,000 ^a	1,083 ±0,191 ^a	1,208 ±0,072 ^a	1,167 ±0,191 ^a
	SG	1,375 ±0,217 ^b	1,417 ±0,072 ^b	2,458 ±0,591 ^a	1,583 ±0,144 ^b
	H	1,000 ±0,000 ^a	1,083 ±0,072 ^a	1,167 ±0,191 ^a	1,208 ±0,144 ^a
	NTH	3,375 ±0,217 ^b	3,583 ±0,144 ^b	4,833 ±0,564 ^a	3,958 ±0,260 ^a
48	G	1,083 ±0,072 ^c	1,042 ±0,072 ^c	2,292 ±0,072 ^a	1,833 ±0,072 ^b
	SG	1,250 ±0,125 ^d	1,750 ±0,000 ^c	6,333 ±0,191 ^a	4,625 ±0,125 ^b
	H	1,083 ±0,072 ^a	1,125 ±0,125 ^a	1,417 ±0,260 ^a	1,292 ±0,072 ^a
	NTH	3,417 ±0,191 ^d	3,917 ±0,144 ^c	10,042 ±0,144 ^a	7,750 ±0,125 ^b
72	G	1,167 ±0,072 ^c	1,417 ±0,144 ^c	4,375 ±0,125 ^a	2,875 ±0,000 ^b
	SG	1,750 ±0,000 ^d	2,500 ±0,217 ^c	16,000 ±0,250 ^a	8,292 ±0,191 ^b
	H	1,167 ±0,072 ^c	1,167 ±0,072 ^c	2,292 ±0,260 ^a	1,708 ±0,144 ^b
	NTH	4,083 ±0,144 ^d	5,083 ±0,260 ^c	22,667 ±0,591 ^a	12,875 ±0,331 ^b

Promedio ± desviación estándar

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa (p<0,05)

G: Granulocitos; SG: Semigranulocitos; H: Hialinos; NTH: Número total de hemocitos

Inoculados con 0,05ml de suspensión de 5x10⁷ CFU.ml⁻¹ de *Aeromonas* sp

En *C. caementarius*, después de la infección con *Aeromonas* sp (Fig. 7), a las 12 y 24 h se presentaron bajas concentraciones del NTH para todas las concentraciones. A las 48 y 72 h se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) para 1,5 g kg⁻¹ de EMS con $10,042 \pm 0,144 \times 10^5$ y $22,667 \pm 0,591 \times 10^5$ cél. mL⁻¹, respectivamente, seguido por 2,0 g kg⁻¹ de EMS con $7,750 \pm 0,125 \times 10^5$ y $12,875 \pm 0,331 \times 10^5$ cél. mL⁻¹, respectivamente. A diferencia del control y 1,0 g kg⁻¹ de EMS que no mostraron variación con $3,375 \pm 0,217 \times 10^5$ – $4,083 \pm 0,144 \times 10^5$ y $3,917 \pm 0,144$ – $5,083 \pm 0,260 \times 10^5$ cél. mL⁻¹, respectivamente.

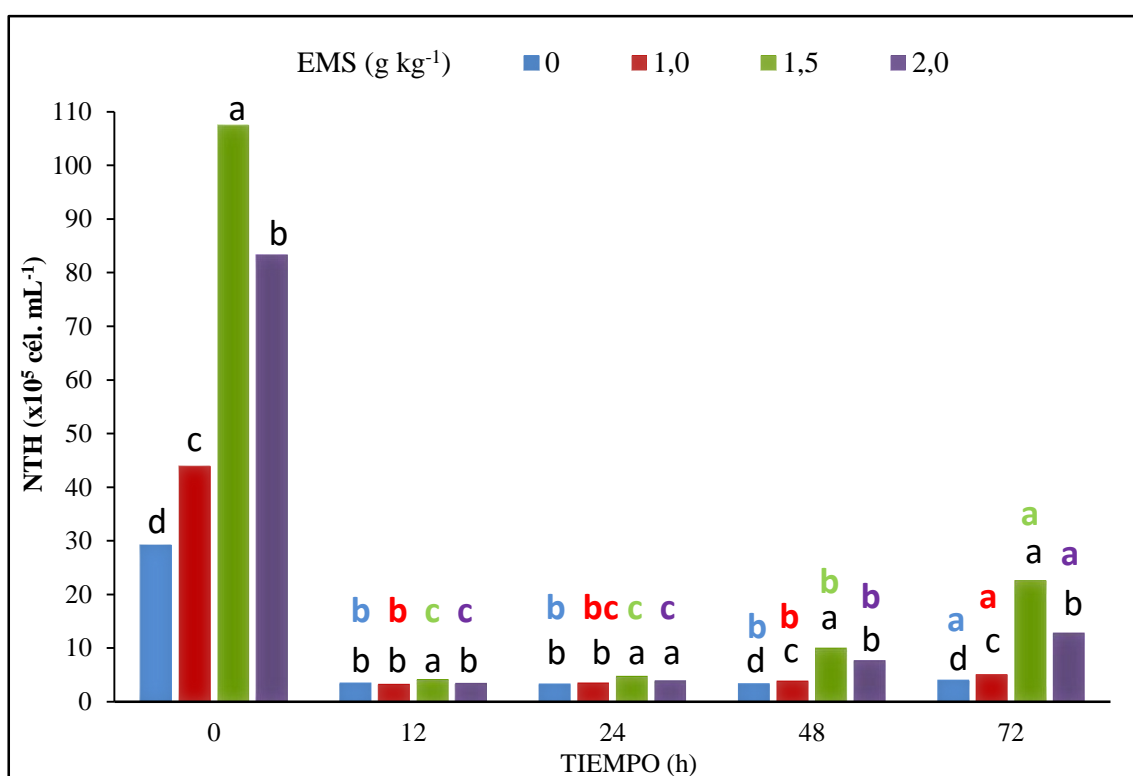


Fig. 7. Número total de hemocitos (NTH) x 10⁵ cél. mL⁻¹ de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

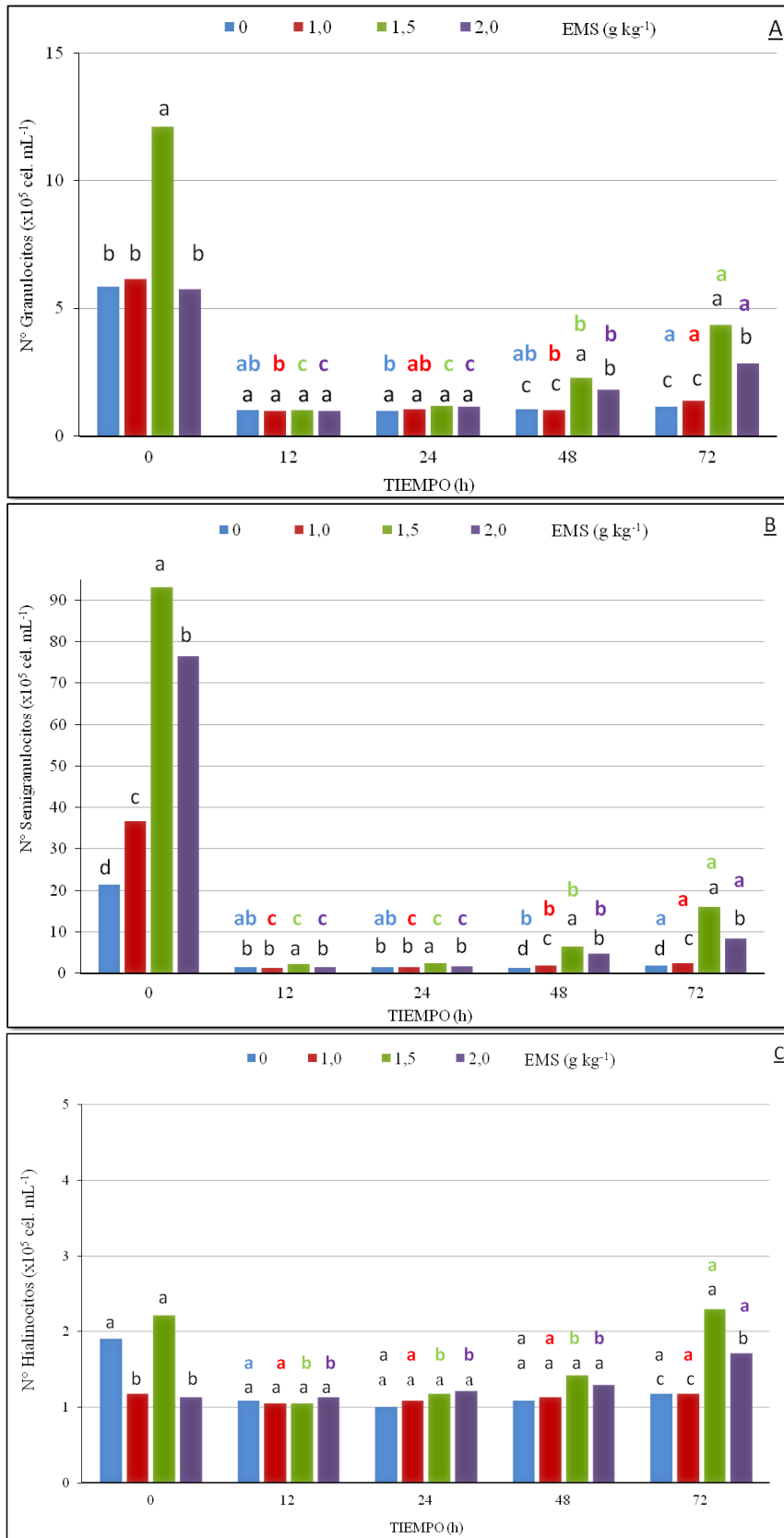


Fig. 8. Número diferencial de hemocitos (NDH) de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp. A: Granulocitos; B: Semigranulocitos; C: Hialinocitos.

En *C. caementarius*, a las 12 y 24 h de la infección, no se observa una gran variación en ninguno de los tres tipos de hemocitos (Fig. 8).

A las 48 y 72 h, se observó un aumento significativo, para los tres tipos hemocitos G, SG y H, en los alimentados con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS; siendo los hemocitos SG quienes presentaron un mayor aumento pasado las 48 y 72 h; mientras que los alimentados con 2,0 g kg⁻¹ de EMS y el grupo control no presentaron una notoria variación de los tres tipos de hemocitos.

3.2.4. Determinación de la actividad fenoloxidasa

En la Tabla 7 se muestran los valores de actividad fenoloxidasa (PO) para las concentraciones con 0,0; 1,0; 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS a las 12; 24; 48 y 72 h de infección.

Tabla 7. Actividad fenoloxidasa (Dopacromo/50µl de hemolinfa) en la hemolinfa de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12, 24, 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

HORAS	EMS (g kg ⁻¹)			
	CONTROL (0)	1,0	1,5	2,0
12	0,0037 ±0,0012 ^c	0,0020 ±0,0000 ^c	0,0130 ±0,0010 ^a	0,0083 ±0,0015 ^b
24	0,0103 ±0,0006 ^a	0,0053 ±0,0025 ^b	0,0107 ±0,0006 ^a	0,0057 ±0,0007 ^b
48	0,0113 ±0,0006 ^c	0,0080 ±0,0010 ^d	0,0277 ±0,0006 ^a	0,0160 ±0,0000 ^b
72	0,0100 ±0,0010 ^c	0,0137 ±0,0006 ^c	0,0563 ±0,0015 ^a	0,0280 ±0,0035 ^b

Promedio ± desviación estándar

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa (p<0,05)

Existe una gran variación en la actividad PO de los organismos en todas las concentraciones (Fig. 9), la misma se hace muy notoria en los alimentados con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS que tuvieron un aumento significativo (p<0,05) a las 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp, mientras que los alimentados con 1,0 g kg⁻¹ de EMS y el grupo control presentaron los menores valores.

