



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Uso de Probióticos y  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos en la alimentación del camarón *Litopenaeus vannamei* como estrategia para incrementar la producción”

Tesis de Grado

Previa a la obtención del título de:

INGENIERO ACUICULTOR

Presentada por:

Daniel Arturo Aguayo Triviño

Guayaquil – Ecuador

2006

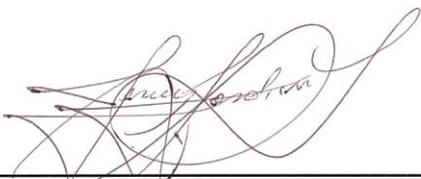
## AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por todas las bendiciones que me ha brindado durante toda mi vida.
- A mis padres, Daniel y Fátima, su ejemplo de amor, me animan a ser mejor cada día.
- A Virna por ser la mujer que siempre me acompañó durante esta travesía de mi vida brindándome su apoyo incondicional. Gracias mi vida por todo el cariño que me has brindado y por siempre tener fé en mi.
- A mis hermanas, Daniela, Fátima, Lorena, Angélica, Doris y Mariuxi y mi gran hermano Juan José, quienes han estado conmigo en la lucha constante de esfuerzo y sacrificio para cumplir las metas propuestas.
- A mi fiel y tan querida amiga Ruth, gracias por tus oraciones y por la bella amistad que siempre me has brindado.
- A Jenny Rodríguez, Ph.D y Ricardo Cedeño M.Sc., directores de mi tesis, por su invaluable colaboración y guía en el desarrollo de este trabajo.
- A Gabriela Casco, Yessenia Pozo, Alejandra Valladares, José Luis Vélez y Diego Mejía, por ser amigos inolvidables.
- Al personal de la Estación Experimental CENAIM-PALMAR, por las facilidades brindadas para el desarrollo de esta tesis.
- A todos quienes forman la Fundación CENAIM – ESPOL, directivos, científicos, técnicos, operarios; gracias por todas las lecciones de vida aprendidas.

## **DEDICATORIA**

A mi creador, Dios padre eterno

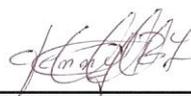
## TRIBUNAL DE TESIS



---

Jerry Landívar Zambrano, M.sc.

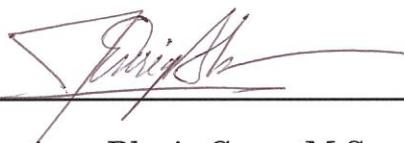
Presidente del Tribunal



---

Jenny Rodríguez, Ph.D.

Director de Tesis



---

Enrique Blacio Game M.Sc.

Miembro del Tribunal

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.”

(Reglamento de Exámenes y Títulos Profesionales de la ESPOL).



CIB-ESPOL

**Daniel Aguayo Triviño**

## RESUMEN

Debido a las bajas producciones de camarón reportadas en los últimos años en Ecuador por la presencia del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés), las estrategias para disminuir la incidencia del virus han sido enfocadas hacia la salud de estos organismos. La hipótesis de este estudio plantea que los probióticos *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus sp.*(P64), y los  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos (BG) estimulan el sistema inmune del camarón, haciendo que estos sean más resistentes a brotes infecciosos. Esto permitirá mejorar la salud y la supervivencia de los organismos e incrementar la producción por ciclo de cultivo. Se evaluaron dos protocolos de BG aplicados en el alimento en base a dosis (150 y 300mg.kg<sup>-1</sup> de alimento) y dos protocolos con probióticos en base a frecuencias de administración. El primero (Probiótico 1) consistió en aplicar diariamente las bacterias probióticas P62 y P64, desde el inicio de la corrida, hasta el final del cultivo. En el segundo protocolo (Probiótico 2), las bacterias probióticas P62 y P64 se aplicaron diariamente a partir de la quinta semana de cultivo hasta la cosecha. Tanto los probióticos como los BG fueron aplicados en el alimento. Todos los protocolos fueron comparados contra un tratamiento control.

