



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES



FACULTAD DE INGENIERÍA
PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA

TESIS DE PREGRADO

**Supervivencia y respuestas inmunitarias de juveniles
Litopenaeus vannamei mejorados genéticamente,
infectados con *vibrio* sp. y *pseudomonas* sp.**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Br. Joel David Camacho Ipanaqué

Br. Mercedes Lisset Prado Mendoza

TUMBES, PERÚ

2019



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
TUMBES**



**FACULTAD DE INGENIERÍA
PESQUERA Y CIENCIAS DEL MAR**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA**

TESIS DE PREGRADO

**Supervivencia y respuestas inmunitarias de juveniles
Litopenaeus vannamei mejorados genéticamente,
infectados con *vibrio* sp. y *pseudomonas* sp.**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO**

PRESENTADO POR:

Br. Joel David Camacho Ipanaqué

Br. Mercedes Lisset Prado Mendoza

TUMBES, PERÚ

2019

RESPONSABLES

Est. Joel David Camacho Ipanaqué

EJECUTOR

Est. Mercedes Lisset Prado Mendoza

EJECUTORA

Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Adán Alvarado Bernuy

PRESIDENTE

Dr. Leocadio Malca Acuña

SECRETARIO

Dr. Teodoro Emilio Seminario Chirinos

VOCAL

AGRADECIMIENTO

- ❖ Agradecer a Dios por darnos ese Don de seguir triunfando en nuestras vidas, y las fuerzas de seguir adelante con nuestros estudios superiores.
- ❖ A nuestros padres por su apoyo, perseverancia y confianza que siempre estuvieron ahí dándonos amor y fuerzas para seguir adelante en nuestra carrera.
- ❖ Agradecer nuestro asesor Dr. Edilberto David Saldarriaga Ayala, por brindarnos su ayuda incondicional en todo el periodo del proyecto de tesis y también a los miembros de jurados calificador: Dr. Adán Alvarado Bernuy, Dr. Leocadio Malca Acuña, Dr. Teodoro Seminario Chirino, por estar presente en el transcurso de nuestro proyecto de ejecución de tesis, y por sus recomendaciones y observaciones para mejorar nuestro proyecto de tesis.
- ❖ Agradecer a nuestra casa superior de estudio de la Universidad Nacional de Tumbes, dentro de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, por permitirnos crecer profesionalmente, con valores y moral y abrirnos las puertas para desarrollar nuestro proyecto de tesis.
- ❖ Agradecemos a la empresa Marinasol S.A, por apoyarnos a desarrollar todas las actividades correspondientes con la ejecución de nuestra tesis.
- ❖ También gracias a la coordinadora del laboratorio de Marinasol S.A, Ing. Yovani Rosales Maceda, por brindarnos su apoyo incondicional y confianza para desarrollar la tesis en todo este largo periodo.

Br. Joel

Br. Mercedes

DEDICATORIA

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios por ser quien guía mi camino y enseñándome nuevas lecciones de vida a cada día, por estar conmigo en cada paso que doy y fortalecer mi corazón, agradezco por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio (abuelos, padres, hermanos, novia).

Joel

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios por darme esa fortaleza y sabiduría de seguir adelante con mis estudios, y por estar siempre conmigo en cada paso que doy, agradecer a mis padres Eulogia M.S y José Mauro P.N, quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para que siempre siguiera adelante y siempre ser perseverante y cumplir con mis ideas formándome profesionalmente con buenos valores, a mi familia y a mi novio Enni Yoel B.P por brindarme sus apoyos incondicionales.

Mercedes

CONTENIDOS

	Página
Resumen	
Abstract	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. MATERIALES	7
3.1.1. Material biológico	7
3.1.2. Equipos	7
3.1.3. Insumos	7
3.1.4. Material de oficina	7
3.2. MÉTODOS	
3.2.1. Ubicación del lugar de la investigación	8
3.2.2. Tipo y diseño de investigación	8
3.2.3. Población y muestra	9
3.2.4. Acondicionamiento del laboratorio	9
3.2.5. Aclimatación y siembra de juveniles.	10
3.2.6. infección de los ejemplares	10
3.2.7. obtención de hemolinfa	10
3.2.8. supervivencia de juveniles	10
3.2.9. Alimentación de juveniles	
3.2.10. Recambio de agua	11
3.2.11. Diseño experimental estadístico	11
3.2.12. Procesamiento y análisis de datos	12
IV. RESULTADOS	13
V. DISCUSIÓN	22
VI. CONCLUSIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	34

TABLAS

	Pág.
1.Tabla N° 1: : Denominación de los tratamientos en la infección de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i>-	12
2.Tabla N° 2: supervivencia (%) de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> no infectados (C1 y C2) e infectados con <i>Vibrios sp.</i> (T1 y T3) y <i>Pseudomonas sp.</i> (T2 y T4).....	14
3.Tabla N° 3. Densidad de hemocitos *10 (cel./mm ³) en la hemolinfa de <i>Litopenaeus vannamei</i> no infectados (C1 y C2) e infectados con <i>Vibrios sp.</i> (T1 y T3) y <i>Pseudomonas sp.</i> (T2 y T4).....	16
4. Tabla N° 4. Tiempo de coagulación de la hemolinfa de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> no infectados (C1 y C2) e infectados con <i>Vibrios sp.</i> (T1 y T3) y <i>Pseudomonas sp.</i> (T2 y T4).	18
5.Tabla N° 5. Crecimiento poblacional de (U.F.C./mL) de colonias verdes, colonias amarillas y colonias totales en hemolinfa de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> no infectados (C1 y C2) e infectados con <i>Vibrios sp.</i> (T1 y T3) y <i>Pseudomonas sp.</i> (T2 y T4).....	20
6.Tabla N°6. Características externas de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> después de la infección con <i>Vibrio sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i>	21

FIGURAS

Pág.

1. Figura N° 1. Laboratorio de microbiología y patología. Facultad de ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Puerto Pizarro.....8
2. Figura N° 2. supervivencia (%) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrios sp.* (T1 y T3) y *Pseudomonas sp.*(T2 y T4).....14
- 3.Figura N° 3. Densidad de hemocitos *10 (cel./mm³) en la hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrios sp.* (T1 y T3) y *Pseudomonas sp.*(T2 y T4).....16
4. Figura N° 4. Tiempo de coagulación de la hemolinfa de juveniles de *Litopenaeus vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrios sp.* (T1 y T3) y *Pseudomonas sp.*(T2 y T4).
.....18
- 5.Figura N° 5. Crecimiento poblacional de (U.F.C./mL) de colonias verdes, colonias amarillas y colonias totales en hemolinfa de juveniles de *Litopenaeus vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrios sp.* (T1 y T3) y *Pseudomonas sp.*(T2 y T4).....20
- 6.Figura N°6. Características externas de juveniles de *Litopenaeus vannamei* después de la infección con *Vibrio sp.* y *Pseudomonas sp.*.....21

Supervivencia y respuestas inmunitarias de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

Joel David Camacho Ipanaqué¹, Mercedes Lisset Prado Mendoza¹ y David Edilberto Saldarriaga Yacila²

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la supervivencia y medir las respuestas inmunitarias de juveniles *Litopenaeus vannamei* infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. Se utilizaron dos grupos de 225 juveniles de *L. vannamei* de 5,00 ± 0,25 g, procedentes de laboratorio de producción de poslarvas de un programa de mejoramiento genético y ejemplares producidos en laboratorio no mejorados genéticamente, distribuidos en 18 acuarios en 40 litros de agua filtrada. La infección con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp., por separado, se realizó por inmersión, con inóculo de 50 mL de cepa pura con tres repeticiones. Los juveniles mejorados genéticamente obtuvieron mayor supervivencia ($p < 0,05$) a la infección por *Vibrio* sp. (45,33 ± 9,24 % y 2,67 ± 2,31 %, respectivamente) y a *Pseudomonas* sp. (56,00 % ± 6,93 %). El número de hemocitos fue igual para ambos grupos infectados por *Vibrio* sp. ($19,77 \times 10^3 \pm 1,62 \times 10^3$ cél./mm³ y $16,67 \times 10^3 \pm 1,65 \times 10^3$ cél./mm³), y para la infección con *Pseudomonas* sp. ($20,30 \times 10^3 \pm 1,95 \times 10^3$ cél./mm³ y $17,37 \times 10^3 \pm 1,10 \times 10^3$ cél./mm³, respectivamente). Los juveniles mejorados genéticamente infectados por *Vibrio* sp. mostraron menor ($p < 0,05$) tiempo de coagulación de hemolinfa (3,67 ± 0,58 s y 6,33 ± 1,15 s, respectivamente), y por la infección con *Pseudomonas* sp. (3,67 ± 0,58 s y 6,33 ± 0,58 s, respectivamente). Las colonias verdes de *Vibrio* sp. en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente (23,00 ± 22,52 U.F.C./mL) fueron menores ($p < 0,05$) a las encontradas en juveniles no mejorados genéticamente (252,00 ± 47,03 U.F.C./mL). Las colonias amarillas en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente fueron menores (15,00 ± 15,00 U.F.C./mL y 771,33 ± 198,94 U.F.C./mL, respectivamente). Las colonias de *Pseudomonas* sp. (116,67 ± 35,12 U.F.C./mL), en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente fueron iguales ($p > 0,05$) a las observadas en hemolinfa de juveniles no mejorados genéticamente (199,67 ± 49,94 U.F.C./mL). En ambos grupos se observaron inflamaciones en los abdómenes y en apéndices. Los juveniles de *Litopenaeus vannamei* provenientes de un programa de mejoramiento genético mostraron mayor resistencia a la infección por *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. que los no mejorados genéticamente.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, resistencia, crecimiento, supervivencia, fecundidad, respuestas inmunitarias

¹ Estudiantes de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera Acuícola de la Universidad Nacional de Tumbes

² Profesor de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Survival and immune responses of young *Litopenaeus vannamei* genetically improved, infected with *Vibrio* sp. and *Pseudomonas* sp.