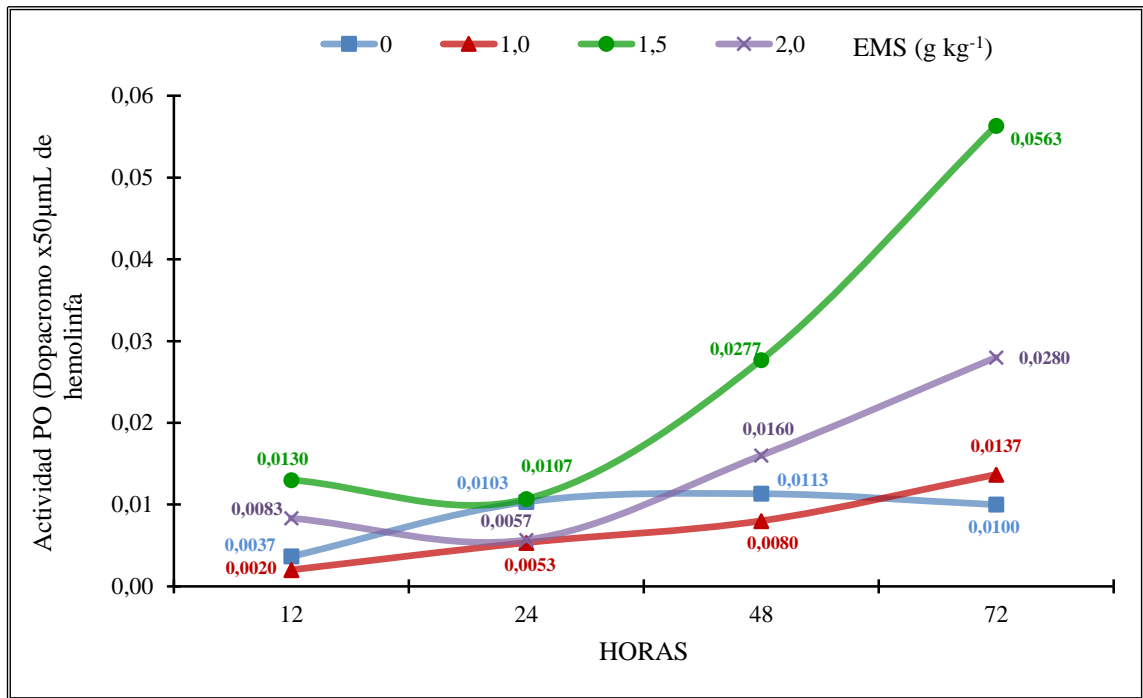


Fig. 9. Determinación de la actividad fenoloxidasa (PO) (Dopacromo/50μl de hemolinfa) en la hemolinfa de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

3.3. Calidad física y química del agua de crianza

Los parámetros de calidad de agua de las unidades experimentales mostraron promedios aceptables, donde la temperatura fue de $24,75 \pm 0,5$ °C, el oxígeno disuelto fue de $5,12 \pm 0,44$ mg L⁻¹, el CO₂ fue de 15 ± 0 mg L⁻¹, la dureza fue de $106,5 \pm 0,5$ mg L⁻¹, la alcalinidad fue de 40 mg L⁻¹, el NO₂ fue de $0,19 \pm 0,05$ mg L⁻¹ y NH₃ fue de $0,12 \pm 0,06$ mg L⁻¹, no encontrándose diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P > 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

4.1. Determinación del número total y diferencial de hemocitos durante la alimentación

El NTH y NDH circulantes en crustáceos reaccionan a diferentes factores estresantes y enfermedades (Johansson *et al.*, 2000), sin embargo, el NTH en la circulación periférica varía en los diferentes especies, sexo, procedencia, condiciones de laboratorios, métodos de conteo, calidad del agua (Gelibolu *et al.*, 2009), alimento, sustancias estimulantes (Takahashi *et al.*, 1998; Chotigeat *et al.*, 2004; Campa *et al.*, 2005; Cavalcante *et al.*, 2007; Manilal *et al.*, 2009; Flores, 2010) y estados de muda (Jussila, 1997). El NTH basal en machos adultos de *C. caementarius* procedentes del río Pativilca fue $27,792 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ valor cercano a lo reportado por Azañero *et al.* (2006) de $25,50 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ en hembras de la misma especie procedentes del río Ica, resultados similares fue reportado por Gelibolu *et al.* (2009) $21,643 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ en machos de *Callinectes sapidus*. Existe variación del NTH en las diferentes especies de crustáceos, Chotikachinda *et al.* (2008) reportan en *L.vannamei* recuentos de 81×10^5 cél. mL⁻¹, no obstante, algunos estudios muestran diferencias entre la misma especie de crustáceos como en *P. monodon*. Traifalgar *et al.* (2013) reportó 150×10^5 cél. mL⁻¹ y Sritunyalucksana *et al.* (2005) reportó 83×10^5 cél. mL⁻¹. Las diferencias encontradas con respecto al NTH, pueden deberse según Vázquez *et al.* (1998) a ciertos factores tanto ambientales como fisiológicos, los que contribuyen de manera importante en la inmunidad de estas especies. Así mismo, a las características propias y a las diferentes maneras de responder del sistema inmune de cada especie, según Bachere *et al.* (1995), el conteo de hemocitos permite analizar los efectos de factores del ambiente o condiciones alimentarias que pueden inducir a estrés o a deficiencias metabólicas; Por lo tanto el NTH es útil como un potencial indicador del estado inmune del camarón (Manilal *et al.*, 2009).

El incremento del NTH a los 30 días (Fig. 2) con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS fue $107,79 \times 10^5$ cél. mL⁻¹, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) que con $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($83,396 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) y $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($43,896 \times 10^5$ cél. mL⁻¹). Estos resultados sugieren que de alguna manera el EMS tiene la capacidad para estimular la proliferación de los hemocitos en la especie, esto probablemente porque un receptor en la superficie del

hemocito reconoce una molécula de inmunoestimulante, se rompe el equilibrio metabólico y la respuesta celular oxidante y antioxidante promueve la producción de promotores como citocinas, las cuales pueden estimular el incremento de hemocitos circulantes (Rendón & Balcázar, 2003); por tal motivo, se espera genere una respuesta inmune más fuerte contra los patógenos potenciales (Muñoz *et al.*, 2000). Sin embargo el EMS como estimulante de la proliferación de hemocitos puede llegar a niveles de saturación a concentraciones superiores a $2,0 \text{ g kg}^{-1}$, obteniéndose una disminución en la proliferación de hemocitos al incrementar la concentración. Por lo tanto la dosis óptima es vital para no desgastar al organismo y el tiempo de aplicación debe ser antes de la infección, para una eficaz respuesta inmune (Montesdeoca *et al.*, 2002), además si la dosis es muy alta o inadecuada llegaría a causar toxicidad o disminución en la proliferación de los hemocitos (Smith *et al.*, 2003).

Por otro lado, el NTH con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS fue 2,94 veces mayor con respecto al control ($81,979 \times 10^5$ y $27,792 \times 10^5$ cél. mL^{-1} , respectivamente). Traifalgar *et al.* (2013) reportaron el NTH con $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ (260×10^5 y 120×10^5 cél. mL^{-1} , respectivamente) de polisacárido sulfatado de *Fucus vesiculosus* en *P. monodon* fue 2,2 veces mayor con respecto al control a los 15 días de alimentación. El aumento de los hemocitos nos indica que el EMS cumple la función de inmunoestimulante. De igual manera Chotikachinda *et al.* (2008) reportan en *L. vannamei* recuentos del NTH con $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de pared celular de levadura inactiva, fue de 1,61 veces mayor con respecto al control ($130,8 \times 10^5$ y 81×10^5 cél. mL^{-1} , respectivamente). Así mismo Sritunyalucksana *et al.* (2005) reportan en *P. monodon* recuentos del NTH con 40 mg kg^{-1} de extracto de levadura después de 30 días de alimentación, fue de 1,34 veces mayor con respecto al control (111×10^5 y 83×10^5 cél. mL^{-1} , respectivamente). Estos fueron bajos comparados con el recuento del NTH con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($107,479 \times 10^5$ cél. mL^{-1}), que fue 3,86 veces mayor con respecto al control. Por tanto, se sugiere que la alimentación con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS aumenta la proliferación de hemocitos, y Le Moullac *et al.*, (1998) considera que el camarón con un alto número de hemocitos resiste mejor a la infección, por consiguiente aumenta la respuesta inmunológica y resistencia frente a patógenos en los camarones.

El NDH basales como los G (25, 11%; $6,979 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) SG (68,82%; $19,125 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y H (6,07%; $1,688 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) en machos adultos de *C. caementarius*

fueron valores cercanos a lo reportado por Azañero *et al.* (2006) en hembras de la misma especie (41,33% , $10,54 \times 10^5$ cél. mL^{-1} ; 53,77% , $13,71 \times 10^5$ cél. mL^{-1} ; 4,90% , $1,25 \times 10^5$ cél. mL^{-1} , respectivamente), en machos de *Callinectes sapidus* la concentración de G (38,18%; $8,263 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) SG (51,91%; $11,235 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y H (9,91%; $2,144 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) presentaron valores similares a lo reportado por Gelibolu *et al.* (2009). En *Fenneropenaeus indicus* el porcentaje relativo de los hemocitos H fue aproximadamente 10-15%, en los hemocitos G y SG fueron 20-25% y 60-65%, respectivamente (Kakoolaki *et al.*, 2010). Estos valores difieren con lo aportado por Cheng *et al.* (2005), los que examinaron hemocitos de *L. vannamei*, siendo los hemocitos H los más altos con el 72,64 % ($283,5 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) de los hemocitos circulantes, mientras que los hemocitos SG y G representaron el 13,45 % ($52,5 \times 10^5$ cél. mL^{-1}) y 13,91 % ($54,3 \times 10^5$ cél. mL^{-1}), respectivamente. Hose *et al.* (1992), reporta que en *Sicyonia Ingentis*, los hemocitos H comprende el 50-60 % de los hemocitos circulantes, mientras que el hemocitos SG y G representó el 30 % y 10 %, respectivamente. Los hemocitos H de *M. rosenbergii* posee el 70 % de hemocitos (Vázquez *et al.*, 1997), y en la langosta *Homarus americanus* y el cangrejo *Loxorhynchus grandis*, los hemocitos SG fueron los más altos alcanzando más de 60 % de la número total de células (Hose *et al.*, 1990).

Los porcentajes en los tipos de hemocitos de las especies de crustáceos antes descritas podría ser consecuencia de factores ambientales, fisiológicos, nutricionales y sanitarios, en nuestro caso las condiciones ambientales durante el experimento se mantuvieron los parámetros físicos, químicos y de calidad del agua dentro de los intervalos propuestos por Brock & Main, (1994). Así, algunos autores reportan que en la mayoría de los trabajos experimentales de cultivo se han realizado con temperaturas que oscilaron entre los 20 °C y 25 °C (Norambuena, 1977; Viacava *et al.*, 1978; Sanzana & Báez, 1983; Guadalupe, 1985; Rivera *et al.*, 1987; Morales, 1997); los valores oxígeno disuelto que sugieren trabajar deben ser con altas concentraciones (Guadalupe 1985; Rocha, 1985), pero sobre todo estos deben ser superiores a 5 mg L^{-1} (Rojas *et al.*, 2005); y en términos generales los valores para amonio, nitritos y nitratos deberían estar por debajo de 0,15; 0,25 y 4,0 ppm (Guadalupe, 1985). Por todo ello, se puede afirmar que en el sistema experimental, los parámetros ambientales fueron adecuados manteniéndose en el rango normal para el camarón.