Pese a los problemas de hipoxia observados en el cultivo (producto de una mala respuesta a la fertilización), y de un brote de WSD a mitad del ciclo de cultivo; se obtuvo diferencias significativas en producción (libras.ha<sup>-1</sup>) y FCA en los tratamientos BG-1 y probiotico 1; logrando incrementar la producción sobre el 48% y

52% respectivamente, obteniéndose además una disminución de un 60% en el FCA en ambos casos. La supervivencia y densidad de cosecha de los organismos, no fue estadísticamente significativa a pesar de ser numéricamente mayores en los tratamientos que el control.

El costo de los tratamientos probiótico 1 y BG-1 en sistemas de producción se justifica por la baja inversión adicional sobre los costos de producción, alta rentabilidad y tasa de retorno.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>ANTECEDENTES</u> .....	4
2.1. <u>ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN E INMUNO- ESTIMULACIÓN DEL CAMARÓN</u> .....	4
2.2. <u>INMUNOESTIMULACIÓN CON UTILIZACIÓN DE BG</u> .....	6
2.3. <u>INMUNOESTIMULACIÓN CON UTILIZACIÓN DE PROBIÓTICOS</u> ...12	
2.3.1. <u>Mecanismos de acción de los probióticos</u> .....	16
2.3.2. <u>Efectos</u> .....	17
2.4. <u>CULTIVOS SEMI- INTENSIVOS EN ECUADOR</u> .....	17
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	21
3.1. <u>CARACTERÍSTICAS DE PISCINAS EXPERIMENTALES</u> .....	21
3.2. <u>MATERIAL BIOLÓGICO</u> .....	22
3.2.1. <u>Animales cultivados</u> .....	22
3.2.2. <u>Cepas probióticas</u> .....	23
3.3. <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u> .....	23
3.4. <u>MANEJO DE ALIMENTACIÓN</u> .....	25
3.4.1. <u>Aplicación de cepas próbióticas</u> .....	25
3.4.2. <u>Aplicación de BG en el alimento</u> .....	26
3.5. <u>MUESTREOS</u> .....	26
3.6. <u>PARÁMETROS ABIÓTICOS</u> .....	27
3.7. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</u> .....	27
3.8. <u>MUESTREOS PARA DIAGNÓSTICOS</u> .....	28

3.9. <u>ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR</u> .....	28
3.10. <u>ANÁLISIS HISTOLÓGICOS</u> .....	29
4. <u>RESULTADOS</u> .....	30
4.1. <u>TRATAMIENTO DE LAS LARVAS</u> .....	30
4.2. <u>PARAMETROS AMBIENTALES</u> .....	30
4.3. <u>SALUD ANIMAL</u> .....	33
4.4. <u>INDICADORES DE CULTIVO</u> .....	33
4.4.1. <u>Producción</u> .....	33
4.4.2. <u>Supervivencia</u> .....	34
4.4.3. <u>Densidad de cosecha</u> .....	35
4.4.4. <u>Crecimiento</u> .....	36
4.4.5. <u>Factor de conversión alimenticia (FCA)</u> .....	37
4.5. <u>COSTO BENEFICIO DEL USO DE PROBIÓTICO Y BG</u> .....	39
4.5.1. <u>Costos de investigación</u> .....	39
4.5.2. <u>Análisis de la inversión</u> .....	40
4.5.3. <u>Proyección de ingresos</u> .....	41
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	42
5.1. <u>TRATAMIENTO DE LAS LARVAS</u> .....	42
5.2. <u>PARÁMETROS AMBIENTALES</u> .....	42
5.3. <u>INDICADORES DE CULTIVO</u> .....	46
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	52
7. <u>RECOMENDACIONES</u> .....	54
8. <u>ANEXOS</u> .....	55
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	61

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Piscina modelo de la estación utilizada en el bioensayo.....	21
Figura 2. Promedio de la temperatura y oxígeno disuelto de las 20 piscinas durante el ciclo de cultivo, tomados a las 06h00 y 18h00 horas.....	32
Figura 3. Proyección libras.ha <sup>-1</sup> de los cinco tratamientos empleados en el ensayo.....	34
Figura 4. Supervivencias a la cosecha obtenidas de los cinco tratamientos empleados.....	35
Figura 5. Densidad de cosecha (camarones.m <sup>2</sup> <sup>-1</sup> ) de los tratamientos.....	36
Figura 6. Peso promedio a la cosecha, alcanzado por los animales de los cinco tratamientos.....	37
Figura 7. Medias del factor de conversión alimenticia de los cinco tratamientos.....	38