Br. Joel David Camacho Ipanaqué¹, Br. Mercedes Lisset Prado Mendoza¹ y Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila²

ABSTRACT.

Key words:

The objective of the investigation was to evaluate the survival and measure the immune responses of juveniles *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio* sp. and *Pseudomonas* sp. Two groups of 225 juveniles of *L. vannamei* of 5.00 ± 0.25 g, from the laboratory of postlarvae production of a breeding program and laboratory-produced copies not genetically improved, distributed in 18 aquariums in 40 liters were used. of filtered water. Infection with *Vibrio* sp. and *Pseudomonas* sp., separately, was carried out by immersion, with an inoculum of 50 mL of pure strain with three repetitions. The genetically improved juveniles obtained greater survival ($p < 0.05$) to the infection by *Vibrio* sp. ($45.33 \pm 9.24\%$ and $2.67 \pm 2.31\%$, respectively) and to *Pseudomonas* sp. ($56.00\% \pm 6.93\%$). The number of hemocytes was the same for both groups infected by *Vibrio* sp. ($19.77 \times 10^3 \pm 1.62 \times 10^3$ cells / mm^3 and $16.67 \times 10^3 \pm 1.65 \times 10^3$ cells / mm^3), and for infection with *Pseudomonas* sp. ($20.30 \times 10^3 \pm 1.95 \times 10^3$ cells / mm^3 and $17.37 \times 10^3 \pm 1.10 \times 10^3$ cells / mm^3 , respectively). The improved juveniles genetically infected by *Vibrio* sp. showed lower ($p < 0.05$) hemolymph coagulation time (3.67 ± 0.58 s and 6.33 ± 1.15 s, respectively), and infection with *Pseudomonas* sp. (3.67 ± 0.58 s and 6.33 ± 0.58 s, respectively). The green colonies of *Vibrio* sp. in hemolymph of genetically enhanced juveniles (23.00 ± 22.52 U.F.C./mL) were lower ($p < 0.05$) than those found in juveniles not genetically improved (252.00 ± 47.03 U.F.C./mL). The yellow colonies in hemolymph of genetically improved juveniles were lower (15.00 ± 15.00 U.F.C./mL and 771.33 ± 198.94 U.F.C./mL, respectively). The colonies of *Pseudomonas* sp. (116.67 ± 35.12 CFU / mL), in hemolymph of genetically improved juveniles were equal ($p > 0.05$) to those observed in hemolymph of juveniles not genetically improved (199.67 ± 49.94 CFU / mL) . In both groups inflammations were observed in the abdomens and appendages. The juveniles of *Litopenaeus vannamei* from a breeding program showed greater resistance to infection by *vibrio* sp. and *Pseudomonas* sp. than those not genetically improved.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, resistance, growth, survival, fecundity, immune responses

¹ Student of the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes

² Principal Professor of the School of Fisheries Engineering, National University of Tumbes

This thesis presented to obtain the professional title of Fisheries Engineer

National University of Tumbes

Engineering Faculty of Fisheries and Marine Sciences

Academic Professional School of Fisheries Engineering

Calle Los Ceibos S / N Puerto Pizarro, Tumbes, Perú

Email: Joel_15david@hotmail.com

Email: Mercedes.pramen.09@gmail.com

Email: dsaldarriagay@gmail.com

2019

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la producción del langostino *Litopenaeus vannamei* ha crecido fuertemente como se ha hecho en muchos países como Taiwán, Indonesia, China, Ecuador y Tailandia. Esta especie es nativa de la costa oeste del Océano Pacífico y se distribuye geográficamente desde Sonora, en el Golfo de California, hasta Perú en Sudamérica y durante su cultivo se han visto afectados por muchas enfermedades causadas por virus, hongos, parásitos y bacterias las cuales han ocasionado pérdidas económicas en los sectores reproductivos (FAO 2006).

El Perú a pesar que ha tenido mucho éxito en el cultivo de *L. vannamei*, también se ha visto afectado por varias enfermedades, relacionadas principalmente por bacterias Gram Negativas del género *Vibrio* y *Pseudomonas*, microorganismos oportunistas considerados de alto riesgo y afecta mayormente en los estadios tempranos del cultivo, que generan exotoxinas causantes de necrosis tisular y alteración del epitelio de ciertos órganos (Lastras 2009), por otro lado las bacterias del género *Pseudomonas* sp. son capaces de metabolizar una amplia variedad de sustratos en un gran rango de temperatura desde menos de 25° C y 42° C y son frecuentemente resistente a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solvente orgánicos (Talavera et al. 2000).

Muchos patógenos bacterianos afectan a los langostinos cultivados en la Región Tumbes, siendo uno de los más importantes las causadas por vibrios (Gómez-Gil, Roque y Soto 2004) y las *Pseudomonas* sp. (Cornelis 2008), por lo que se buscan estrategias para combatirlos como el uso de probióticos que son bacterias que benefician a los organismos de cultivo, colonizando el medio y los organismos presentes, compitiendo por el espacio y mejorando el sistema inmune de *L. vannamei* (Martínez 2013).

Entre otra de las estrategias para disminuir los efectos de las enfermedades causadas por las bacterias indicadas, es el desarrollo de programas de mejoramiento genético de *L. vannamei*, orientadas a seleccionar reproductores con caracteres potenciales para la resistencia a enfermedades

de tal manera que los sistemas de producción sean más eficientes a gran escala, cultivo larvario, mantenimiento de la calidad del agua (Adriantahina 2013).

Teniendo en cuenta estos aspectos, se llevó a cabo un trabajo experimental con el objetivo evaluar la supervivencia y medir las respuestas inmunitarias de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio sp.* y *Pseudomonas sp.*

II. ANTECEDENTES

El género *Vibrio* no solamente afecta a los langostinos sino también a los peces y bivalvos (Venkateswara 2009) y entre estas principales especies patógenos se encuentran: *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* y *V. damsela* (Leyton y Riquelme 2008).

Aguirre-Guzmán et al. (2013), realizó un trabajo para evaluar la susceptibilidad *L. vannamei* de diferentes sub-estadios larvarios (nauplio, zoea I-III, misis I-III) y post-larva (PL 1) hacia *V. harveyi*, infectados por medio de inmersión durante 30 minutos en agua marina estéril en las siguientes dosis: 10^3 , 10^5 y 10^7 UFC/mL y un grupo control, con tres repeticiones. Los ejemplares de los sub-estadios larvarios alcanzaron una supervivencia baja significativa ($p < 0,05$) a las dos concentraciones mayores, y las PL 1 fueron más resistentes

Trujillo et al. (2005), realizó un estudio en tejidos de 40 juveniles (4 a 7 g) de *L. vannamei* infectados artificialmente por *V. parahemolyticus* y *Vibrio* sp. A cada uno se le inyectó una suspensión bacteriana, por inmersión en una dosis de 2×10^6 UFC/mL, los ejemplares expuestos a *Vibrio* sp. tuvieron una mortalidad significativamente ($p < 0,05$) mayor que 45 % y los expuestos al *V. parahemolyticus* tuvieron una mortalidad de 7 %, los cuales no presentaron una mortalidad significativamente diferente ($p > 0,05$) comparada con el grupo control. Aquellos expuestos a *Vibrio* sp. mostraron necrosis branquial, además de un aparente mayor número de hemocitos en el músculo, estos signos de enfermedad no se detectaron en los cortes histológicos de los organismos expuestos a *V. parahemolyticus*, ni en los del grupo control, lo que demostró una mayor patogenicidad de *Vibrio* sp. comparada con *V. parahemolyticus* en base a las observaciones histológicas.