La alimentación con el EMS, estimularon la proliferación de hemocitos SG en *C. caementarius*, estando directamente relacionado con el incremento del NTH (Fig. 4), cuya concentración fue incrementando durante los 30 días de alimentación, siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($93,167 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), seguido por $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($76,521 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), y $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($36,563 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la alimentación con EMS favorece la proliferación de hemocitos SG. Así, Johansson *et al.* (2000), Menciona que los hemocitos SG son sensible, encargadas de reconocer y responder ante células invasoras para luego atacar desplegándose en la superficie del invasor, se ha observado que estas células son las que reaccionan ante los polisacáridos microbianos como los lipopolisacáridos (LPS) y β -1,3 glucanos, con una respuesta de degranulación, siendo posible que el aumento pueda proteger a los camarones de una invasión de microorganismos, ya que a su vez los hemocitos SG son las principales células que intervienen en la reacción de encapsulación (Johansson *et al.*, 2000), fagocitosis (Vázquez *et al.*, 2009; Aguirre *et al.*, 2009) y la actividad profenoloxidasa (proPO) (Hose *et al.*, 1990). Esto concuerda con las investigaciones de Cerenius *et al.* (2004), quienes establecen que los hemocitos SG son los que reaccionan primero en la respuesta inmune.

El EMS, también estimuló la proliferación de hemocitos G en *C. caementarius* (Fig. 3), obteniendo la más alta concentración con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS durante los 30 días de alimentación ($12,104 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), seguido por $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($6,167 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$); a diferencia de $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS ($9,0 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), que disminuyo ($5,750 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$) a los 30 días de alimentación, estos resultados sugieren que los hemocitos G tardan en proliferar, sin embargo, pueden inducir la liberación de moléculas inmunoefectoras, entre las cuales las moléculas del sistema proPo y moléculas tóxicas y microbicidas (Johansson *et al.*, 2000; Hose *et al.*, 1990) ante una invasión de microorganismos.

Por otro lado, la alimentación con $1,0 \text{ g kg}^{-1}$ EMS no estimularon la proliferación de los hemocitos H (Fig.5) disminuyendo en la relación al control. A diferencia con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS fue de $2,708 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$, manteniéndose hasta los 30 días ($2,208 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), y con $2,0 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS aumento a los 15 días ($3,729 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$), y disminuyo a los 30 días ($1,125 \times 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$). La disminución de los H en machos

podría deberse al estado de muda, ya que los muestreos se realizaron en los estados de muda C y D1, Cheng *et al.* (2003) en *M. rosebergii* determinaron baja cantidad de hemocitos H en estado de intermuda. Los SG y G son células principales que proliferan en el tejido hematopoyético, estas encapsularían células infectadas y hemocitos desgastado (Xionghui & Söderhäll., 2011 y Destoumieux *et al.*, 2000), Hose *et al.*, (1990) observa que los SG son 60% con respecto a las demás células (por tal razón en nuestra experiencia en machos adutos de *C. caementarius* observamos que las células SG son mayores que los H en todas las concentraciones; sin embargo, según Montesdioca *et al.* (2002) observo que las H son una pieza clave en el mecanismo de defensa frente a una infección antiviral, estos se incrementan cuando la infección es controlada.

4.2. Evaluación a la resistencia

El porcentaje de mortalidad va depender del tipo de cepa, dosis bacteriana con la que será infectado el organismo y la resistencia a los agentes patógenos puede estar relacionada con las diferentes especies, estadio de desarrollo y las condiciones presentadas durante el bioensayo (Trujillo *et al.*, 2005; Morales & Cuéllar-Anjel, 2008). Según Win Fu *et al.* (2006) han observado que en adultos de *L. vannamei* infectados con *V. alginolyticus* a una dosis de 2×10^6 UFC mL⁻¹ presentaron una supervivencia de 95% para el control y 98% para los alimentados con 2,0 g kg⁻¹ de extracto de agua caliente de *Gelidium amansii*; Según Trujillo *et al.* (2005) en juveniles de *L. vannamei* infectados a una dosis de 10^7 UFC mL⁻¹ de *Vibrio* sp y *V. parahaemolyticus* reportaron supervivencia de 65% y 93%, respectivamente, y Selvin *et al.*, (2011) reportaron en juveniles de *P. monodon* alimentados con 1,0 g kg⁻¹ de extracto de *U. fasciata* frente a una infección con *V. fischeri* una supervivencia de 60% a una dosis de 10^8 UCF camarón⁻¹ y 100% a una dosis de 10^7 UCF camarón⁻¹, y frente a una infección con *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *Aeromonas* sp una supervivencia de 100% a una dosis de 10^6 UCF camarón⁻¹. Sin embargo Sung *et al.* (2000b) reportó 100% de mortalidad en juveniles de *M. rosenbergii* a una dosis de 10^7 cél. Camarón⁻¹ y 95,5% de mortalidad a una dosis de 10^6 cél. Camarón⁻¹ frente infección con *A. veronii*, en esta experiencia no se aplicó ningún inmunoestimulante. En el estudio, se obtuvo 100% de supervivencia para los alimentados con 1,5 g kg⁻¹ EMS y 97% para el control, no se produjo mortalidad significativas durante la experiencia, por consiguiente estos resultados

sugieren que los organismos estuvieron influenciados por EMS, siendo estos más resistentes a la infección por *Aeromonas* sp.

En machos adultos de *C. caementarius* después de la infección con *Aeromonas* sp, se obtuvo ligero oscurecimiento en el cuerpo a las 12 h y 24 h, así mismo un cuerpo ligeramente encorvado a partir de las 24 h mostrándose poco activo frente al tacto, estas manifestaciones fueron frecuentes en el grupo control que en los alimentados con EMS. Según (Conroy & Conroy, 1990) los cambios de comportamiento de los camarones infectados por bacterias se presentan a medida que la infección progresa, con movimientos natatorio desorientado o irregulares, a menudo constituye una de las primeras manifestaciones, así mismo (Morales & Cuéllar-Anjel, 2008) encontraron los camarones que presentan movimientos fuertes pueden hacerlo por horas hasta que se vuelven demasiado débiles. Por ello podríamos asumir que los organismos alimentados con EMS son resistentes ante *Aeromonas* sp que el control.

En la experiencia, es notorio que la concentración de *Aeromonas* sp inyectadas en los camarones del grupo control y en los alimentados con EMS de 1,0 g kg⁻¹, aumentaron en relación al tiempo de exposición, las UFC se incrementaron de 2,233 x10³ UFC mL⁻¹ a las 12 h hasta 9,400 x10³ UFC mL⁻¹ a las 72h y de 2,000 x10³ UFC mL⁻¹ a las 12h hasta 13,017x10³ UFC mL⁻¹ de hemolinfa a las 72h respectivamente, debido que el control no fue alimentado con EMS, y el tratamiento con 1,0 g kg⁻¹ de EMS no fue suficiente como para estimular la remoción de estos patógenos; mientras que con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS, donde la UFC mL⁻¹ disminuyen a las 48 y 72 h de exposición; siendo las UFC de 1,917 x10³ UFC mL⁻¹ a las 12 h hasta 3,550 x10³ UFC mL⁻¹ a las 24 h y 1,083 x10³ UFC mL⁻¹ a las 12 h hasta 3,883 x10³ UFC mL⁻¹ a las 24 h, respectivamente; para luego disminuir la concentración de bacterias a 0,817 x10³ UFC mL⁻¹ y 2,317 x10³ UFC mL⁻¹ a las 72 h, respectivamente, lo que hace evidente que la inclusión de EMS en los tratamientos tienen efecto positivo en la disminución de las UFC mL⁻¹ de bacterias, sobre todo en los alimentados con una concentración de 1,5 g kg⁻¹ de EMS, siendo está en la concentración a la cual observo tal disminución bacteriana en relación con el NTH y NDH, en otros decápodos, tal disminución es asociado con la disminución rápida y significativa del número de hemocitos circulantes (Tyson & Jenkins, 1973; Smith & Söderhäll, 1983; Martin *et al.*, 1993), como en *Sicyonia ingentis* (Martin *et al.*, 1993) y *P. monodon* (Sung *et al.*, 1996).

Cuando el cuerpo de un crustáceo es invadido por un gran número de microorganismos, en el caso de bacterias, pueden ser removidos directamente por fagocitosis, mientras que muchos otros se confinan a nódulos o grupos de células (Sung *et al.*, 2000a, 2000b; Morales & Cuéllar-Anjel, 2008). En respuesta a la presencia de los tejidos infectados, se ha sugerido que algunos hemocitos pueden migrar a los tejidos conectivos (Sahoo *et al.*, 2007), los senos sanguíneos entre los túbulos hepatopancreáticos y las branquias (Sung & Song, 1996). Johnson (1987), ha sugerido que en algunos tejidos, los fagocitos pueden ser originados por los hemocitos circulantes, por lo que se cubren distintas áreas de acción de los mecanismos de defensa, y es gracias a esto que se hace posible la disminución de la presencia de los patógenos detectados; esto estaría ocurriendo con los camarones alimentados con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS, al existir un estímulo inmunitario tendrían una mayor efectividad en detectar y eliminar los microorganismos extraños en la hemolinfa de *C. caementarius*. Pero, sin duda, en *C. caementarius* alimentados con EMS, el proceso fagocítico se ve incrementado, lo cual se ve reflejado en una disminución de la concentración de bacterias a las 72 h de infectados, reforzado esto según lo mencionado por Rivera *et al.* (2002) que menciona que los polisacáridos procedentes de macroalgas pardas, incluyendo el alginato de sodio que posee *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia nigrescens*, polisacáridos sulfatados de *S. polycystum* (Chotigeat *et al.*, 2004) y extractos de *S. glaucescens* (Ghaednia *et al.*, 2011), todos muestran efectos positivos en la resistencia de los camarones contra las infecciones de patógenos, activando diversos mecanismos dentro de ellos el número de hemocitos y por ende la fagocitosis.

En *C. caementarius*, después de la infección con 5×10^7 bacterias mL⁻¹ de *Aeromonas* sp, se observó una coloración oscura la cual iba aclarando al pasar las horas, lo mismo que el hepatopáncreas se tornó oscurecida (pigmentación oscura o melanización) como resultado de la liberación de los compuestos inmuno efectores presentes en las células hemocíticas (Cerenius *et al.*, 2004); estando asociado con una respuesta inflamatoria de hemocitos que abandonan la circulación y migran al sitio de la inyección (Van de Braak *et al.*, 2002b).

En *C. caementarius*, a las 12 y 24 h después de la infección con *Aeromonas* sp, presentó valores bajos del NTH para todos los tratamientos estudiados (Tabla 7), probablemente una de las razones de la disminución del NTH a las 12 h en la hemolinfa es que después

de la inoculación los hemocitos se estarían infiltrando en la zona de inoculación. Según Johansson *et al.* (2000) El número de hemocitos libres en la hemolinfa puede disminuir drásticamente durante una infección como resultado de su infiltración en los tejidos infectados y su utilización en la formación de nódulos y encapsulación así los nuevos hemocitos requieren ser producidos y liberados en la circulación a partir de los tejidos hematopoyéticos (Johansson *et al.*, 2000; Van de Braak *et al.*, 2002a).