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de alimentación utilizada desde la cuarta semana del cultivo como referencia para este estudio (Nicovita camarón de mar).....	25
Tabla 2. Resultados de peso, supervivencia y prevalencia para WSV ( $\pm$ Intervalo de Confianza; IC) de los tratamientos evaluados.....	30
Tabla 3. Valores promedios por tratamiento de parámetros físicos registrados durante el período de cultivo en el agua de las piscinas experimentales.....	31
Tabla 4. Número de recambios de agua realizados a fin de compensar las bajas concentraciones de OD, para cada piscina por tratamiento.....	32
Tabla 5. Costo de $\beta$ -glucanos y probióticos utilizados en el bioensayo.....	39
Tabla 6. Costos de aceite de pescado (USD) utilizados en los tratamientos y proyectados.ha <sup>-1</sup> .....	39
Tabla 7. Costo total de los tratamientos e Ingreso adicional de libras y USD. Datos proyectados.ha <sup>-1</sup> .....	39
Tabla 8. Costos aproximados de inversión en una hectárea de producción tradicional de camarón.....	40
Tabla 9. Ingreso adicional en dólares por ciclo.Ha. <sup>-1</sup> y tasa de retorno aplicando los tratamientos probióticos 1 y BG-1.....	41
Tabla 10. Rentabilidad neta por ciclo y año.ha. <sup>-1</sup> con la aplicación de los tratamientos Probióticos 1 y BG-1 en base a costos estimados de producción.....	41

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	55
<b>ANEXO 2.</b> TASA DE INCREMENTO ADICIONAL DE LOS INDICADORES DE CULTIVO DE CADA TRATAMIENTO .....	56
<b>ANEXO 3.</b> RESUMEN DE LOS INDICADORES DE PRODUCCIÓN DE LOS CINCO TRATAMIENTOS DEL ESTUDIO.....	56
<b>ANEXO 4.</b> CÁLCULO DE LOS COSTOS DE MANO DE OBRA Y COSTOS INDIRECTOS POR HECTÁREA DE PRODUCCIÓN EN CULTIVOS SEMI-INTENSIVOS DE CAMARÓN.....	57
<b>ANEXO 5.</b> INGRESOS Y COSTOS DE PRODUCCIÓN POR CICLO.HA <sup>-1</sup> CON LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS PROBIOTICO 1, BG-1 Y CONTROL.....	58
<b>ANEXO 6.</b> RENTABILIDAD NETA POR CICLO.HA <sup>-1</sup> Y POR TRATAMIENTO EN BASE A COSTOS ESTIMADOS DE PRODUCCIÓN.....	58
<b>ANEXO 7.</b> TASAS DE RENTABILIDAD POR TRATAMIENTO POR CICLO.HA <sup>-1</sup> .....	59
<b>ANEXO 8.</b> RENTABILIDAD NETA ESTIMADA POR AÑO.HA <sup>-1</sup> APLICANDO LOS TRATAMIENTOS PROBIÓTICOS 1 Y BG-1 EN UN CULTIVO DE CAMARÓN VERSUS AL TRATAMIENTO CONTROL.....	59
<b>ANEXO 9.</b> DENSIDADES DESEABLES DE FITOPLANCTON (CEL.ML <sup>-1</sup> ) EN ESTANQUES DE CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE CAMARÓN (ADAPTADO DE CLIFFORD 1994).....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANOVA	Análisis de Varianza
BG	$\beta$ -1,3/1,6-glucanos
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
Cel.	Células
CNA	Cámara Nacional de Acuicultura
FCA	Factor de conversión alimenticia
g.	Gramos
gpm.	Galones por minuto
Ha.	Hectárea
Hp.	Caballos de Fuerza
kg	Kilogramo
L	Litro
LPS	Lipopolisacáridos
m	metro
mg.	Miligramo
ml.	Mililitro
min.	Minuto
OD	Oxígeno disuelto
p	Probabilidad
PCR	Reacción de polimerización en cadena
PL	Post larva
proPO	Pro-fenol oxidasa
ppm	Partes por millón
TM.	Toneladas métricas
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
USD	Dólares de los estados americanos.
$\mu$ m	Micra

WSD	Enfermedad de la mancha blanca
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca

## **1. INTRODUCCIÓN**

El cultivo de camarón constituye una de las actividades de la acuicultura que ha tenido más rápido crecimiento a nivel mundial en los últimos años, constituyéndose en un gran promotor de divisas y empleo.