Van de Braak et al. (2002), en muestras de hemolinfa e histología mostraron una disminución significativa en libre, hemocitos circulantes después de la infección WSSV. Una combinación de la hibridación *in situ* con una sonda de ADN específica para WSSV e inmunohistoquímica con un anticuerpo

específico contra gránulos de hemocitos en secciones de tejidos, indicó que los hemocitos salieron de la circulación y migraron a los tejidos donde muchas células infectadas por virus estaban presentes. Sin embargo, no se detectó ninguna respuesta hemocitos con posterioridad a las células infectadas por virus. El número de células granulares disminuyó en el tejido hematopoyético de camarón infectado.

Como todo invertebrado, el sistema inmunológico de los camarones peneidos está mediado por los hemocitos (hialinos, granulares, y semi-granulares) quienes poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzmán. 2009). El sistema inmune de los camarones cuenta también con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasa, y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (Zhen-Ming et al. 2010).

Los hemocitos tienen un papel importante en la defensa celular, un número más bajo de lo normal de hemocitos circulantes en crustáceos, está correlacionado con una resistencia reducida a patógenos (Le Moullac y Haffner 2000).

La reacción inmunológica más importante que tiene el camarón, es la producción de hemocitos que pueden combatir con éxito enfermedades tan serias como la Mancha Blanca (Calderón 2001).

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica y por ello, su principal actividad consiste en diferenciar y eliminar todo material no propio de sus tejidos. Los crustáceos no poseen respuestas inmunes específicas contra agentes infecciosos y su función defensiva se basa en un desarrollado sistema de defensa inespecífico, basado en hemocitos circulantes y en varias proteínas de defensa (Bachere 2000, Rendón y Balcázar 2003).

El sistema inmune de los crustáceos, está basado en efectores celulares y humorales, los que se conjugan para eliminar microorganismos, potencialmente infecciosos. Los hemocitos son cruciales en estas reacciones inmunitarias, siendo capaces de realizar la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de producir citotoxicidad y constituyen la fracción celular de la hemolinfa (Söderhäll y Cerenius, 1992 en Fonseca, González y Rico 2013).

Martínez (2007) refiere que la cutícula actúa como la primera barrera física que contiene sustancias antimicrobianas. Una vez que los patógenos han pasado las barreras externas de defensa, entonces los hemocitos juegan su papel en la respuesta inmune. Estas células, además de participar en la inactivación de organismos invasores, también participan en la regulación de diferentes funciones fisiológicas, incluyendo endurecimiento del exoesqueleto, cicatrización de daños en la cutícula, coagulación, metabolismo de carbohidratos y en el transporte y almacenamiento de proteínas y aminoácidos.

La coagulación de la hemolinfa es muy lenta y con apariencia turbia. La cantidad de hemocitos puede reducirse drásticamente (Lightner y Lewis 1975 en Gomez, Roque y Guerra 2001).

Los hemocitos constituyen la barrera celular del sistema inmune, que defiende al camarón de agresores que ingresan al organismo para causar infección celular y posteriormente enfermedad. Los valores promedio de hemocitos totales/mm³ más frecuentes en camarones preadultos sanos, se encuentran entre 25 000 y 35 000 (Cuéllar-Angel 2014).

Estos autores, refieren que es bien conocido, en la práctica de los cultivos, el aumento en el tiempo de coagulación de la hemolinfa en crustáceos sobre estrés fisiológico o durante infecciones y que el proceso de coagulación envuelve varios factores: la proteína de coagulación (CP), la enzima hemocitaria TGasa y la concentración plasmática de Ca²⁺. No se conoce claramente cuál de estos factores es el responsable por el aumento en el tiempo de coagulación en animales estresados/infectados. Evidencias

sugieren que hay una interacción de todos estos factores. Camarones *L. vannamei* infectados con TSV tienen una capacidad disminuida de coagulación y presentan una actividad significativamente reducida de TGasa en los hemocitos, además de un decrecimiento en la concentración de calcio plasmático.

El número total de conteo de hemocitos (THC) puede aumentar o disminuir sus valores, dependiendo del tipo y tiempo de exposición a los agentes causantes del estrés. Es común que se observe una disminución de la THC, fenómeno conocido por hemocitopenia, durante las primeras horas de un proceso infeccioso, que puede ser seguido por un aumento de hemocitos en fases más tardías, pero solamente cuando se trata de infecciones moderadas. Esta disminución inicial se debe probablemente a una migración y/o infiltración de los hemocitos en los tejidos infectados o heridos, de una baja reposición de las células por el tejido hematopoyético y/o hasta muerte celular por apoptosis celular (Cuellar-Angel 2014).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1. Material biológico:

- Ejemplares de juveniles de *Litopenaeus vannamei*.
- *Vibrio* sp.
- *Pseudomonas* sp.

3.1.2. Equipos:

- 18 acuarios.
- 20 Placas Petri
- 1 hemocitometro
- 1 caja de láminas portaobjetos
- 1 caja de láminas cubreobjetos
- 1 Microscopios OLYMPUS
- 2 micropipeta de 0,5 a 10 µl Axygen modelo AP-10
- 1 autoclave SCOTLE MINI
- 12 matraces de 250 ml

3.1.3. Insumos:

- 5 L de hipoclorito de sodio al 5 %.
- 5 bolsas de detergente de 200 g.
- tubos eppendorf
- tuberculinas de 1ml
- puntas de micropipeta
- guantes de látex de examen talla M
- mascarilla
- 2 Asa de barrido

3.1.4. Materiales de oficina:

- 1 millar de papel bond tamaño A-4 de 75g.
- 1 memoria USB de 4 Gb.
- 1 libreta de campo.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Lugar y tiempo de ejecución de la investigación

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Patología de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la región de Tumbes, centro poblado de Puerto Pizarro, cuyas coordenadas son: Latitud Sur 3° 30' 26" y Longitud Oeste 80° 23' 46".

El periodo de investigación, en la fase de ejecución fue de 30 días.



Figura 1. Laboratorio de Microbiología y Patología. Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Universidad Nacional de Tumbes, Puerto Pizarro.

3.2.2. Tipo y diseño de investigación

De acuerdo a su fin, la investigación fue del tipo aplicada (Tresierra 2000), porque consistió en la aplicación de conocimientos básicos sobre microbiología y patología en el cultivo de *L. vannamei*, para que luego estos conocimientos generados tengan una aplicación en el sector acuícola.

De acuerdo al diseño de contrastación, fue experimental verdadera (Tresierra 2000), porque se orientó a evaluar la supervivencia y

respuestas inmunitarias de juveniles de *L. vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. mediante un experimento en el que se seleccionaron previamente las especies con las cuales se trabajó.

3.2.3. Población y muestra

Se utilizaron dos grupos de juveniles de *L. vannamei*: 225 ejemplares del laboratorio de producción de post-larvas de la empresa Marinasol S.A. procedentes de un proyecto de investigación titulado: Mejora de la productividad de post larvas de *Litopenaeus vannamei* mediante la selección de reproductores ligados a marcadores tipo SNP de tres caracteres genéticos de importancia comercial (Crecimiento, Fecundidad y Resistencia), denominados ejemplares mejorados genéticamente; y otro grupo de 225 ejemplares producidos en laboratorio y cultivados en el Centro de Producción Acuícola de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, denominados no mejorados genéticamente.

Por tanto, la población y la muestra que se utilizó fue de 450 juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* con un peso de $5,0 \pm 0,25$ g de peso promedio, distribuidos en 18 acuarios en 40 litros de agua filtrada.

3.2.4. Acondicionamiento del laboratorio

Los acuarios y así mismo los demás materiales que se utilizaron en la ejecución de la investigación fueron desinfectados y lavados con una solución de hipoclorito de sodio a 5 %. Fueron llenados con 25 litros de agua, se instaló el sistema de aireación. La limpieza también se hizo extensiva al laboratorio y de la misma manera para todos los materiales que se utilizaron en el desarrollo del proyecto

3.2.5. Aclimatación y siembra de juveniles

Luego de haber obtenido los langostinos juveniles *Litopenaeus vannamei* de la empresa Marinasol S.A. y del Centro de Producción

Acuícola, se colocaron en acuario con litros de nivel de agua, dando las condiciones adecuadas de calidad de agua, para lograr la aclimatación en 25 litros, luego se procedió a subir el nivel de agua a 40 litros en cinco días, haciendo un recambio de 37,50 % diario. La siembra se realizó de manera directa, a razón de 25 ejemplares de *L.*



vannamei en cada acuario.

Figura 2. Ambiente acondicionado para la ejecución del proyecto de tesis.

3.2.6. Infección de ejemplares

La infección con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. se realizó por inmersión, de tal manera que se inoculó 50 mL de cepa cada 6 horas e inmediatamente se procedía a observar el comportamiento de los langostinos.

3.2.7. Obtención de hemolinfa

La obtención de las muestras de hemolinfa se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, para determinar la expresión de la respuesta inmunitaria a la infección bacteriana experimental: número total de hemocitos y tiempo de coagulación.