Las bajas concentraciones del NTH en hemolinfa de *C. caementarius* después de la infección con *Aeromonas* sp se mantuvo durante las 72 h con 1,0 g kg⁻¹ de EMS y en el tratamiento control (Fig. 7), posiblemente porque en estos el mecanismo esté poco estimulado, y según Johansson *et al.* (2000), las bajas concentraciones del NTH se atribuyen a las diferentes actividades de defensa, la migración de hemocitos en el sitio de la inyección representa una reducción de la concentración de células en la hemolinfa. Por otra parte, los hemocitos pueden dejar la circulación después de la fagocitosis y entrar en el corazón, el tejido conectivo, las branquias u otros senos hemáticos (Johansson *et al.*, 2000). Asimismo, de acuerdo a Martin *et al.* (1993), en *Sicyonia ingentis* relacionan la disminución del NTH con el ingreso por inyección de *Bacillus cereus*, *B. Subtilis*, *Aeromonas* sp, restableciéndose el NTH al ser eliminadas estas bacterias.

Por otro lado, el NTH en los camarones alimentados con 1,5 g kg⁻¹ de EMS fue de 10,042 x10⁵ a las 48h y 22,667 x10⁵ cél. mL⁻¹ a las 72 h, y los alimentados con 2,0 g kg⁻¹ de EMS fue de 7,750 x10⁵ a las 48 y 12,875 x10⁵ cél. mL⁻¹ a las 72 h, mostrando un aumento significativo (p<0,05) después de la exposición a *Aeromonas* sp, según Martin *et al.* (1993), determinan que los niveles normales de hemocitos en *S. ingenti* retornaron a las 96 h al reducir el número de bacterias. Según Chisholm & Smith (1995), el incremento en el NTH después de 48 h postinfección puede relacionarse con un efecto protector del sistema inmune del camarón contra patógenos potenciales, considerando que su sistema inmunológico ha sido estimulado con el EMS, esto demuestra la capacidad que tiene el EMS para estimular la proliferación de hemocitos en la especie. Así, Rodríguez & Le Moullac (2000), concluyó que una disminución en el NTH en respuesta al desafío con bacterias, es compensado por un incremento posterior, siendo común que se observe una disminución del NTH durante las primeras horas de un proceso infeccioso y un aumento del número de células en fases más tardías, por

consiguiente estos resultados sugieren que el EMS favorece la proliferación de hemocitos, disminuyendo el tiempo de recuperación de los hemocitos a sus niveles normales.

El NTH y NDH se diseminan de acuerdo a la distribución y eliminación de las bacterias en el organismo (tabla 7), dependen también del huésped y la virulencia de la bacteria, así Ligthner (1993) y Martin *et al.* (1993), encontraron que la *A. viridans* en camarón es eliminada rápidamente de la circulación, pero en la langosta *Homarus americanus* esta misma bacteria causa la enfermedad Gaffkemia. Para el caso de *C. caementarius*, este elimina rápidamente a *Aeromonas* sp cuando se encuentra inmunoestimulado con EMS.

En *C. caementarius*, la concentración para los tres tipos de hemocitos (G, SG y H), en todas las concentraciones de EMS, a las 12 y 24 h se mantuvieron bajos (Fig. 8), siendo esto probablemente debido a la lisis celular o incremento del movimiento de las células desde la hemolinfa a los tejidos invadidos o lesionados (Fontaine & Lightner, 1975). A las 48 y 72 h, en lo que respecta al NDH se puede observar que en los camarones alimentados con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS, los SG muestran los mayores valores en relación a los G y H respectivamente (fig. 8). Los SG mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$). Lo que Según Maldonado (2003), se incrementan rápidamente a las 24 h postinfección. Esto concuerda con las investigaciones de Cerenius *et al.*, (2004), quienes establecen que los hemocitos SG son los más sensibles y los que reaccionan primero en la respuesta inmune; mientras que los alimentados con 1,0 g kg⁻¹ de EMS y el tratamiento control no presentaron una variación significativa durante todo el tiempo de exposición a *Aeromonas* sp. En cambio, los G y H mostraron bajas concentraciones durante las 72 h de exposición en todas las concentraciones de EMS y el tratamiento control.

Probablemente el EMS contiene polisacárido sulfatado que se puede utilizar como inmunoestimulante para aumentar la resistencia natural del camarón, permitiendo mejorar las condiciones inmunológicas de los organismos en cultivo Chotigeat *et al.*, (2004), por lo tanto al incluir el EMS en el alimento incrementaría los valores del NTH a las 72 h sobre todo a una concentración de 1,5 g kg⁻¹ de EMS, logrando maximizar la inmunocompetencia de los camarones ante una posible infección a corto plazo.

En nuestra experiencia con machos adultos de *C. caementarius*, la determinación de la actividad PO expresados en Dopacromo x 50 μ l de hemolinfa (fig. 9), se encontró una gran variación en todas las concentraciones de EMS, presentado un aumento en los alimentados con 1,5 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS con respecto al control en todo el tiempo de exposición a *Aeromonas* sp; a diferencia de los alimentados con 2,0 g kg⁻¹ de EMS que disminuye a las 24 h, y un aumento a las 48 h y 72h; mientras que los alimentados con 1,0 g kg⁻¹ de EMS aumenta a partir de las 72h. Estos resultados sugieren que la actividad PO está directamente relacionada con la proliferación de hemocitos. En *M. rosenbergii* la actividad PO aumentó a los 5 minutos 4,0 veces con respecto al control, para luego disminuir a las 24 h después de la infección con *A. veronii*, (Sung *et al.*, 2000b) y en machos adultos de *C. caementarius* a las 12 h.

Además, es probable que la actividad PO presente en el interior de los gránulos de los hemocitos G y SG, estaría liberándose como consecuencia de la presencia de *Aeromona* sp. Según Rendon y Balcazar (2003) considera que el sistema proPO de los camarones se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos G y SG que puede ser liberado por estimulación de las proteínas de unión en la superficie de los hemocitos al contacto con cuerpos extraños o agentes patógenos relacionados con sus compuestos tales como péptidoglicanos (PG), β -glucanos o lipopolisacáridos (LPS), una vez liberado el contenido granular por degranulación, la profenoloxidasas (proPO) es activado en PO. Le Moullac *et al.* (1998) considera que el camarón con un alto número de hemocitos resiste mejor a la infección que el camarón con un bajo número de hemocitos, esto explica la elevación de la actividad PO, directamente relacionada con la elevación de los hemocitos.

Se evidencia que la actividad PO es un componente importante en el incremento de la resistencia frente a una infección bacteriana, así Liu *et al.* (2007), describe que el aumento de la actividad PO en el cangrejo *Pacifastacus leniusculus* y la melanización como consecuencia de ello frente a *A. hydrophila*, en la cual el aumento de la actividad PO tiene efecto en una disminución de la presencia de bacterias patógenas, ello concuerda con lo obtenido en la presente experiencia con *C. caementarius*, en donde existe una relación inversa entre la actividad PO y la concentración de bacterias en hemolinfa en los camarones alimentados con 1,5 g kg⁻¹ de EMS, lo que no fue observado en el control y con 1,0 g kg⁻¹ de EMS. Suphantharika *et al.* (2003),

reportaron un aumento de la actividad de la PO en camarones tigre *Penaeus monodon* alimentados con β -glucanos el 0,2 %; en la misma especie Felix, *et al.* (2004), encontró que la adición de la macroalga *Sargassum. wightii* en polvo en el alimento funcionó como inmunoestimulante incrementando la actividad PO en los camarones alimentados con 10 g kg^{-1} de alimento y que fue significativamente mayor que en los animales del grupo control, en nuestro caso, se emplearon concentraciones menores con EMS, en donde la actividad PO con $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS fue mayor en relación con las demás concentraciones, aumentando a las 48 h de exposición a *Aeromonas* sp, Estos resultados demuestran la capacidad que tiene el EMS para estimular la proliferación de los hemocitos, disminuyendo el tiempo de aumento en estos a sus niveles normales.

Por otro lado, en *L. vannamei* alimentados con dietas conteniendo *Bacillus licheniformis* (1.0×10^9 UCF Kg^{-1} de alimento), la actividad PO fue significativamente más alta a las 96 h respecto a los camarones del grupo control (Ranjit *et al.*, 2012). Además, la inmunoestimulación se lleva a cabo por moléculas que contienen sacáridos como peptidoglucanos (Brookman *et al.*, 1989) y lipopolisacáridos (Cardenas & Dankert, 1997). Entonces, por todo ello y de acuerdo a nuestros resultados, queda demostrado que el EMS adicionado al alimento incrementa la actividad PO, lo que en conjunto con la proliferación de hemocitos y una gran actividad fagocítica, se recomienda utilizar $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ de EMS en el alimento de *C. caementarius*, ya que incrementa su resistencia ante *Aeromonas* sp.

La aplicación del EMS en la alimentación de *C. caementarius* en machos adultos estimula la proliferación de hemocitos mejorando la resistencia ante una infección por *Aeromonas* sp. Por lo tanto el uso del EMS se podría emplear para prevenir enfermedades bacterianas, además es un insumo barato de fácil adquisición e incorporación en la dieta, así como práctico para ser utilizado en los sistemas de cultivo de la especie.

V. CONCLUSIONES

- La concentración de 1,5 g kg⁻¹ de EMS alimentados en machos adultos de *C. caementarius* ocasionó una significativa ($p < 0,05$) proliferación del NTH ($107,79 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) que en aquellos alimentados con 1,0 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS (43,896 y $83,396 \times 10^5$ cél. mL⁻¹).
- El número de SG incrementa exponencialmente en machos adultos *C. caementarius* alimentados durante 30 días, siendo significativamente ($p < 0,05$) mayor con 1,5 g kg⁻¹ de EMS ($93,167 \times 10^5$ cél. mL⁻¹); menor con 1,0 y 2,0 g kg⁻¹ de EMS (36,563 y $76,521 \times 10^5$ cél. mL⁻¹).
- La concentración de 1,5 g kg⁻¹ de EMS ocasiona mayor resistencia de *C. caementarius* en relación al número de bacterias, incremento de NTH y NDH, supervivencia y la actividad PO.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio con diferentes estadios de muda en adultos de *C. caementarius* para determinar los momentos de mayor efectividad del EMS ante la infección con *Aeromonas* sp.
- Evaluar el efecto del extracto metanólico con otras especies de macroalgas del litoral de Ancash, determinando el NTH, NDH, actividad fenoloxidasa y la mortalidad de *C. caementarius* bajo parámetros similares al presente trabajo de investigación.
- Emplear extracto metanólico de *Spatoglossum* sp suplementado en dietas con otros estados del desarrollo de *C. caementarius* y evaluar diversos parámetros inmunológicos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acleto, C. 1973. Las algas marinas en el Perú. *Boletín de la Sociedad Peruana de Botánica*. 6:1-164.
- Aguirre, G.; J. Sánchez, A. Campa & A. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune System. *Review Articles*. 39(3):205-215.
- Azañero, C.; W. Reyes; H. Luján; R. Oviedo & F. Saucedo. 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. 774-781pp. <<http://www.civa2006.org>>. Accesado: 16 de noviembre del 2013.
- Bachere, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish & Shellfish Immunology*. 5:597-612.
- Bahamonde, N. & I. Vila. 1971. Sinopsis sobre la biología del camarón de río del norte. *Biol. Pesquera, Chile*. 5:3-60.
- Baticadas, M.; R. Coloso & R. Duremdez. 1986. Studies on the chronic soft shell syndrome in the tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricus, from brackish water ponds. *Aquaculture*. 56(3-4):271-285.
- Bo, L.; F. Lu; X. Wei & R. Zhao. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules*. 13:1671-1695.
- Bowie, A. & L. O'Neill. 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.
- Brookman, J.; N. Ratcliffe & A. Rowley. 1989. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insect by bacterial cell wall component. *Insect Biochem*. 19:47-57.
- Brock, J.A. & K.L. Main. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. 242p.
- Campa, A., A. Hernández, F. Ascencio & G. Aguirre. 2010. Respuesta inmune y antioxidante en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuesto a inmunoestimulantes y probióticos. Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, México, 567-587 p.
- Campa, A., N. Hernandez; G. Aguirre & F. Ascencio. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa (MnSOD) en juveniles de