En Ecuador antes de la presencia del virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) en el año 1998, el cultivo de camarón llegó a producir más de 252 millones de libras con un ingreso de \$900 millones (USD), generando más de 1'200.000 puestos de trabajo (Guerrero, 2006). El rendimiento del cultivo en aquella época era alto (2000 libras.ha<sup>-1</sup>) y la supervivencia de los organismos alcanzaba entre el 55 y el 60%. Esta cifra bajó drásticamente a partir de la presencia del WSSV con supervivencias que no lograban superar el 10% y rendimientos bajos de producción (400 libras.ha<sup>-1</sup>). El virus provocó altas mortalidades en los animales causando un colapso en la industria camaronera. A inicios de 1999, la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA) informó que apenas el 25% de la industria de camarón en Ecuador estaba produciendo y que hasta el 2004 la industria dejó de percibir más de \$3.000 millones (Regueira, 2001; Guerrero, 2006).

Ante la desesperación del sector productivo, muchas medidas se tomaron para mitigar las pérdidas económicas y controlar el virus. La comunidad científica se dispuso a tratar de controlar la epidemia a través de métodos preventivos sin producir efectos nocivos en el medio, enfocándose en algunos casos directamente en el sistema de

defensa del camarón. Se realizaron investigaciones de tipo fisiológico y genómico del WSSV y se desarrollaron métodos de diagnóstico a fin de investigar posibles portadores del virus, tratando de controlar ya sean las entradas del virus o su desarrollo en los estanques.

De toda la experiencia acumulada desde 1999, uno de los efectos más destacados sobre la resistencia al WSSV, es la inmunoestimulación del sistema inmune del camarón producido por las altas temperaturas en el sistema de cultivo. Durante el año 2001, CENAIM realizó varios experimentos exponiendo camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* al WSSV a diferentes temperaturas (Sonnenholzner *et al.*, 2002a). Los resultados consistentemente demostraron una supervivencia superior al 95% cuando los camarones eran expuestos al virus con una temperatura del agua de 33°C.

El uso de invernaderos se implementó como estrategia para incrementar las temperaturas y la producción de camarón. Sin embargo, el alto costo en la implantación de esta tecnología en las piscinas camaroneras, ha sido una limitante para el sector productor. Una de las alternativas más económicas y discutidas que ha provocado un efecto protector ante el WSSV, es el uso de cepas probióticas y/o  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos (BG). Se han logrado obtener muy buenos resultados de inmunoestimulación en los organismos mejorando su salud y supervivencia bajo condiciones de laboratorio y estación experimental. Sin embargo; en el campo los

resultados muchas veces han sido poco reproducibles. No existe un protocolo que garantice la efectividad del uso de inmunoestimulantes en cultivo. El propósito de este estudio, es encontrar las dosis y los protocolos de aplicación de BG y probióticos (*Vibrio hepatarius*, P62 y *Bacillus* sp, P64), a fin de incrementar de forma significativa la producción de camarón (densidad de cosecha) en estanques de cultivo semi-intensivos (16 animales por metro cuadrado).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. ESTRATEGIAS DE INMUNOMODULACIÓN E INMUNOESTIMULACIÓN DEL CAMARÓN**

A pesar de los importantes avances zootécnicos que ha implicado el desarrollo de la industria camaronera, este sector cuenta con pocas herramientas para identificar y enfrentar los problemas epidemiológicos que lo afectan, recurriendo por lo general a intentar soluciones de emergencia cuando los problemas ya están presentes o a prácticas de manejo preventivas, las mismas que en su mayoría, no están sustentadas por bases científicas que garanticen su eficacia (Peeters y Rodríguez, 1999).