Se extrajeron los langostinos moribundos y fueron colocados en posición del seno ventral dejando expuesta la zona de unión entre

cefalotórax y abdomen, luego se desinfectó con alcohol al 90 %, y se extrajeron 300 µL de hemolinfa con jeringa de 1 mL provista con 300 µl de anticoagulante: Solución Alsever Modificado – MAS (27 mM citrato de sodio, 336 mM NaCl, 115 mM glucosa, 9 mM EDTA; pH 7,0, 4°C). Las muestras de hemolinfa fueron colocadas en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL y conservadas a 4° C.

Se realizaron los cultivos bacterianos en el medio Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis y Sacarosa (TCBS) para *Vibrio* sp., y Agar Cetrímide para *Pseudomonas* sp.

3.2.8. Supervivencia de juveniles

Los langostinos muertos fueron removidos diariamente y contabilizados para luego calcular el porcentaje de supervivencia con respecto al número inicial de ejemplares sembrados.

3.2.9. Alimentación de juveniles

La alimentación se realizó con balanceado de 35 % de proteína en la frecuencia de 2 veces al día (7:00 am y 6:00 pm), a razón de 5 % de la biomasa, diario.

3.2.10. Recambio de agua

Se realizó el sifoneo del material orgánico de desecho y el 50 % de recambio de agua diario.

3.2.11. Diseño experimental estadístico

Se tomaron dos grupos experimentales de juveniles según la procedencia: mejorados genéticamente y no mejorados genéticamente, los que fueron infectados (tratamientos) con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. cada uno con tres repeticiones.

Los tratamientos fueron distribuidos mediante el Diseño Completamente al Azar (Calzada 1982) según la siguiente tabla.

3.2.12. Procesamiento y análisis de datos.

En general, los datos obtenidos fueron procesados y sistematizados a través de la hoja electrónica de cálculo del Programa Computacional Excel de Microsoft Office, para obtener datos estadísticos de centralización y dispersión, así como la construcción de histogramas, ploteo de datos y construcción de curvas según la variabilidad de los resultados. Las pruebas estadísticas ($\alpha = 0,05$) se realizaron con el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

Tabla 1. Denominación de los tratamientos en la infección de juveniles de *L. vannamei*

Juveniles	Tratamiento	Denominación
Mejorados genéticamente	Infección con <i>Vibrio</i> sp.	T1
	Infección con <i>Pseudomona</i> sp.	T2
	Sin infección (Control 1)	C1
No mejorados genéticamente	Infección con <i>Vibrio</i> sp.	T3
	Infección con <i>Pseudomona</i> sp.	T4
	Sin infección (Control 2)	C2

IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de la supervivencia

Se observó que los juveniles provenientes de un programa de mejoramiento genético obtuvieron mayor supervivencia que los juveniles del grupo control, tanto cuando no fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. como cuando fueron infectados con estas bacterias (Tabla 2).

La supervivencia promedio de los juveniles mejorados genéticamente y no infectados fue de $82,67 \pm 6,11$ % mayor a la supervivencia de los juveniles no mejorados genéticamente y no infectados que fue de $60,00 \pm 8,00$ % ($p < 0,05$) (figura N°2).

Los juveniles mejorados genéticamente mostraron mayor supervivencia ($p < 0,05$) a la infección por *Vibrio* sp. a los juveniles no mejorados genéticamente, siendo las supervivencias promedio de $45,33 \pm 9,24$ % y $2,67 \pm 2,31$ %, respectivamente (Figura N°2).

La misma tendencia ($p < 0,05$) siguieron los juveniles infectados con *Pseudomona* sp., observándose supervivencias de $56,00 \pm 6,93$ % y $9,33 \pm 10,07$ %, respectivamente (Figura N°2).

Se observó que *Vibrio* sp. causó mayor mortalidad que *Pseudomona* sp. en ambos grupos experimentales de juveniles *L. vannamei* (Figura 2).

Tabla 2. Supervivencia (%) de juveniles de *Litopenaeus vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrio* sp. (T1 y T3) y *Pseudomona* sp. (T2 y T4)

Repeticiones	Mejorados genéticamente			No mejorados genéticamente		
	C1	T1	T2	C2	T3	T4
1	84,00	40,00	60,00	52,00	4,00	8,00
2	76,00	40,00	60,00	60,00	0,00	20,00
3	88,00	56,00	48,00	68,00	4,00	0,00
Promedio	82,67 a	45,33 b	56,00 b	60,00 b	2,67 c	9,33 c
Desviación Estándar	± 6,11	± 9,24	± 6,93	± 8,00	± 2,31	± 10,07

Promedio con diferente letra significa que es estadísticamente diferente a otro ($p < 0,05$)

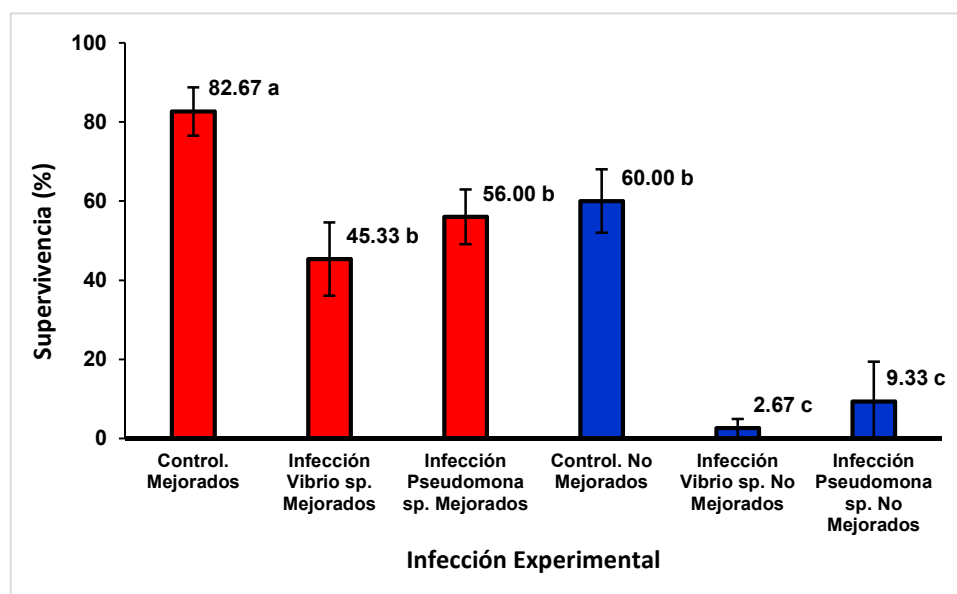


Figura 2. Supervivencia de juveniles de *Litopenaeus vannamei* no infectados e infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

4.2. Respuestas inmunitarias de juveniles *L. vannamei*

4.2.1. Conteo total de hemocitos

Los juveniles provenientes de un programa de mejoramiento genético tuvieron mayor número de hemocitos que los juveniles control, tanto cuando fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. como cuando no fueron infectados con estas bacterias (Tabla 3).

El número promedio de hemocitos de los juveniles mejorados genéticamente no infectados fue de $27,47 \times 10^3 \pm 1,11 \times 10^3$ cél./mm³, estadísticamente iguales ($p > 0,05$) al número promedio de hemocitos de los juveniles no mejorados genéticamente y no infectados que fue de $25,70 \times 10^3 \pm 1,15 \times 10^3$ cél./mm³ (Figura 3).

Los juveniles mejorados genéticamente no mostraron mayor número promedio de hemocitos ($p > 0,05$) a la infección por *Vibrio* sp. que los juveniles no mejorados genéticamente, siendo las cantidades promedio de $19,77 \times 10^3 \pm 1,62 \times 10^3$ cél./mm³ y $16,67 \times 10^3 \pm 1,65 \times 10^3$ cél./mm³, respectivamente (Figura 3).

La misma tendencia ($p > 0,05$) siguieron los juveniles infectados con *Pseudomona* sp., observándose $20,30 \times 10^3 \pm 1,95 \times 10^3$ cél./mm³ y $17,37 \times 10^3 \pm 1,10 \times 10^3$ cél./mm³, respectivamente (Figura 3).

Aunque numéricamente se observó que *Vibrio* sp. mayor efecto negativo sobre la producción de hemocitos por el órgano hematopoyético que *Pseudomona* sp. en ambos grupos experimentales de juveniles *L. vannamei*, la decisión estadística indicó que ese efecto fue similar (Figura 3).