- camaron blanco *Litopenaeus vannamei* expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas*. 31(4):661-669.
- Cavalcante, F.; J. Gurgel; V. Martins; A. Holanda & W. Lobo. 2007. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. *Revista Ciência Agronômica*. 38(1):58-63.
- Cardenas, W & J. Dankert. 1997. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkia*. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 283–295
- Cedeño, R. & J. Rodríguez. 2006. Aplicación de probióticos y β -1,3 glucanos en larvicultura de *Litopenaeus vannamei* previo a su siembra en piscinas de cultivo. *CENAIM INFORMA*. Boletín informativo N° 135. San Pedro, Ecuador. 2p.
- Celso, D. 2000. Biochemical responses en penacid caused by contaminats. *Aquaculture*. 191:163-168.
- Cerenius, L., P. Jiravanichpaisal., H. Liu & I. Soderhall. 2010. Crustacean immunity. In *Invertebrate Immunity*. 239-259 pp.
- Chang, H.; C. Chung & G. Kou. 1996. Numerical taxonomy of bacteria isolated from the hepatopancreas of giant tiger prawn, *Penaeus monodon*; fleshy prawn, *P. chinensis* and their culture water. *Journal of the fisheries Society of Taiwan*. 23(2):117-136.
- Cheng, W.; H. Chieu; C. Tsai & J. Chen. 2005. Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shell. Immunol.* 19:375-385.
- Cheng, W., F. M. Juang., J.T. Li, M.C. Lin, C.H.Liu & J.C. Chen. 2003. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garviae* in relation to the moult stage. *Aquaculture* Vol. 218:34-45.
- Chisholm, J. R., & V. J. Smith. 1995. Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 110(1), 39-45.
- Chotigeat, W.; T. Suprapa; K. Supamataya & A. Phongdara. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture Research*. 233:23-30.
- Chotikachinda, R.; W. Lapjatupon; S. Chaisilapasung; D. Sangsue & C. Tantikitti. 2008. Effect of inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30(6):687-692.
- Conroy, D. & G. Conroy. 1990. **Manual de Patología de los Camarones Peneidos**. 2da. Edic. Edit. Comercial Rivero. Maracay, Venezuela. 197 pp.

- Dehaske, M.; I. Van Assche & B. Deberse. 1998. Evaluación de los efectos de la administración oral de inmunoestimulantes en las enfermedades de especies para la acuicultura. Inve Aquaculture Nv. Bélgica. *In: Avances en Nutricional Acuícola III*. 403-422pp.
- Fagutao, F., H. Kondz., T. Aoki & I. Hirono. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp, pp. 171-176. *In* Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. and Aoki, T. (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia. 385 pp
- Felix, S.; P. Herald-Robins & A. Rajeev. 2004. Immune enhancement assessment of dietary incorporated marine algae *Sargassum wightii* (Phaeophyceae / Punctariales) in tiger shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea / Penaeidae) through prophenoloxidase (proPO) systems. *Indian J. Mar. Sci.* 33:361-364.
- Ferdinand, R.; K. Haruka; H. Thanh; F. Raafat; A. Laining; S. Yokoyama; M. Ishikawa; S. Koshio; A. Serrano & V. Serrano. 2010. Influence of Dietary Fucoidan Supplementation on growth and immunological response of juvenile *Marsupenaeus japonicas*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41(2):235-244.
- Flores, C. 2010. Efecto de inmunoestimulantes de origen microbiano en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) infectado experimentalmente con *vibrio* sp. Tesis doctoral. Instituto politécnico nacional. Sinaloa. 48p.
- Fonseca, E.; R. González & R. Rico. 2013. Sistema inmune de los camarones. *Revista AquaTIC*.38: 68-84.
- Fonseca, E. 2010. Erosión Bacteriana del Caparazón en el camarón *Penaeus vannamei* (Bacterial Erosion of the Shell in the species of shrimp *Penaeus vannamei*). Departamento de Morfo - Fisiología, Facultad de Medicina. Veterinaria, Universidad de Granma. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 11(5):1-6.
- Fontaine, C. T., & D. V .Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. *Mar. Fish. Rev*, 37(5-6), 4-10.
- Fukushima, M.; G. Sifuentes, G. Saldaña, G. Castillo, J. Reyes & L. Shimokawa. 1982. Métodos limnológicos. Dpto. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Del Santa. Peru. 32p.
- Ghaednia, B.; M. Mehrabi; M. Mirbakhsh; V. Yeganeh; P. Hoseinkhezri; G. Garibi & A. Ghaffar Jabbari. 2011. Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Fisheries Sciences* 10(4) 616-630.
- Gelibolu, B., C. Tureli., & A. Sahan. 2009. Determination of haemocytes amount and haemocytes types in mature blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896) captured in Akyatan Lagoon (Karatat/Adanaturkey). *Journal of Fisheries Sciences*, 3(3), 181-186.

- Gómez, B., A. Roque & A. Guerra. 2000. Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. n: Páez-Osuna F. Edit. Camaronicultura y Medio Ambiente UNAM 452p. 14:315-346pp.
- Gopa, L.; S. Otta; S. Kumar; L. Karunasagar; M. Nishibuchi & L. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* 102:151-159.
- Guadalupe, R. 1985. Ensayos en cultivo masivo de larvas de camarón de río *Cryphiops caementarius*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria de La Molina. Lima, Perú. 72p.
- Gupta, S. & N. Abu-Ghannam. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology.* 22:315-326.
- Hernández, J., T. Gollas & F. Vargas. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 61–66.
- Hernández, N. 1993. Determinación de la actividad antibiótica de algunas algas de las costas de Jalisco y Colima. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. 28p.
- Hipolito, M., L. Baldasi, D. Pires, J. Lombardi. 1996. Prevalencia bacteriana em necrose de camarao de agua doce (*Macrobrachium rosenbergii*, Decapode, Palaemonidae). *B. Inst. Pesca, Sao Paulo, Vol. 23 (Único):* 13-20.
- Hose, J., G. Martin, S. Tiu & N. McKrell. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. *Biological Bulletin*, 183:185–199p.
- Hose, J.; G. Martin & A. Gerard. 1990. A decapod haemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. *Biol. Bull. Woods Hole.* 178:33-45.
- Janda, J. 1991. Recent advances in the study of taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Rev.* 4:397-410.
- Jiravanichpaisal, P.; B. Lee & K. Söderhäll. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immuno-biology.* 211:213-236.
- Johansson, M.; W. Keyser; K. Srintunyalucksana & K. SöderHäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191:45-52.
- Johnson, S. 1995. Handbook of Shrimp Diseases. *World Aquaculture Society.* 90-601.

- Jussila, J.; S. Mc Brdide; J. Yago & L. Evans. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panilirus cygnus* George). *Aquaculture*. 191:287-301.
- Jussila, J. 1997. Physiological Responses of Astacid and Parastacid Crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Doctoral dissertation. Department of Applied Zoology & Veterinary Medicine. University of Kuopio. Perth, Western Australia.
- Kakoolaki, S.; I. Sharifpour; M. Soltani; H. Ebrahimzadeh; S. Mirzargar & M. Rostami. 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 9(2) 219-232.
- Lemaire, P.; E. Bernad; J. Martinez & L. Chim. 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and sub adult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 209:307-317.
- Le Moullac, G., De Laborie, L.P., Saulnier, D., Goarant, C., Dehasque, M. 1998. Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. Páginas 1-12 in R.C. Cerecedo, B.M Claudia J. Perez Estrada, L. E. Cruz Suarez and D. Ricque Marie (editores), *Avances de Nutrición Acuicola*. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, La Paz, B.S.C., México.
- Lewis, D.; T. Leung & C. Mock. 1982. Aggregation of Penaeid shrimp larvae due to microbial epibionts. *Aquaculture*. 27(2):149-154.
- Lignot, J.; C Spanings & G. Charmatiet. 2000. Osmoregulatory capacity as toll in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191:209-245.
- Lin, C.; K. Hu; S. Ho & Y. Song. 2006. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. *Developmental and Comparative Immunology*. 30:1132-1144.
- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Cerenius, L., Lee, B. L., Söderhäll, I., & Söderhäll, K. (2007). Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 593-598.
- Lightner, D. V. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In *CRC Handbook of Mariculture*, 2nd edn, vol. 1, Crustacean Aquaculture. 393-486 pp.
- Magallanes, C.; C. Córdova & R. Orozco. 2003. Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. Peru. Biol.* 10(2):125- 132.
- 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 para Obtener el Grado de Magister en Ciencias. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador. 122p.

- Manilal, A.; S. Sujith; J. Selvin; G. Seghal & C. Shakir. 2009. In vivo Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 1(4):278-282.
- Martin, G.; D. Poole; C. Poole; J. Hose; M. Arias; L. Reynolds; N. McKrell & A. Whang. 1993. Clearance of bacterial injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.* 62:308-315.
- Martin, G.G., & J.E, Hose. 1992. Vascular Elements and Blood (Hemolymph). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 10: 117-146.
- Matozzo, V., & M, Marin. 2010. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey. *Fish & shellfish immunology*, 28(4), 534-541.
- McKay, D. & C. Jenkins. 1970. Immunity in the invertebrates: Correlation of the phagocytic activity of haemocytes with resistance to infection in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 48:609-617.
- Meruane, J.; M. Morales; C. Galleguillos; M. Rivera & H. Hosokawa. 2006. Experiencias y resultados de investigaciones sobre el camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (molina 1782) (decapoda: palaemonidae): Historia natural y cultivo. *Gayana*. 70(2):280-292.
- Modesto, J. 1997. Evaluación biológica del camarón de río (*Cryphiops caementarius*) en el Río Sama con fines de protección. Universidad Nacional Jorge Basadre Groiimann. Facultad de Ingeniería Pesquera. Tacna, Perú. 20p.
- Montesdeoca, M.; Y. Amano; F. Echevarria; I. Betancour; F. Panchana; M. Sotomayor & J. Rodríguez. 2002. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de enfermedad de los estanques. *El Mundo Acuícola*. 8(1):38-42.
- Morales, M.C. 1997. Desarrollo larval del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea: Decapoda) en laboratorio. Tesis para optar al Título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Católica del Norte. Antofagasta, Chile. 114p.
- Morales, V. & J. Cuéllar-Anjel. 2008. Guía técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos. Edit. New Concept Publications, Inc. Programa CYTED Red II-D Vannamei. Rep. de Panamá. 274p.
- Muñoz, M. 2006. Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas Colectadas en baja california sur, México. Tesis

para obtener el grado de maestro en ciencias en manejo de recursos marinos. Instituto Politécnico Nacional.