Factores como la contaminación ambiental y malas prácticas de cultivo, limitan o inmunodeprimen el sistema defensivo de los camarones, lo que favorece la aparición de enfermedades; por lo tanto, es recomendable encontrar y aplicar alternativas para estimular el sistema inmune de estos organismos, mejorando así la producción, sin tener que recurrir a tratamientos químicos que puedan poner en peligro la sustentabilidad de los recursos naturales (Alpuche, 2003).

Ante esta problemática existe un interés, en el uso de inmunoestimulantes y en encontrar nuevas formas de manipular el sistema inmune del camarón a fin de controlar y prevenir infecciones que se dan en un cultivo.

Se ha demostrado que algunos compuestos, como los sacáridos, los péptido-glicanos y los glucanos, son capaces de estimular el sistema inmune no específico del camarón, activando y fortaleciendo los mecanismos naturales de defensa contra bacterias, virus y otros patógenos, permitiendo que los animales soporten más eficientemente las condiciones estresantes de cultivo y respondan contra agentes extraños vivos o no vivos (Rodríguez, 2005).

Otra alternativa es el empleo de probióticos y sus enzimas, los cuales son manejados con mayor frecuencia a nivel de laboratorios productores de larvas y en estanques de cultivo comercial. Varios de estos probióticos cumplen con el principio de exclusión competitiva de bacterias patógenas, para ello demandan nutrientes en el tracto digestivo de los camarones, con el fin de reducir las posibilidades de colonización y desarrollo de otros micro-organismos, que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos. Además también cumplen otras funciones como la eliminación de malos olores y sabores, reducción de catabolitos y organismos no deseables como cianobacterias y aceleración en la degradación de sedimentos. Esto toma mucha importancia en los cultivos de bajo recambio ó recambio “cero”, como se puede apreciar en varios casos exitosos en desarrollo en nuestra región (Berger, 2000).

El sistema inmune se puede también modular mediante aditivos nutricionales como vitaminas C y E, las que promueven un buen funcionamiento de las células inmunitarias teniendo un efecto positivo sobre el sistema inmune del camarón

(Molina, 2002). Dietas con alto contenido de vitamina C, incrementan la resistencia al estrés en postlarvas de *Penaeus monodon* y *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. Las vitaminas pueden mejorar la respuesta inmune al influir sobre la eficacia del funcionamiento celular, pero no pueden ser definidos como inmunoestimulantes ya que no provocan una situación de alerta inmunitaria (Rodríguez, 2005a).

Investigaciones desarrolladas en el CENAIM muestran que el éxito de la inmunoestimulación, dependerá también de la capacidad inmunoestimulable del camarón y que ante la carencia de animales con esta cualidad, se pueden explorar dos estrategias para potenciar los resultados. La primera es la combinación de estimulación con hipertermia, y la segunda es la inmunoestimulación desde los estadios larvarios a fin de promover un mejor desarrollo de los tejidos inmunes (Rodríguez *et al.*, 2003).

## 2.2. INMUNOESTIMULACIÓN CON UTILIZACIÓN DE BG

El término glucano se refiere, genéricamente a una variedad de homo polisacáridos naturales que incluye polímeros de celulosa, laminarina, almidón etc. Estos compuestos abarcan cadenas ramificadas y no ramificadas de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (1-3), (1-4), (1-6) que pueden ser  $\alpha$  y  $\beta$  (Sánchez, 1997). De estos enlaces los  $\beta$  (1-3) rompen la linealidad de la molécula, impidiendo la formación de fibrillas, favoreciendo su solubilidad y la formación de soluciones viscosas.

Los BG son micropartículas con un diámetro de alrededor de 2-4 micras, compuestos de más de un 9.5% de glucosa, conteniendo alrededor de 83% de residuos glicosídicos y un 7.5% de terminales no reductoras (Duvic & Söderhäll, 1994). Este tipo de polisacárido se encuentra en la pared celular de bacterias, levaduras y hongos, los cuales tienen dos componentes: fibrilares y amorfos. Los primeros contienen la quitina y celulosa, conformando las microfibrillas. Mientras que los amorfos o matriciales contienen el glucano (Duvic y Söderhäll, 1994).