Tabla 3. Densidad de hemocitos x 10³ (cél./mm³) en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrio* sp. (T1 y T3) y *Pseudomona* sp. (T2 y T4)

Repeticiones	Mejorados genéticamente			No mejorados genéticamente		
	C1	T1	T2	C2	T3	T4
1	27,6	18,3	22,3	24,5	18,5	17,3
2	28,5	19,5	18,4	26,8	16,2	18,5
3	26,3	21,5	20,2	25,8	15,3	16,3
Promedio	27,47 a	19,77 b	20,30 b	25,70 a	16,67 b	17,37 b
Desviación Estándar	± 1,11	± 1,62	± 1,95	± 1,15	± 1,65	± 1,10

Promedio con diferente letra significa que es estadísticamente diferente a otro (p < 0,05)

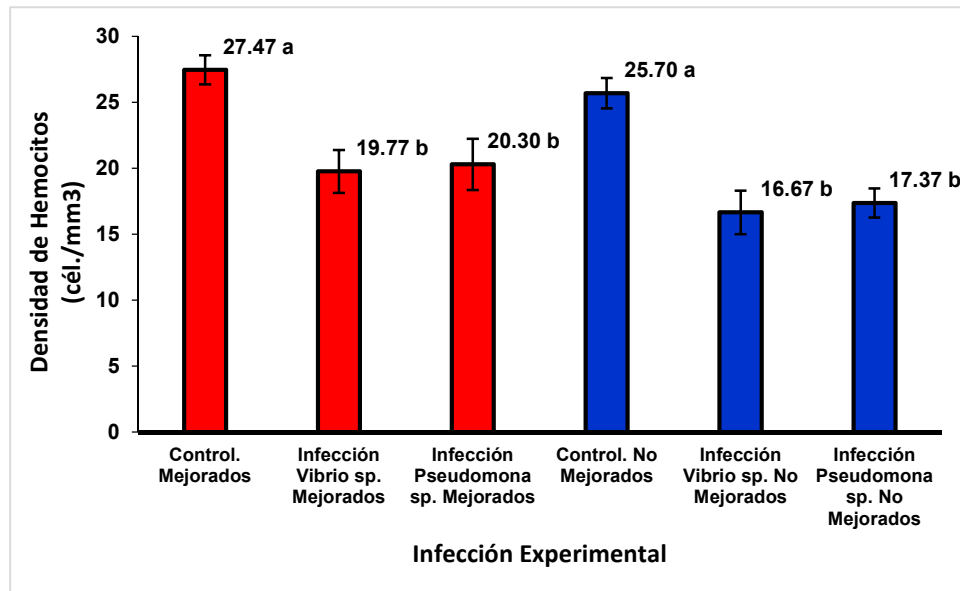


Figura 3. Densidad de hemocitos x 10³ (cél./mm³) en la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* no infectados e infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

4.2.2. Tiempo de coagulación de la hemolinfa

Los juveniles provenientes del programa de mejoramiento genético tuvieron igual ($p > 0,05$) tiempo promedio de coagulación de hemolinfa que los juveniles del grupo control, tanto cuando fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. como cuando no fueron infectados con estas bacterias (Tabla 4).

El tiempo promedio de coagulación de hemolinfa de los juveniles mejorados genéticamente no infectados fue de $3,33 \pm 0,58$ s, igual al tiempo promedio de coagulación de hemolinfa de los juveniles no mejorados genéticamente y no infectados ($p < 0,05$).

Los juveniles mejorados genéticamente infectados por *Vibrio* sp. mostraron menor tiempo promedio de coagulación de hemolinfa ($p < 0,05$) que los juveniles no mejorados genéticamente, siendo los valores promedios de $3,67 \pm 0,58$ s y $6,33 \pm 1,15$ s, respectivamente (Figura N° 4).

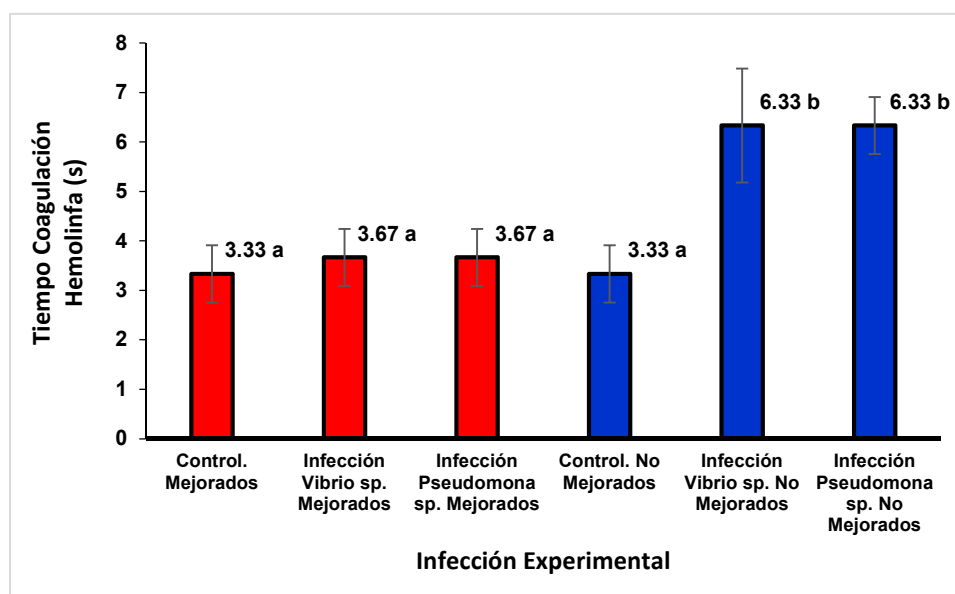
La misma tendencia ($p < 0,05$) siguieron los juveniles infectados con *Pseudomona* sp., observándose $3,67 \pm 0,58$ s y $6,33 \pm 0,58$ s, respectivamente (figura N° 4).

Se observó que la hemolinfa de los juveniles mejorados genéticamente infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. tuvieron menor tiempo de coagulación que el grupo control de juveniles no mejorados genéticamente (Figura 4).

Tabla 4. Tiempo de coagulación de la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* no infectados (C1 y C2) e infectados con *Vibrio* sp. (T1 y T3) y *Pseudomona* sp. (T2 y T4)

Repeticiones	Mejorados genéticamente			No mejorados genéticamente		
	C1	T1	T2	C2	T3	T4
1	4,00	4,00	3,00	3,00	7,00	7,00
2	3,00	4,00	4,00	3,00	5,00	6,00
3	3,00	3,00	4,00	4,00	7,00	6,00
Promedio	3,33 a	3,67 a	3,67 a	3,33 a	6,33 b	6,33 b
Desviación Estándar	± 0,58	± 0,58	± 0,58	± 0,58	± 1,15	± 0,58

Promedio con diferente letra significa que es estadísticamente diferente a otro ($p < 0,05$)



empo de coagulación de la hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* no infectados e infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

4.2.3. Crecimiento poblacional de *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. en hemolinfa de juveniles *L. vannamei*

El crecimiento poblacional de *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. en la hemolinfa fue mayor en juveniles *L. vannamei* no mejorados genéticamente (Tabla 5).

Se observó que las colonias de *Vibrio* sp. que dan una coloración verde al medio TCBS, en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente en promedio fueron de $23,00 \pm 22,52$ U.F.C./mL menor ($p < 0,05$) a $252,00 \pm 47,03$ U.F.C./mL encontradas en juveniles no mejorados genéticamente (Figura N°5).

En el caso de colonias que dan una coloración amarilla al medio de cultivo TCBS, en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente en promedio fueron de $15,00 \pm 15,00$ U.F.C./mL menor ($p < 0,05$) a $771,33 \pm 198,94$ U.F.C./mL encontradas en juveniles no mejorados genéticamente (Figura N° 5).

La tendencia fue similar siguieron las colonias de *Pseudomonas* sp., en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente se determinó un promedio de $116,67 \pm 35,12$ U.F.C./mL igual ($p > 0,05$) a las observadas en hemolinfa de juveniles no mejorados genéticamente, que en promedio fueron $199,67 \pm 49,94$ U.F.C./mL (Figura N° 5).

La tendencia general fue que estas bacterias crecieron en mayor densidad en los juveniles no mejorados genéticamente (Figura 5).