- Muñoz, M.; R. Cedeño; J. Rodríguez; W. Van der Knaap; E. Mialhe & E. Bachere. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191:89-107.
- Norambuena, R. 1977. Antecedentes biológicos de *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) en el estero "El Culebrón" (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). *Biol. Pesq. Chile*. 9:7-19.
- Parmar, P. V., Murthy, H. S., Tejpal, C. S., & B.N, Kumar. 2012. Effect of brewer's yeast on immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its resistance to white muscle disease. *Aquaculture International*, 20(5), 951-964.
- Ponce, J.; R. González; O. Romero.; I. Febrero; J. Arredondo.; H. Esparza. & G. García-Ulloa. 2005. Enfermedades del camarón de agua dulce *Macrobrachium tenellum* y *M. rosenbergii* durante el cultivo comercial en estanques rústicos, en empresas rurales. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*. 6(12):1-12.
- Ranjit, N.; R. Prakash; S. Jadhao; R. Kumar; K. Kumar & G. Dash. 2012. Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture International*. 15(5): 1-19.
- Rendón, L. & J. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, N°19. <<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=158>>. Accedido: 16 de noviembre del 2013.
- Reyes, W & H.Lujan.2003.Estados y subestados del ciclo de muda del camarón de río (*Cryphiops caementarius* Molina, 1872) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) en laboratorio. *CIVA 2003*. [Disponible en URL: <http://www.civa2003.org>]. (Consultado el 24 de Setiembre 2011).
- Reyes, WE. 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.
- Ríos, N.; G. Medina; J. Jiménez; C. Yáñez; M. García; M. Di Bernardo & M. Gualtieri. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Peru. Biol.* 16(1):97-100.
- Rivera, G.; F. Yoong; G. Riofrío; B. Reinoso; F. Hurtado & P. Massuh. 2002. Inclusión de harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para camarón. *CIVA 2002*, I Congreso Internacional Virtual de Acuicultura. 244-252pp.
- Rivera, M.; J. Meruane & R. Gil. 1987. Effects of salinity and food on larval survival and metamorphosis on *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea:

- Palaemonidae). *Reports of the Usa Marine Biological Institute, Kochi University*. 9:207-214.
- Rocha, G. L. 1985. Cultivo de larvas de camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) en laboratorio con alimento vivo. Tesis para optar al título de Ingeniero Pesquero. Fac. Pesqueras. Universidad Nacional Agraria de La Molina. Lima, Perú. 49p.
- Rodriguez, J. & G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119.
- Rojas, A.; M. Haws & A. Cabanillas. 2005. Buenas prácticas de manejo para el cultivo de camarón. Prácticas de desarrollo sostenible en ambientes costeros de prioridad de los ecosistemas del Golfo de California. The David and Lucile Packard Foundation. United States Agency for International Development (Cooperative Agreement No. PCE-A-00-95-0030-05). 51p.
- Rondon, I. 2004. Inmunoestimulantes en medicina y veterinaria. *Orinoquia*. 8(2):56-75.
- Rosas, C.; C. Pascual; N. López & A. Sánchez. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. *En: VI Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.
- Sahoo, P.; B. Pillai; J. Mohanty; J. Kumari; S. Mohanty & B. Mishra. 2007. *In vivo* humoral and cellular reactions, and fate of injected bacteria *Aeromonas hydrophila* in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 23:327-340.
- Sanzana, J. & P. Báez. 1983. Desarrollo larvario de *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) en condiciones de laboratorio (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult.* 5(2): 347-353.
- Sánchez, L., F. Díaz, A. Licea, A. Re, M. Lizárraga, M. Flores, R. González & C. Tordoya. 2010. Effect of hydrosoluble polysaccharides of *Macrocystis pyrifera* on physiological and metabolic responses of *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio campbellii*. *Hidrobiológica* 20 (3): 246-255.
- Selvin. J.; A. Manila; S. Sujith; G. Seghal; G. Kiran & A. 2011. Premnath. Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 39(2): 197-204.
- Setchell, W. A. & N. L. Gardner. 1924. Expedition of the California Academy of Sciences to the Gulf of California in 1921. The marine algae. *Proceedings California Academy of Sciences Ser. 4*. 12:695-949.
- Scholz, U.; G. Garcia; D. Ricque; L. Cruz; F. Vargas & J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 176(3-4):271-283.

- Sinderman, C. & D. Lightner. 1988. Diseases Diagnosis and control in North American Marine aquaculture. *Deveop Aqua Fish Sci*, 17. Elsevier, Amsterdan, 431p.
- Smith, V & K. Söderhäll. 1983. β -1,3 Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and *in vivo*. *Biol. Bull.* 164:299-314.
- Smith, V.; J. Brown & C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection. *Fish Shellfish Immunol.* 15:71-90.
- Söderhall, K. & L. Hall. 1984. Lipopolysaccharide induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta.* 797:99-104.
- Srithunyalucksana, K.; W. Gangnonngiw & S. Archakunkorn. 2005. Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Disease of Aquatic Organisms.* 63:89-94.
- Sung, H. & Y. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture.* 145:41-54.
- Sung, H.; H. Chang; C. Her; J. Chang & Y. Song. 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol.* 71:26-33.
- Sung, H.; P. Kou & W. Kao. 2000a. Effect of lipopolysaccharide on *in vitro* phagocytosis by hemocytes from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Fish Pathol.* 35(3):109-116.
- Sung, H.; S. Hwang & F. Tasi. 2000b. Responses of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to Challenge by Two Strains of *Aeromonas* spp. *Journal of Invertebrate Pathology.* 76:278-284.
- Sung, H.; Y. Yang & Y. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crustacean Biol.* 16:278-284.
- Suphantharika, M.; P. Khunrae; P. Thanardkit & C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewers yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bioresources Technol.* 88:55-60.
- Takahashi, Y.; K. Uehara; R. Watanabe; T. Okumura; T. Yamashita; H. Omura; T. Yomo; T. Kawano; A. Kanemitsu; H. Narasaka; N. Suzuki & T. Itami. 1988. Efficacy of Oral Administration of Fucoidan, a Sulfated Polysaccharide, in Controlling White Spot Syndrome in Kuruma Shrimp in Japan. *In: Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology.* National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. 171-173pp.

- Taylor, W.R. 1960. Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coast of the Americas. University of Michigan Press, Ann Arbor, and Ambassador Books Ltd. Toronto, U.S.A. 870p.
- Traifalgar, R.; V. Corre & A. Serrano. 2013. Efficacy of Dietary Immunostimulants to Enhance the Immunological Responses and Vibriosis Resistance of Juvenile *Penaeus monodon*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 8:340-354.
- Trujillo, T.; G. Aguirre-Guzmán; J. Genaro Sánchez & J. Rábago-Castro. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia y Mar*. IX(27):11-18.
- Tyson, C. & C. Jenkins. 1973. The importance of opsonic factors in the removal of bacteria from the circulation of the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51:609-615.
- Van de Braak K. 2002a. *Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon)*. Tesis PhD. Wageningen Institute of Animal Sciences, The Netherlands.
- Van de Braak, C., M. Botterblom., E. Huisman., J. Rombout & W. Van der Knaap. 2002b. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.* 51:149– 55.
- Vanderzant, C.; R. Nickelson & P. Judkins. 1971. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Applied Microbiol.* 21:916-921.
- Vargas, F. & G. Yepiz. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191:13-21.
- Vázquez, L.; A. Pérez; D. Millán; C. Agundis; G. Martin; E. Cooper & E. Zenteno. 1997. Morphological analysis of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Morphology*. 234:147-153.
- Vázquez, L.; C. Sierra; S. Juarez; C. Agundis; A. Zavala & E. Centro. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *INTERCIENCIA*. 23(6):344-348.
- Viacava, M.; R. Aitken & J. Llanos. 1978. Estudio del camarón en el Perú. *Bol. Inst. Mar del Perú*. 3(5):165-232.
- Walger, P.; V. Martins; J. Ariéviló; G. Rodrigues; J. Sousa & W. Ronald. 2009. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. *Revista Ciência Agronômica*. 40(1):79-85.
- Win Fu, y.; W. Ying Hou, S. Tuen Yeh, C. Hsia Li & J. Chu Chen. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 673-685.

- Xionghui ,L. & I. Söderhäll. 2011. Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines
bloodjournal.24:6417-6424.
- Yasuda, K. & T. Kiyao. 1980. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*. 193(3):229-234.
- Zacarías, S. & V. Yépez. 2007. Monitoreo poblacional de camarón de río estimación de abundancia de adultos en ríos de la costa centro sur. Instituto del Mar del Perú, Dirección de Investigaciones en Acuicultura, Gestión Costera y Aguas Continentales - Unidad de Investigaciones en Recursos de Aguas Continentales. Informe Anual 2007. Callao, Perú. 34p.

VIII. ANEXOS



Anexo 1. Transporte de *C. caementarius* en envases de plástico dentro de Cajas y Bidones



Anexo 2. Aclimatación de *C. caementarius* en el laboratorio de Acuarística de la UNS.



Anexo 3. Selección de adultos de *C. caementarius*.



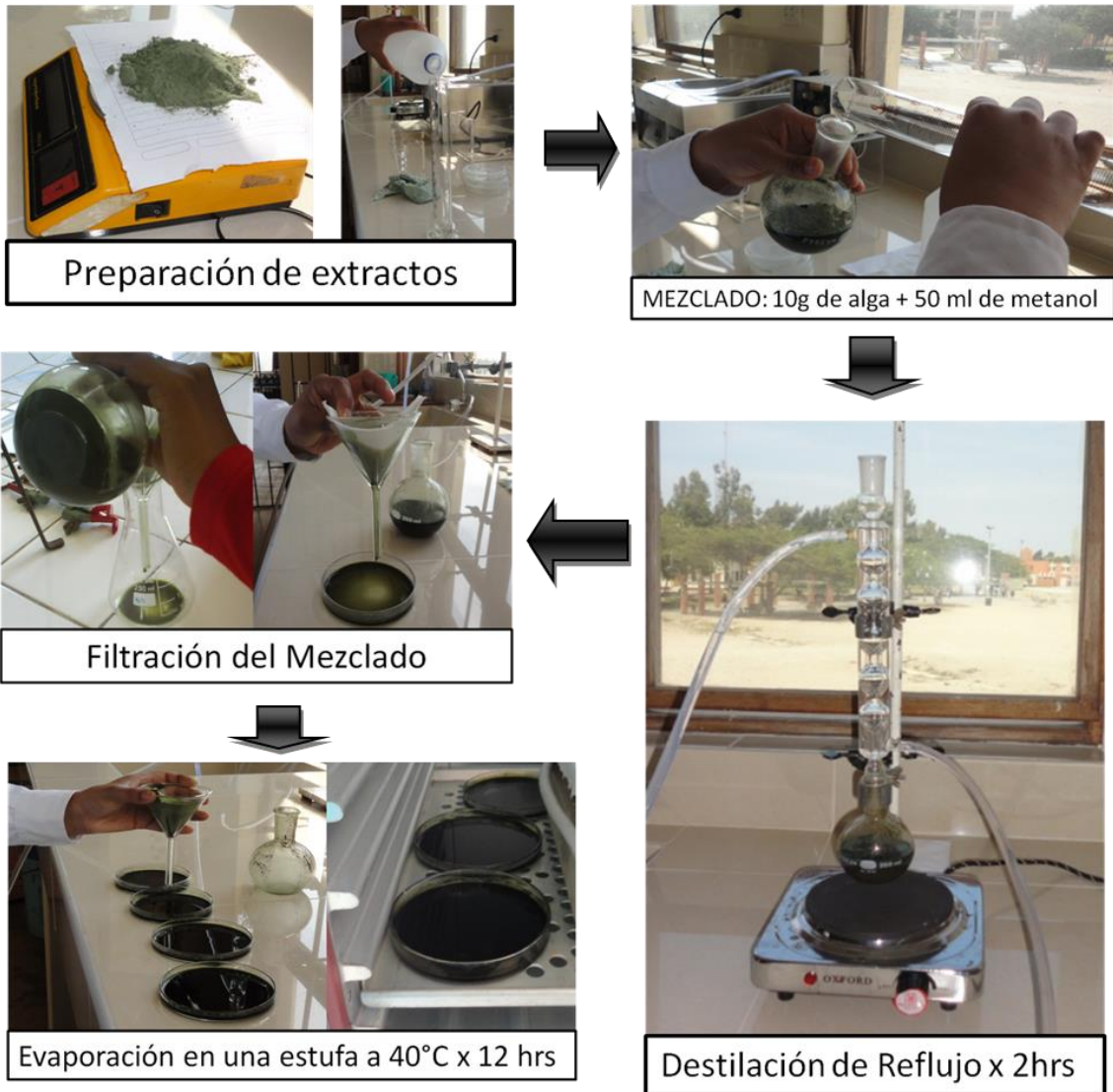
Anexo 4. Siembra de camarones adultos de *C. caementarius* asignados a los diferentes tratamientos.