Los BG se pueden obtener a partir de cereales como la avena y el sorgo (Rodríguez *et al.*, 1998), bacterias *Sclerotinia sclerotiorum*, levaduras *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, considerando este último entre los de mayor actividad biológica (Taobada *et al.*, 2001).

Rodríguez (2000), describe a los glucanos como potentes inductores de los mecanismos no específicos de defensa del hospedero, moduladores de la inmunidad celular, humoral y del sistema retículo endotelial. Esto está interrelacionado con la detección y eliminación de patógenos extraños, microorganismos y parásitos que evidencien un peligro potencial para el huésped (Söderhäll y Cerenius 1992, Vargas-Albores y Yepiz -Plascencia 2000), lo que se les atribuye la capacidad de incrementar la resistencia contra enfermedades bacterianas (Nanba *et al.*, 1997), virales (Hashimoto *et al.*, 1997), fungales (Estrada *et al.*, 1997), parasitarias (Sánchez *et al.*, 1995) y tumorales (Vetvicka *et al.*, 1997).

Las proteínas de fijación de BG (BGBPs) (Duvic y Söderhäll, 1990), son componentes importantes del sistema inmune, estas proteínas se unen a los BG formando un complejo que reconoce un receptor en las superficie de los hemocitos, causando la degranulación y la activación del sistema profenoloxidasa (proPO) (Barranco *et al.*, 1991). En el camarón el sistema proPO es un complejo integrado de varios factores, que involucran moléculas de reconocimiento, células y sus actividades efectoras. Localizado en el interior de los hemocitos granulosos y semigranulosos, puede ser liberado por estimulación de peptidoglucanos (PG), BG o lipopolisacaridos (LPS). Una vez liberado el contenido granular, la proPO es transformada, por acción de una proteinasa, en fenoloxidasa activa (PO). Esta última es responsable de la oxidación de fenoles a quinones, los cuales se polimerizan en melanina, la misma que tiene propiedades microbidas (Vargas *et al.*, 1999; Söderhäll & Smith, 1983; Söderhäll1992). De esta manera se potencializa el estímulo del sistema inmune evitando el daño sobre el tejido del camarón.

Entre los principales efectos benéficos de la utilización de BG se pueden destacar los mencionados por Otero (2001):

- Proteger al camarón ante situaciones de estrés.
- Estimular el sistema inmune celular y humoral del camarón.
- Inducir a los hemocitos a la captura y exclusión de patógenos.
- Incrementar la supervivencia y el crecimiento
- Fortalecer la salud en los estadíos tempranos del camarón
- Mejorar la conversión alimenticia.

Un estudio realizado por Raa (2000), señala que los  $\beta$ -1,3-glucanos tienen una buena definición estructural química actuando sobre el sistema inmune de peces y moluscos. En *P. monodon* los  $\beta$ -1,3-glucanos actúan de manera positiva sobre el sistema inmune, incrementando la resistencia contra vibrios (Sung *et al.* 1993, Sung *et al.* 1996).

Los BG extraídos de la pared celular de levaduras incrementan la resistencia en *P. monodon* contra la infección de vibrios y el síndrome de la mancha blanca (Chang, 1999). Chang *et al.* (2000), observaron que los  $\beta$ -1,3-glucanos mejoraron la actividad fagocítica y hemocítica, adhesión celular y producción de anión superóxido, cuando fueron ingeridos en las dietas.

La inmunoestimulación por vía oral, incorporando las sustancias inmunoestimulantes en el alimento, sería el método más práctico para los sistemas de cultivo de camarón. Otero (2001) señala 150 mg de  $\beta$ -1,3/1,6 glucano.kg<sup>-1</sup> de alimento para juveniles como la concentración adecuada para observar un efecto positivo.

Cheng-Fang, *et al.*, (1999) demostraron la efectividad de la incorporación de  $\beta$ -1,3-glucanos (*Schizophyllum commune*) en la dieta, para mejorar la resistencia de postlarvas (PL15) y juveniles ( $5,5 \pm 0,5$ g) de *P. monodon* ante el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Ellos utilizaron dosis de 2g.kg<sup>-1</sup> de alimento durante 15 días en postlarvas y 10 y 20 días en juveniles. Los camarones fueron desafiados

con WSSV y después de 120 días, lograron obtener supervivencias 5.5% y 13.3% los que recibieron el tratamiento con  $\beta$ -1,3-glucanos; mientras que en el control (sin  $\beta$ -1,3 glucanos) no se obtuvo supervivencias después de 4 días de desafío.