Tabla 5. Crecimiento poblacional (U.F.C./mL) de colonias verdes, colonias amarillas y colonias totales en hemolinfa de juveniles *L. vannamei* infectados con *Vibrio* sp. (T1 y T3) y *Pseudomona* sp. (T2 y T4)

Repeticiones	Mejorados genéticamente			No mejorados genéticamente		
	T1		T2	T3		T4
	Colonias verdes	Colonias amarillas	Colonias totales	Colonias Verdes	Colonias Amarillas	Colonias totales
1	24	15	150	250	676	253
2	0	0	80	206	638	192
3	45	30	120	300	1 000	154
Promedio	23,00 a	15,00 c	116,67 e	252,00 b	771,33 d	199,67 e
Desviación Estándar	± 22,52	± 15,00	± 35,12	± 47,03	± 198,94	± 49,94

Promedio con diferente letra significa que es estadísticamente diferente a otro (p < 0,05)

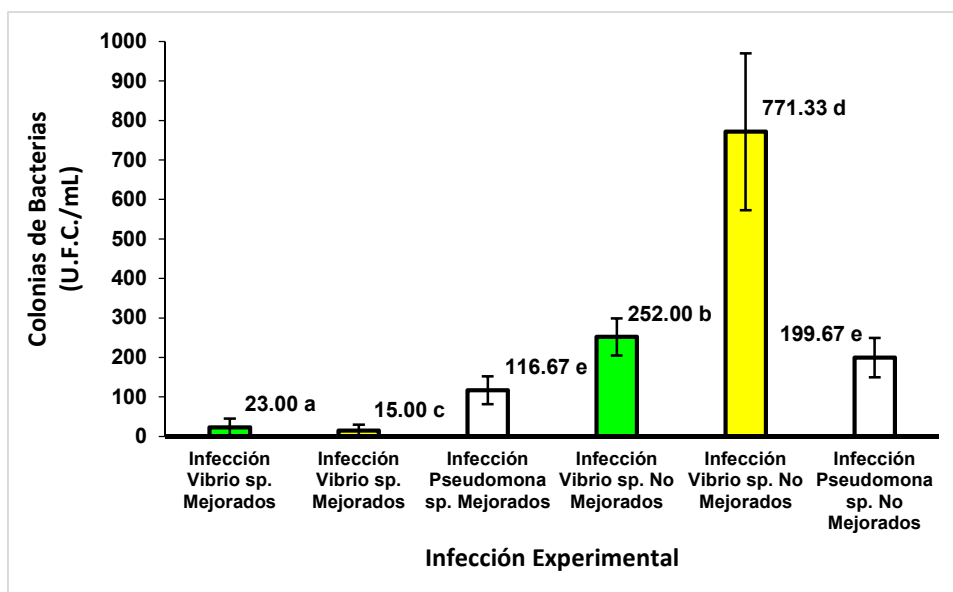


Figura 5. Crecimiento poblacional (U.F.C./mL) de colonias verdes, colonias amarillas y colonias totales en hemolinfa de juveniles *L. vannamei* infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

4.2.4. Características externas de juveniles *L. vannamei* después de la infección con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

En general, las características externas del exoesqueleto de los juveniles fueron similares en ambos grupos experimentales (Tabla 6), mostrando inflamaciones en todos los abdómenes y en apéndices, expresados en los matices rojo, verde y amarillo, característico de este tipo de infecciones en peneidos.

Tabla 6. Características externas de los juveniles *L. vannamei* infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp.

<i>Vibrio</i> sp.	<i>Pseudomona</i> sp.
Urópodos rojos, ligeramente verdes	Urópodos rojos y verdes leves
Pleópodos amarillos	Pleópodos amarillos y blandos
Branquias opacas	Branquias opacas
Antenas rugosas y blandas	Antenas rugosas
Periópodos amarillos	Periópodos amarillos
Exoesqueleto blando con melanización	Exoesqueleto con melanización



Figura 6. Características externas de juveniles *L. vannamei* después de la infección con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. (Obsérvese) el color rojo en los Urópodos y antenas

V. DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre el sistema inmune de langostino están motivadas por el interés de mejorar el crecimiento, supervivencia y control sobre las enfermedades que afectan a este organismo; siendo estos componentes de gran relevancia en la producción en sistemas de cultivo comercial de este crustáceo. La vibriosis representa serios problemas en el cultivo de camarones peneidos, registrando mortalidades masivas tanto en laboratorios de producción larvaria como en la etapa de engorde en muchas partes del mundo (Campa y Luna 2011).

La enfermedad causada por *Vibrio* sp. en peneidos, denominada vibriosis sistémica, es una de las más comunes y es la causa de altas mortalidades en los sistemas de cultivo. En esta investigación, se ensayó la infección bacteriana deliberada por *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp., en dos grupos de langostinos *L. vannamei*, con el objetivo de verificar el nivel de resistencia de juveniles obtenidos a través de un programa de mejoramiento genético.

A los 30 días de experimentación, se observó que los juveniles provenientes de un programa de mejoramiento genético obtuvieron mayor supervivencia que los juveniles del grupo control, tanto cuando fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. y cuando no fueron infectados con estas bacterias. Además, se observó que *Vibrio* sp. causó mayor mortalidad que *Pseudomona* sp. en ambos grupos experimentales.

Vibrio sp. es una de las especies bacterianas con mayor efecto sobre la supervivencia de *L. vannamei*, Trujillo et al. (2005), observaron que este género causó una mortalidad mayor a 45%, mientras que en este estudio la mortalidad varió de 54,67% en juveniles mejorados genéticamente a 97,33%, en los que no fueron mejorados genéticamente. La misma tendencia siguieron los infectados con *Pseudomonas* sp., con mortalidades de 44,00% y 90,67%, respectivamente.

En el proceso de infección, se observó que los langostinos presentaron inflamaciones en el abdomen y en apéndices, expresados en los matices rojo, verde y amarillo, característico de este tipo de infecciones en peneidos, opacidad de la musculatura abdominal y anorexia, expansión de los cromatóforos con nado erráticamente en la superficie, signos de necrosis en apéndices, letargo, tracto intestinal vacío y muerte, como lo señalan Lightner (1988), Trujillo et al. (2005) y Morales y Cuéllar-Ángel (2014), además los autores, indican que este tipo de infección involucra a la cutícula, hepatopáncreas, órgano linfoide, glándula antenal, corazón, hemolinfa y músculo estriado.

Se observaron señales de estrés, con opacidad de la musculatura abdominal y anorexia (no comen), expansión de los cromatóforos y nado errático en la superficie del acuario, coincidiendo con los síntomas descritos por Lightner (1988) y Morales y Cuéllar Ángel (2014).

El exoesqueleto del langostino actúa como la primera barrera física que contiene sustancias antimicrobianas. Una vez que los patógenos han pasado las barreras externas de defensa, entonces los hemocitos juegan su papel en la respuesta inmune (Martínez 2007).

Los factores de virulencia extracelulares han sido sugeridos por diversos autores como uno de los principales agentes en las especies de *Vibrio* (Austin y Zhang 2006), principalmente la patogenicidad en *L. vannamei* causada por *V. harveyi*, y se atribuye a la presencia de amilasas, caseinasas, fosfolipasas, gelatinasas y lipasas en los productos extracelulares de esta especie de bacteria, sugiriendo que estos pueden jugar un papel importante en la patogenicidad de la misma hacia el langostino. Como todo invertebrado, el sistema inmunológico de los camarones peneidos está mediado por los hemocitos (hialinos, granulares, y semi-granulares) quienes poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (Aguirre-Guzmán et al., 2009) reacciones inmunológicas

que pueden combatir con éxito enfermedades tan serias como la Mancha Blanca (Calderón 2001) y Vibriosis.

En cuanto a la producción de hemocitos, se observó que los juveniles provenientes de un programa de mejoramiento genético tuvieron mayor número de hemocitos que los juveniles control, tanto cuando fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. como cuando no fueron infectados con estas bacterias, encontrándose *Vibrio* sp. causó mayor efecto negativo sobre la producción de hemocitos por el órgano hematopoyético que *Pseudomona* sp., sin embargo, en ambos grupos experimentales de juveniles *L. vannamei*, la decisión estadística indicó que ese efecto fue similar.

El número promedio de hemocitos de los juveniles mejorados genéticamente no infectados fue de $27,47 \times 10^3 \pm 1,11 \times 10^3$ cél./mm³ igual al promedio de hemocitos de los juveniles no mejorados genéticamente y no infectados que fue de $25,70 \times 10^3 \pm 1,15 \times 10^3$ cél./mm³, valores coincidentes con los indicados por Morales y Cuéllar-Ángel (2014), quienes señalan, a su vez, que los hemocitos constituyen la barrera celular del sistema inmune, que defiende al langostino de agresores que ingresan al organismo para causar infección celular y posteriormente enfermedad, y que los valores promedio más frecuentes en camarones preadultos sanos, se encuentran entre $25,00 \times 10^3$ y $35,00 \times 10^3$ cél./mm³.

Según este índice, se infiere que la infección bacteriana limitó la producción de hemocitos en los juveniles infectados por *Vibrio* sp., alcanzando el número promedio de hemocitos fue de $19,77 \times 10^3 \pm 1,62 \times 10^3$ cél./mm³ y $16,67 \times 10^3 \pm 1,65 \times 10^3$ cél./mm³, en ambos grupos de langostinos experimentales, con la misma tendencia en los juveniles infectados con *Pseudomona* sp., observándose $20,30 \times 10^3 \pm 1,95 \times 10^3$ cél./mm³ a $17,37 \times 10^3 \pm 1,10 \times 10^3$ cél./mm³.

Este efecto es coincidente con el reportado por Trujillo et al. (2005), al indicar que los juveniles de *L. vannamei* expuestos a *Vibrio* sp. mostraron necrosis branquial, además de un aparente mayor número de

hemocitos en el músculo, y determinaron una mayor patogenicidad de *Vibrio* sp. comparada con *V. parahaemolyticus* en base a las observaciones histológicas.