Anexo 5. Sistema de crianza individual dentro de los acuarios.



Anexo 6. Macroalgas recolectadas en playa Tortugas.



Anexo 7. Flujograma de la preparación del extracto metanólico de *Spatoglossum* sp.



Anexo 8. Peletización del alimento balanceado.



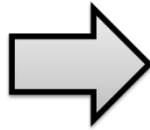
Anexo 9. Secado del alimento balanceado a temperatura ambiente.



Anexo 10. Toma de muestra de hemolinfa del seno ventral en la base del quinto periópodo de *C. caementarius*.



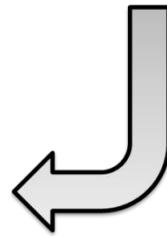
Se extrajo 20 μ L hemolinfa



Se adicionó a un microtubo conteniendo 80 μ L de solución Alsever



Se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Leica DM LS2



Anexo 11. Flujoograma del procedimiento para la determinación hemocitos.



Anexo 12. Evaluación de la concentración mínima letal de bacterias.



Anexo 13. Activación de la bacteria *Aeromonas* sp.



Suspensión en solución salina fisiológica estéril



Se determinó la concentración de UFC mL⁻¹ mediante turbidimetría (Tubo n° 3)

Anexo 14. Preparación del inóculo bacteriano a partir de cultivos activados.



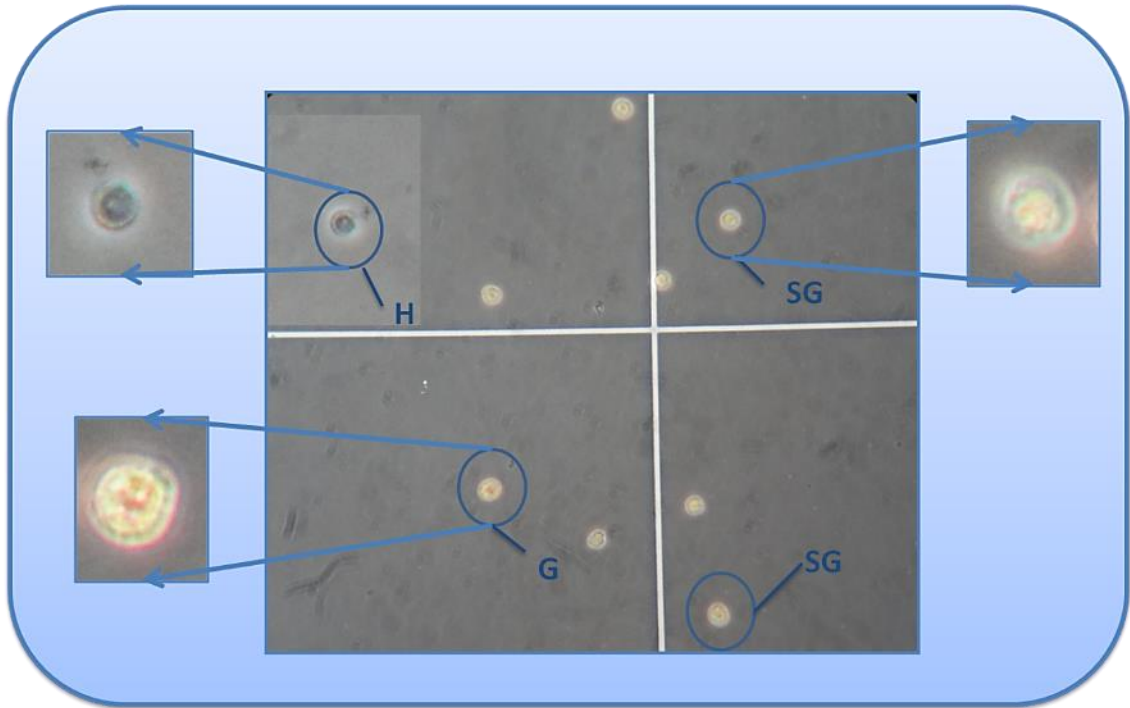
Anexo 15. Sistema de cultivo individual durante la infección.



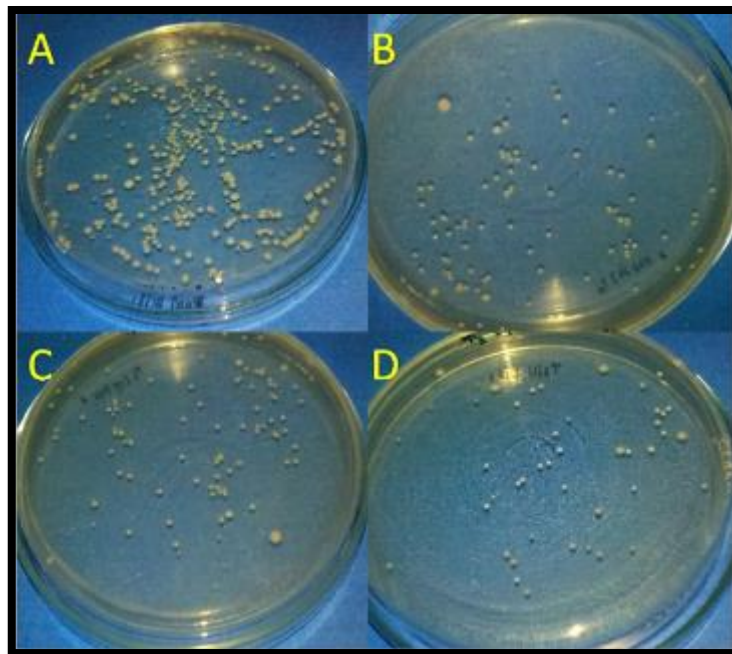
Anexo 16. Inoculación de la suspensión de células viables de *Aeromonas* sp.



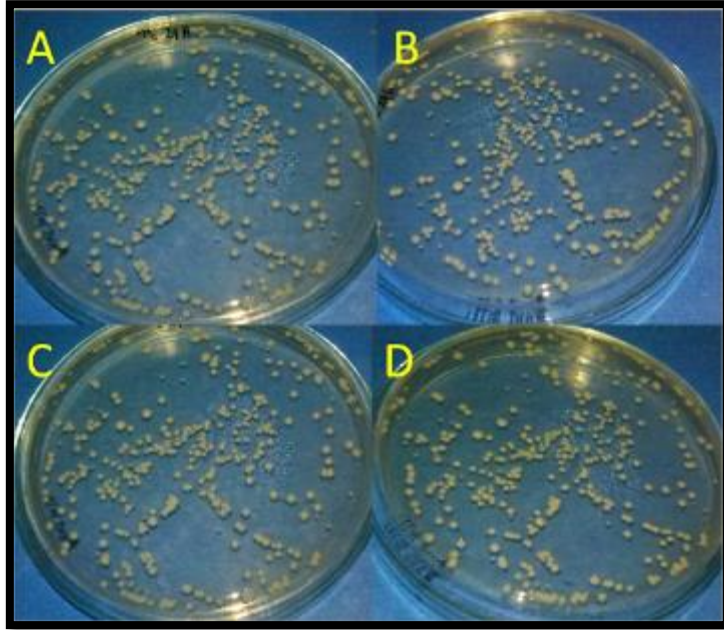
Anexo 17. Siembra de la hemolinfa en placas de agar TSA.



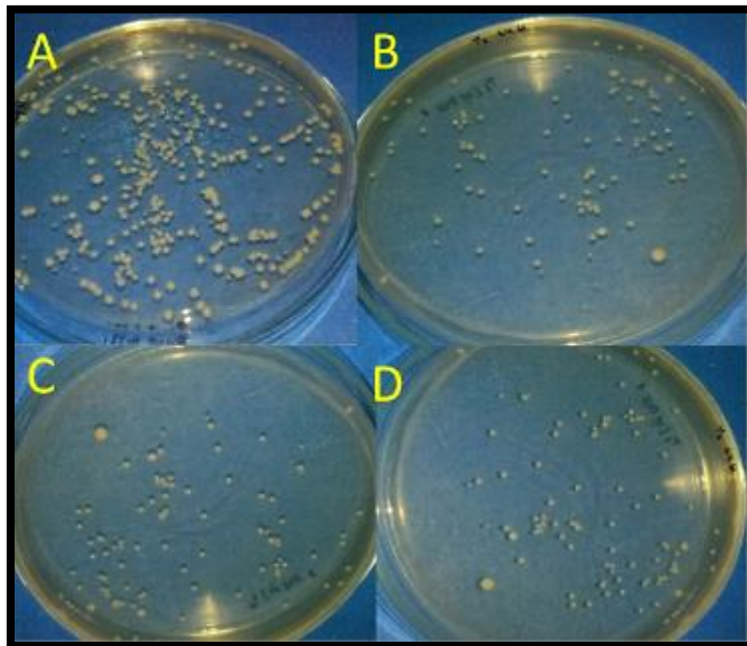
Anexo 18. Hemocitos de machos adultos de *C. caementarius*. Microscopia de Luz convencional de contraste de fases. Hemocitos granulosos (G), hemocitos semigranulosos (SG) y hemocitos hialinos (H). 40X.