Adicionalmente estudios realizados por Cornejo (2001), mostraron que inmunostimulando postlarvas PL-15 con  $\beta$ -1,3-glucanos se obtuvo un efecto protector que se extendió durante 2 meses, con una supervivencia del 34% contra el 11% del control (sin diferencias significativas). Los animales que recibieron una segunda dosis de inmunostimulación durante la corrida tuvieron una supervivencia del 48 %, siendo esta significativamente mayor al control.

La concentración de los inmunostimulantes y el método de aplicación es muy importante para observar el efecto protector. Sung *et al.* (1994), encontraron efectos positivos en infecciones experimentales con bacterias en *P. monodon* a concentraciones de 0,5 y 1 mg de  $\beta$ -1,3-glucano.ml<sup>-1</sup> de agua, pero este no fue efectivo a 0,25 y 2 mg.ml<sup>-1</sup> de agua. El efecto protector duró hasta 18 días después de la inmersión.

Itami *et al.* (1998), reportaron que la administración de un porcentaje de  $\beta$ -1,3-glucanos diluidos en una solución de agua de mar es efectiva en el control de vibriosis en el langostino de kuruma *Penaeus japonicus*.

En peces como en el Salmon del Atlántico Sur, el efecto de los  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanos originarios de *S. cerevisiae*, indujo protección significativa contra la furunculosis. Estos polisacáridos fueron inyectados por vía intramuscular y la protección no fue observada hasta después de once semanas (Rorstad *et al.*, 1993).

Estudios realizados en CENAIM, han logrado detectar estimulación de producción de superóxido y actividad antibacteriana del plasma utilizando  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos en *P. vannamei* (Otero, 2001), en tanto que utilizándolos en combinación con alta temperatura disminuyen la prevalencia de WSSV en postlarvas (Valladares, 2006). Por otra parte, en estanques experimentales se han obtenido resultados muy prometedores en densidad de cosecha utilizando BG como inmunoestimulantes (Rodríguez, 2003).

La utilización de BG como inmunoestimulantes en la acuicultura ha levantado muchas expectativas y controversias. El efecto protector de los inmunoestimulantes ha sido bien documentado en condiciones controladas de experimentación (Sung *et al.* 1994; Chang *et al.* 1999). Sin embargo, en términos prácticos su utilización en piscinas se ha acompañado de problemas de crecimiento, sin observarse en muchos casos un real efecto protector (Rodríguez *et al.*, 2000). Condición que podría estar relacionada tanto a la calidad de los productos utilizados.

No existen protocolos que garanticen la efectividad del inmunoestimulante en los cultivos de cada especie. Los resultados en campo pueden no ser buenos para el productor ya que la información es muy diversa sobre el uso de los BG respecto a sus dosis, frecuencias y modo de aplicación (baño, dieta); además, su efecto en los organismos también depende de su fuente (hongo, levadura), estructura molecular ( $\beta$ -1,3/1,6) y grado de pureza (Cornejo, 2001; Raa, 2000; Rodríguez, 2006).

### 2.3. INMUNOESTIMULACIÓN CON UTILIZACIÓN DE PROBIÓTICOS

El uso de probióticos ha beneficiado al sector acuícola por las ventajas observadas en relación a la prevención de enfermedades en organismos cultivados como peces, moluscos y especialmente crustáceos, aumentando la supervivencia y densidad de cosechas dadas en una producción (Cedeño, comunicación personal).

Parker (1974), define a los probióticos como microorganismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal. Otros investigadores, definen a los probióticos como células microbianas que son administradas de tal manera que pueden ingresar al tracto gastrointestinal y mantenerse vivas, mejorando la salud y desplazando organismos patógenos bajo el principio de exclusión competitiva (Douillet, 1998; Gomez *et al.*, 1998).

Naidu *et al.* (1999), describe a los probióticos como complementos nutricionales a base de microorganismos que de forma beneficiosa afectan la fisiología del huésped

modulando la inmunidad sistemática y mucosa, así como mejorando el equilibrio microbiano al prevenir la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal.