Van de Braak et al. (2002), en un estudio de muestras de hemolinfa e histología, encontraron una disminución significativa en hemocitos libres circulantes después de la infección WSSV; los hemocitos salieron de la circulación y migraron a los tejidos donde muchas células infectadas por virus estaban presentes; sin embargo, no se detectó ninguna respuesta hemocitos con posterioridad a las células infectadas por virus, y el número de células granulares disminuyó en el tejido hematopoyético de camarón infectado.

Morales y Cuéllar-Ángel (2014), indican que el número total de hemocitos (THC) puede aumentar o disminuir sus valores, dependiendo del tipo y tiempo de exposición a los agentes causantes del estrés. Es común que se observe una disminución de la THC, fenómeno conocido por hemocitopenia, durante las primeras horas de un proceso infeccioso, que puede ser seguido por un aumento de hemocitos en fases más tardías, pero solamente cuando se trata de infecciones moderadas. Esta disminución inicial se debe probablemente a una migración y/o infiltración de los hemocitos en los tejidos infectados o heridos, de una baja reposición de las células por el tejido hematopoyético y/o hasta muerte celular por apoptosis celular. La mayoría de los autores concuerda que un aumento en el THC debe proporcionar una mayor protección de los camarones contra infecciones, una vez que los hemocitos son los principales responsables por las diferentes reacciones inmunocelulares y son los sitios de expresión de las diferentes moléculas de defensa.

Los hemocitos tienen un papel importante en la defensa celular, un número más bajo de lo normal de hemocitos circulantes en crustáceos, está correlacionado con una resistencia reducida a patógenos, por lo que se infiere que este mecanismo de defensa fue afectado negativamente por la infección bacteriana, evidenciado en las altas

mortalidades tanto en juveniles mejorados genéticamente como en los no mejorados.

Es conocido, en la práctica de los cultivos de langostinos, el aumento en el tiempo de coagulación de la hemolinfa en crustáceos debido al estrés fisiológico o durante infecciones (Cuéllar-Ángel 2014).

Los juveniles provenientes del programa de mejoramiento genético tuvieron igual tiempo promedio de coagulación de hemolinfa que los juveniles del grupo control, tanto cuando fueron infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. como cuando no fueron infectados con estas bacterias.

Se observó que la hemolinfa de los juveniles mejorados genéticamente infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. tuvieron menor tiempo de coagulación que el grupo control de juveniles no mejorados genéticamente. Al respecto, Gomez-Gil, Roque y Soto-Rodríguez (2004), citando a Lightner y Lewis (1975), reportaron que la coagulación de la hemolinfa es muy lenta y con apariencia turbia y que en estados infecciosos la cantidad de hemocitos puede reducirse drásticamente.

El tiempo promedio de coagulación de hemolinfa de los juveniles mejorados genéticamente no infectados fue de $3,33 \pm 0,58$ s, igual al tiempo promedio de coagulación de hemolinfa de los juveniles no mejorados genéticamente y no infectados. Los juveniles mejorados genéticamente infectados por *Vibrio* sp. mostraron menor tiempo promedio de coagulación de hemolinfa que los juveniles no mejorados genéticamente, siendo los valores promedios de $3,67 \pm 0,58$ s y $6,33 \pm 1,15$ s, respectivamente.

Esto es relativo, dependiendo de la condición fisiológica de los individuos y del grado de severidad de la infección, pues Peña, Vargas y Varela (2013), en un estudio de ejemplares infectados con *Vibrio*, observó un tiempo de coagulación de 34,40 s.

El proceso de coagulación envuelve varios factores: la proteína de coagulación (CP), la enzima hemocitaria TGasa y la concentración

plasmática de Ca^{2+} . No se conoce claramente cuál de estos factores es el responsable por el aumento en el tiempo de coagulación en animales estresados/infectados, pero las evidencias sugieren que hay una interacción de todos estos factores. En langostinos *L. vannamei* infectados con TSV se observó una capacidad disminuida de coagulación y presentaron una actividad significativamente reducida de TGasa en los hemocitos, además de un decrecimiento en la concentración de calcio plasmático (Morales y Cuéllar-Ángel 2014).

El crecimiento poblacional de *Vibrio* sp. y *Pseudomona* sp. en la hemolinfa fue mayor en juveniles *L. vannamei* no mejorados genéticamente. La tendencia general fue que estas bacterias crecieron en mayor densidad en los juveniles no mejorados genéticamente. Se observó que las colonias de *Vibrio* sp. que dan una coloración verde al medio TCBS, en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente en promedio fueron de $23,00 \pm 22,52$ U.F.C./mL menor ($p < 0,05$) a $252,00 \pm 47,03$ U.F.C./mL encontradas en juveniles no mejorados genéticamente.

Morales y Cuéllar-Ángel (2014), tomado de Gómez-Gil (2006), sugieren que un crecimiento de colonias verdes (mayor a 50% en la lectura) en la hemolinfa menor a 10^3 U.F.C./mL puede considerarse como un problema serio, pero sí es mayor a 10^3 U.F.C./mL puede considerarse como grave.

En el caso de colonias que dan una coloración amarilla al medio de cultivo TCBS, en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente en promedio fueron de $15,00 \pm 15,00$ U.F.C./mL menor a $771,33 \pm 198,94$ U.F.C./mL encontradas en juveniles no mejorados genéticamente. Morales y Cuéllar-Ángel (2014), tomado de Gómez-Gil (2006), consideran que el crecimiento de colonias amarillas, en la hemolinfa menor a 10^3 U.F.C./mL puede considerarse como normal, y sí es mayor a 10^3 U.F.C./mL es un problema serio.

La tendencia fue similar siguieron las colonias de *Pseudomonas* sp., en hemolinfa de juveniles mejorados genéticamente se determinó un promedio de $116,67 \pm 35,12$ U.F.C./mL igual a las observadas en hemolinfa de juveniles no mejorados genéticamente, que en promedio fueron $199,67 \pm 49,94$ U.F.C./mL, Al respecto, Gomez-Gil, Roque y Soto-Rodríguez (2014), citando a Alday-Sanz et al. (2002), señalan que, si bien es cierto que el tiempo de permanencia de bacterias en el sistema circulatorio de los langostinos es de pocas horas e incluso minutos, es frecuente encontrar en organismos aparentemente sanos una carga bacteriana variable pero generalmente inferior a 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de hemolinfa.

Gomez-Gil, Roque y Soto-Rodríguez (2004), reporta que según Ruangpan et al. (1995) y Gómez-Gil et al. (1998), entre las bacterias encontradas en la hemolinfa de langostinos, algunos vibrios son considerados como habitantes naturales de los sistemas acuáticos. Las especies identificadas en la hemolinfa de *P. vannamei* y *P. monodon* son *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. fischeri* y *V. vulnificus*; y que como se puede ver, las mismas especies de *Vibrio* han sido encontradas en langostinos sanos y en langostinos enfermos, por lo que se refuerza la idea de que lo importante es identificar la cepa y no la especie, como causante de una enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

1. Los juveniles de *Litopenaeus vannamei* provenientes de un programa de mejoramiento genético infectados con *Vibrio* sp. y *pseudomonas* sp, obtuvieron mayor supervivencia con 45,33% y 56,00% a diferencia que los juveniles no mejorados genéticamente 2,67 % y 6,93%.
2. El número de hemocitos de los juveniles de *Litopenaeus vannamei* provenientes de un programa de mejoramiento genético, infectados con *Vibrio* y respectivamente con *pseudomonas* sp. de $19,77 \times 10^3$ cél./mm³ y $20,30 \times 10^3$ cél./mm³ de la misma manera para los no mejorados genéticamente infectados con *vibrios* sp. y *pseudomonas* sp. de $16,67 \times 10^3$ y $1,10 \times 10^3$ cél./mm³.
3. El tiempo de coagulación de los juveniles de *Litopenaeus vannamei* provenientes de un programa de mejoramiento genético infectados con *Vibrio* sp. 3,67 segundos y *pseudomonas* sp. 6,33 segundos y de la misma tendencia para *vibrios* y *Pseudomonas* sp.
4. Los juveniles mejorados genéticamente infectados por *Vibrio* sp en colonias verdes fueron de 23,00 UFC/mL. y *pseudomonas* sp. 116,67 UFC/mL y en los no mejorados en las colonias amarillas genéticamente infectados por *Vibrio* fue 252 UFC/mL., y *pseudomonas* sp 199,67 UFC/mL.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriantahina. (2013). Variedad genética y resistencia a la ampicilina en *Vibrio* spp. aislados de ecosistemas acuáticos. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 16 (3): 1439-1449.
<http://www.saludpublica.es/secciones.revistas/a.Sanid.Ambiental>.
- Austin.B., y X-H. Zhang. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. 1: 81-95.
- Principales agentes en las especies de *Vibrio* del *Litopenaeus vannamei*. *Red de Revistas Científicas de América Latina* 28 (3): 154-168.<http://www.scielo.sa.cr/pdf/m/v26n1/12v4n1.pdf>
- Aguirre-Guzmán.2009. Sistema inmunológico de los invertebrados *Litopenaeus vannamei*. *científico Agropecuaria*.8:136-220
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo.codigo=6702423>
- Aguirre-Guzmán, E., A. López y L. Vázquez. 2013. Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. *Scientia Agropecuaria*.4:121-127.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4405547>
- Bachere E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.
- Calderón, J. V. 2001. *VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura*. Libro de Resúmenes.p
- Calzada, José. 1982. *Capítulo V. Diseño completamente randomizado*. En *Métodos estadísticos para la investigación*, 10-125 y 156-178. Lima: Jurídica S.A. 3ra ed.
- Campa, A. y A. Luna. 2011. *Respuesta inmune en camarón blanco, Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cabreros, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317-344.