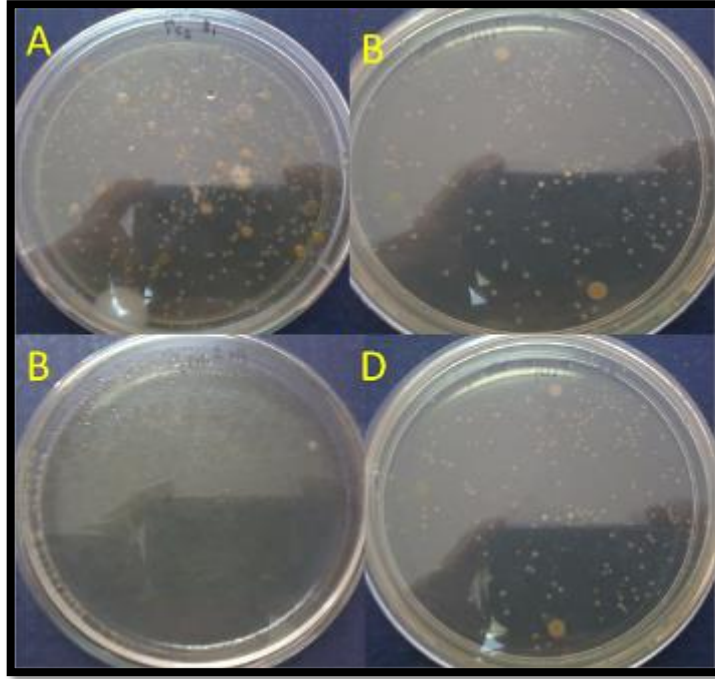
Anexo 19. Colonias de bacterias en agar TSA a 12 h de la infección. **A:** 0 (Control), **B:** 1,0 g kg⁻¹, **C:** 1,5 g kg⁻¹, **D:** 2,0 g kg⁻¹.



Anexo 20. Colonias de bacterias en agar TSA a 24 h de la infección. **A:** 0 (Control), **B:** 1,0 g kg⁻¹, **C:** 1,5 g kg⁻¹, **D:** 2,0 g kg⁻¹.



Anexo 21. Colonias de bacterias en agar TSA a 48 h de la infección. **A:** 0 (Control), **B:** 1,0 g kg⁻¹, **C:** 1,5 g kg⁻¹, **D:** 2,0 g kg⁻¹.



Anexo 22. Colonias de bacterias en agar TSA a 72 h de la infección. **A:** 0 (Control), **B:** 1,0 g kg⁻¹, **C:** 1,5 g kg⁻¹, **D:** 2,0 g kg⁻¹.

Anexo 23. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de machos adultos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS.

TIPO DE HEMOCITO	EMS (g kg ⁻¹)	N° DÍAS		
		0	15	30
G	CONTROL (0)	6,979 ±0,320 ^a	5,000 ±0,657 ^b	5,875 ±1,126 ^{ab}
	1,0	6,979 ±0,320 ^a	5,146 ±0,644 ^b	6,167 ±1,060 ^{ab}
	1,5	6,979 ±0,320 ^c	10,708 ±1,036 ^b	12,104 ±1,171 ^a
	2,0	6,979 ±0,320 ^b	9,000 ±0,932 ^a	5,750 ±0,894 ^c
SG	CONTROL (0)	19,125 ±0,536 ^b	21,875 ±0,908 ^a	21,438 ±1,565 ^a
	1,0	19,125 ±0,536 ^c	30,688 ±1,224 ^b	36,563 ±0,879 ^a
	1,5	19,125 ±0,536 ^c	68,563 ±1,030 ^b	93,167 ±1,855 ^a
	2,0	19,125 ±0,536 ^c	49,583 ±2,238 ^b	76,521 ±1,026 ^a
H	CONTROL (0)	1,688 ±0,282 ^a	1,313 ±0,190 ^a	1,896 ±0,668 ^a
	1,0	1,688 ±0,282 ^a	1,458 ±0,323 ^{ab}	1,167 ±0,129 ^b
	1,5	1,688 ±0,282 ^b	2,708 ±1,002 ^a	2,208 ±0,065 ^{ab}
	2,0	1,688 ±0,282 ^b	3,729 ±1,008 ^a	1,125 ±0,112 ^b
NTH	CONTROL (0)	27,792 ±0,631 ^b	28,188 ±0,710 ^{ab}	29,208 ±1,128 ^a
	1,0	27,792 ±0,631 ^c	37,292 ±0,828 ^b	43,896 ±1,426 ^a
	1,5	27,792 ±0,631 ^c	81,979 ±1,880 ^b	107,479 ±2,322 ^a
	2,0	27,792 ±0,631 ^c	62,313 ±1,262 ^b	83,396 ±1,833 ^a

Promedio ± desviación estándar

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa (p<0,05)

G: Granulocitos; SG: Semigranulocitos; H: Hialinos; NTH: Número total de hemocitos

Diferencias significativas de las concentraciones en relación a los días

Anexo 24. Número total (NTH) y diferencial (NDH) de hemocitos de *C. caementarius* alimentados durante 30 días con diferentes concentraciones de EMS, a las 12; 24; 48 y 72 h después de la infección con *Aeromonas* sp.

TIPO DE HEMOCITO	EMS (g kg ⁻¹)	N° HORAS			
		12	24	48	72
G	CONTROL (0)	1,042 ±0,072 ^{ab}	1,000 ±0,000 ^b	1,083 ±0,072 ^{ab}	1,167 ±0,072 ^a
	1,0	1,000 ±0,125 ^b	1,083 ±0,191 ^{ab}	1,042 ±0,072 ^b	1,417 ±0,144 ^a
	1,5	1,042 ±0,072 ^c	1,208 ±0,072 ^c	2,292 ±0,072 ^b	4,375 ±0,125 ^a
	2,0	1,000 ±0,000 ^c	1,167 ±0,191 ^c	1,833 ±0,072 ^b	2,875 ±0,000 ^a
SG	CONTROL (0)	1,417 ±0,191 ^{ab}	1,375 ±0,217 ^{ab}	1,250 ±0,125 ^b	1,750 ±0,000 ^a
	1,0	1,250 ±0,000 ^c	1,417 ±0,072 ^c	1,750 ±0,000 ^b	2,500 ±0,217 ^a
	1,5	2,125 ±0,250 ^c	2,458 ±0,591 ^c	6,333 ±0,191 ^b	16,000 ±0,250 ^a
	2,0	1,375 ±0,125 ^c	1,583 ±0,144 ^c	4,625 ±0,125 ^b	8,292 ±0,191 ^a
H	CONTROL (0)	1,083 ±0,144 ^a	1,000 ±0,000 ^a	1,083 ±0,072 ^a	1,167 ±0,072 ^a
	1,0	1,042 ±0,072 ^a	1,083 ±0,072 ^a	1,125 ±0,125 ^a	1,167 ±0,072 ^a
	1,5	1,042 ±0,072 ^b	1,167 ±0,191 ^b	1,417 ±0,260 ^b	2,292 ±0,260 ^a
	2,0	1,125 ±0,125 ^b	1,208 ±0,144 ^b	1,292 ±0,072 ^b	1,708 ±0,144 ^a
NTH	CONTROL (0)	3,542 ±0,191 ^b	3,375 ±0,217 ^b	3,417 ±0,191 ^b	4,083 ±0,144 ^a
	1,0	3,292 ±0,144 ^c	3,583 ±0,144 ^{bc}	3,917 ±0,144 ^b	5,083 ±0,260 ^a
	1,5	4,208 ±0,315 ^c	4,833 ±0,564 ^c	10,042 ±0,144 ^b	22,667 ±0,591 ^a
	2,0	3,500 ±0,250 ^c	3,958 ±0,260 ^c	7,750 ±0,125 ^b	12,875 ±0,331 ^a

Promedio ± desviación estándar

Las diferentes letras por fila denotan diferencia significativa (p<0,05)

G: Granulocitos; SG: Semigranulocitos; H: Hialinos; NTH: Número total de hemocitos

Diferencias significativas entre las horas en relación a las horas

Anexo 25. Longitud total (cm), peso (g), observación de los estados de muda, Promedio y desviación estándar, de *C. caementarius* – grupo control (0).

CONTROL (0)					
N° de Repeticiones	N° de Organismos	Longitud total (cm)	Peso Total (g)	Estado de Muda	Observaciones
R1	1	5,4	4,4	C	Color caramelo y con dos quelas
	2	5,3	4,8	C	Color caramelo y con dos quelas
	3	4,8	4,0	C	Color caramelo y con dos quelas
	4	5,2	4,3	C	Color caramelo y con dos quelas
	5	5,9	5,1	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	6	5,5	6,6	D ₀	Color caramelo y con dos quelas
R2	7	5,2	4,3	C	Color caramelo y con dos quelas
	8	5,4	5,2	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	9	5,6	6,6	C	Color caramelo y con dos quelas
	10	6,3	6,8	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	11	6,5	7,1	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	12	6,8	7,2	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
PROMEDIO		5,64 ± 0,56	5,53 ± 1,22		

Anexo 26. Longitud total (cm), peso (g), observación de los estados de muda, Promedio y desviación estándar, de *C. caementarius* – T1.

T1 (1,0)					
N° de Repeticiones	N° de Organismos	Longitud total (cm)	Peso Total (g)	Estado de Muda	Observaciones
R1	1	5,5	5,3	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	2	5,6	5,4	C	Color caramelo y con dos quelas
	3	5,3	4,8	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	4	5,3	4,6	C	Color caramelo y con dos quelas
	5	6,1	5,1	C	Color caramelo y con dos quelas
	6	5,6	5,4	C	Color caramelo y con dos quelas
R2	7	5,3	4,6	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	8	6,1	6,9	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	9	5,6	5,0	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	10	6,4	6,9	C	Color caramelo y con dos quelas
	11	6,2	6,8	C	Color caramelo y con dos quelas
	12	5,5	6,2	C	Color caramelo y con dos quelas
PROMEDIO		5,68 ± 0,37	5,64 ± 0,91		

Anexo 27. Longitud total (cm), peso (g), observación de los estados de muda, Promedio y desviación estándar, de *C. caementarius* – T2.

T2 (1,5)					
N° de Repeticiones	N° de Organismos	Longitud total	Peso Total	Estado de Muda	Observaciones
R1	1	4,9	4,6	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	2	5,3	4,4	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	3	5,9	6,1	C	Color caramelo y con dos quelas
	4	5,7	5,6	C	Color caramelo y con dos quelas
	5	6,0	6,8	C	Color caramelo y con dos quelas
	6	5,2	4,3	C	Color caramelo y con dos quelas
R2	7	5,6	4,3	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	8	5,4	4,8	D	Color caramelo y con dos quelas
	9	5,6	4,9	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	10	5,3	4,6	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	11	6,6	4,8	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	12	5,8	4,3	C	Color caramelo y con dos quelas
PROMEDIO		5,61 ± 0,44	5,15 ± 0,62		

Anexo 28. Longitud total (cm), peso (g), observación de los estados de muda, Promedio y desviación estándar, de *C. caementarius* – T3.

T3 (2,0)					
N° de Repeticiones	N° de Organismos	Longitud total	Peso Total	Estado de Muda	Observaciones
R1	1	5,7	5,3	C	Color caramelo y con dos quelas
	2	5,0	4,9	C	Color caramelo y con dos quelas
	3	5,0	4,6	C	Color caramelo y con dos quelas
	4	5,2	4,3	C	Color caramelo y con dos quelas
	5	5,8	6,2	C	Color caramelo y con dos quelas
	6	5,6	5,8	C	Color caramelo y con dos quelas
R2	7	5,6	4,5	C	Color caramelo y con dos quelas
	8	5,4	5,8	D ₀	Color caramelo y con dos quelas
	9	5,3	4,2	C	Color caramelo y con dos quelas
	10	5,4	4,4	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	11	5,7	4,7	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
	12	5,5	4,4	D ₁ '	Color caramelo y con dos quelas
PROMEDIO		5,43 ± 0,27	4,82 ± 0,64		