- Cornelis, P. 2008. *Pseudomonas Genómicas and Molecular Biology*. Brussel, Belgium: Caister Academic Press.
<http://www.caister.com/hsp/pdf/flyer/pseudo.pdf>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2006. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/009/A0699s/A0699s00.htm>.
- Fonseca, E., R. González y Rico, R. 2013. *Revista AquaTIC*, nº 38, pp. 68-84. Año 2013.
- Gomez-Gil, B., Roque A. y Soto R. (2004). Vibriosis en camarones y su diagnóstico. Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo International. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 261-265.
https://www.researchgate.net/publication/235636525_Vibriosis.
- Gómez, B., A. Roque y A. Guerra. 2001. *Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. Las Enfermedades en la Camaronicultura*. Chapter **(PDF Available)**. January 2001. Publisher: Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM., pp. 272-295
- Le Moullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. *Aquaculture* 191: 123-132.
- Lightner, D.V., y Lewis. 1975. Aseptic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. *marine fisheries review*. 37, 25-28
- Leyton, Y. y C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456. <http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v43n3/art04.pdf>.
- Martínez, R.L. .2007. Camaronicultura mexicana y mundial. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(3) :181-196.
- Martínez, V. A. 2013. Cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* utilizando ácidos orgánicos y bacterias ácido lácticas en el alimento balanceado. Tesis para optar el grado de Ingeniero en Acuicultura, Universidad Técnica de Machala, 13-49.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1970>.

- Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. *Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 382 pp.
- Morales-C., y M. Soledad.** (eds.). **2014.** Métodos para el diagnóstico de camarones penaeidos: montajes en fresco. *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*.OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá. 29 pp.
- Söderhäll, J., y R. Cerenius.1992. Crustacean Immunity and Complement; a Premature Comparison . *Amer, ZooL.*, (5):60-67.
- Peña, N., R. Vargas y A. Varela. 2013. Productos naturales como estimuladores del sistema inmunológico de *Litopenaeus vannamei*, infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Red de Revistas Científicas de América Latina* 24 (1): 133-147.
<http://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v26n1/a05v26n1.pdf>
- Ramón. F., Arenal A., Santiesteban D., Sotolongo J., Martínez R., y Estrada M. (2009). Acuabio 1, un estimulador del sistema inmune de camarones *Litopenaeus vannamei*. *Biotecnología Aplicada* 26:39-43.
<http://132.248.9.34/hevila/Biotecnologiaaplicada/2009/vol26/no1/6.pdf>
- Rendón, L., J. L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, nº 19, pp. 27-33. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Guayaquil. Ecuador.
http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_4.pdf
- Talavera, V., y M. Zapata. 2000. Ocurrencia de la bacteria pseudomonas en el cultivo de camarón. *Nicovita*, Marzo 1999, 4.
http://www.nicovita.com/extranet/Boletines/may_99_01.pdf
- Tresierra, Álvaro. 2000. *Metodología de la investigación científica*. Trujillo: Biociencia. Primera Edición.
- Trujillo, T., A. Guzmán , J. Genaro y J. Rábago. 2005. Patogenicidad en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia y Mar* 9 (27):11-18.
<http://www.umar.mx/revistas/27/vibrio.pdf>

- Van de Braak, C. B., M. H. Botterblom, E. A. Huisman, J. H. Rombout, W. P. Van Der Knaap. 2002. [*Dis. Aquat. Organ.*](#) 2002 Aug. 29;51(2):149-55
- Venkateswara, A. 2009. Vibriosis en la acuicultura del camarón. La Habana, Cuba: Sociedad Cubana de Medicina Veterinaria para casos de Desastres. <http://www.mvd.sld.cu/doc/pescayacuicultura/vibriosis-en-la-acuicultura-del-camaron.pdf>
- Zhen-Ming C., G. Liu, S. Zhao, J. Li y Y. Peng. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1227–1241.

ANEXOS
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Cuadro 1. ANVA para los valores de la supervivencia y respuestas inmunitarias de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

Variables en estudio		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculado ($\alpha = 0,05$)	Sig.
Supervivencia (%)	Tratamientos	18 688,00	7	2 669,71	49,44	0,000
	Error	864,00	16	54,00	-	-
	Total	19 552,00	23	-	-	-
Densidad de hemocitos (cél./mm ³)	Tratamientos	347 656 250,00	7	49 665 178,57	21,77	0,000
	Error	36 500 000,00	16	2 281 250,00	-	-
	Total	384 156 250,00	23	-	-	-
Tiempo de coagulación de la hemolinfa (s)	Tratamientos	44,50	7	6,35	10,89	0,000
	Error	9,33	16	0,58	-	-
	Total	53,83	23	-	-	-
Colonias verdes en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Tratamientos	157 323,00	3	52 441,00	38,57	0,00
	Error	10 876,00	8	1 359,50	-	-
	Total	168 199,00	11	-	-	-
Colonias amarillas en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Tratamientos	2 722 453,67	3	907 484,556	5,658	0,022
	Error	1 283 209,33	8	1 604 401,167	-	-
	Total	4 005 663,00	11	-	-	-
Colonias totales en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Tratamientos	20 667,00	3	6 889,00	3,696	0,062
	Error	14 910,67	8	1 863,83	-	-
	Total	35 577,67	11	-	-	-

Cuadro 2. Prueba de Tukey para los valores de la supervivencia de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T3)	3	2,67	-	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T4)	3	9,33	-	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T1)	3	-	45,33	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T2)	3	-	56,00	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente y no infectados (C1)	3	-	60,00	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente y no infectados (C2)	3	-	-	82,67
Significación	-	0,945	0,285	1,000

Cuadro 3. Prueba de Tukey para los valores de la densidad de hemocitos en la hemolinfa de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T3)	3	16 666,67	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T4)	3	17 366,67	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T1)	3	19 766,67	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T2)	3	20 300,00	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente y no infectados (C2)	3	-	25 700,00
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente y no infectados (C1)	3	-	27 466,67
Significación	-	0,127	0,830

Cuadro 4. Prueba de Tukey para los valores del tiempo de coagulación de la hemolinfa de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente y no infectados (C1)	3	3,33	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente y no infectados (C2)	3	3,33	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T1)	3	3,67	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T2)	3	3,67	-
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Vibrio</i> sp. (T3)	3	-	6,33
<i>Litopenaeus vannamei</i> no mejorados genéticamente e infectados con <i>Pseudomonas</i> sp. (T4)	3	-	6,33
Significación	-	0,999	1,000

Cuadro 5. Prueba T de Student para los valores de colonias verdes y amarillas en la hemolinfa de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F calculado ($\alpha = 0,05$)	Significación ($\alpha = 0,05$)	T calculado	Grados de libertad	Significación (bilateral)	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Colonias verdes en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Se han asumido varianzas iguales	1,004	0,373	-7,607	4	0,002	-229,00	30,11	-312,59	-145,41
	No se han asumido varianzas iguales	-	-	7,607-1	2,871	0,005	-229,00	30,11	-327,29	-130,71
Colonias amarillas en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Se han asumido varianzas iguales	12,699	0,024	-6,566	4	0,003	-756,33	115,18	-1 076,14	-436,53
	No se han asumido varianzas iguales	-	-	-6,566	2,023	0,022	-756,33	115,18	-1 246,63	-266,04

Cuadro 6. Prueba T de Student para los valores de colonias totales en la hemolinfa de juveniles *Litopenaeus vannamei* mejorados genéticamente, infectados con *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp.

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F calculado ($\alpha = 0,05$)	Significación	T calculado ($\alpha = 0,05$)	Grados de libertad	Significación (bilateral)	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Colonias totales en la hemolinfa (U.F.C./mL)	Se han asumido varianzas iguales	0,396	0,563	-2,355	4	0,078	-83,00	35,25	-180,87	14,87
	No se han asumido varianzas iguales	-	-	-2,355	3,589	0,086	-83,00	35,25	-185,45	19,45