Muchas experiencias obtenidas con probióticos, han demostrado hasta el momento que no existe una única cepa que cubra con todas las expectativas en relación a la supervivencia, crecimiento y producción de animales cultivados (Burgos, 2005). Varios estudios han destacado que el uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, ya que la posibilidad de establecer poblaciones probióticas a pesar de las variaciones ambientales es mayor (Douillet, 2000; Balcazar, 2002).

En la actualidad existe una gran variedad de cepas próbioticas disponibles en acuicultura, y cada una de estas bacterias, pueden reaccionar de diferente manera según el medio de cultivo, ambiente o tipo de organismos cultivados. Bacterias que han sido usadas con éxito como probiótico, pertenecen al genero *Vibrio* (Griffith, 1995; Garriques y Arevalo, 1995), *Bacillus* spp. (Moriarty, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998) y la especie *Thalassobacter utilis* (Maeda y Liao, 1992).

En Ecuador uno de los primeros probióticos usados comercialmente en acuicultura fue una cepa de *Vibrio alginolyticus*, que ya desde 1992 ha permitido mejorar sustancialmente el rendimiento en estanques de camarones (Verschuere *et al.*, 2000). Los vibrios son bacterias gram-negativas, poseen forma de bacilos rectos o curvos; se presentan en medios anaeróbicos y poseen características quimiorganotróficas que les

permite tener un metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo; su crecimiento es estimulado por iones de sodio para la mayoría de las especies y su temperatura óptima de crecimiento varía entre 20 y 30 °C (Bergey, 1994).

Dentro del género *Vibrio* no hay mucha información sobre la interacción en organismos acuáticos. Aunque estudios demuestran que vibrios y aeromonas componen el 85% de la flora bacteriana en el intestino del camarón (Moss *et al.*, 2000); su uso como probiótico es muy controversial ya que algunas especies son patógenas para animales marinos invertebrados y vertebrados y ciertas especies están relacionados a enfermedades del camarón, como *Vibrio harveyi* (Bergey, 1994).

Uno de los microorganismos más usados como probiótico por sus efectos benéficos sobre la calidad del agua y el efecto bactericida sobre otras bacterias exógenas de naturaleza patogénica, es la bacteria *Bacillus subtilis*. Sin embargo; su uso en el alimento ha mostrado efectos negativos en el crecimiento y supervivencia de ciertos crustáceos y peces (Günther & Jiménez; 2004).

Los *Bacillus* son bacterias gram-positivas que se caracterizan por su forma bacilar, poseen una habilidad fisiológica para resistir al calor, pH y salinidad extremas y pueden ser aeróbicos o anaeróbicos facultativos (Bergey, 1994). Otra de sus características es la de reducir el número de patógenos por su capacidad de competencia y secreción de enzimas contra bacterias gram-negativas, logrando evitar

una propagación en las especies cultivadas (Wang *et al.*, 1999; Iriato & Austin, 2002). Su propiedad de formar esporas le permite adherirse al alimento seco con facilidad (Moriarty, 1998; Queiroz & Boyd, 1998; Kennedy *et al.*, 1998; Rengipat *et al.*, 1998; Sugita *et al.*, 1998) y su habilidad de degradar materia orgánica y reciclar nutrientes permite mejorar la calidad del agua en el medio de cultivo (Moriarty, 1997; Bergey, 1994).

En el género *Bacillus* no hay indicios de que estos puedan aportar genes de resistencia antibiótica a vibrios o bacterias gran-negativas (Rabinowitz & Roberts, 1986) ni han sido referidos como causantes de patologías relacionadas en acuicultura (Gullian, 2003).

Es trascendental tener un buen criterio de selección de bacterias probióticas, pues estas deben ser evaluadas por métodos de colonización, habilidad de competencia contra patógenos, inmunoestimulación y efectos de crecimiento en el organismo (Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil *et al.*, 2000).

Actualmente en Ecuador, CENAIM dispone de varias cepas probióticas seleccionadas, *V. alginolyticus* (Ili) (Morales, no publicado), *Vibrio hepatarius* (Thomson *et al.*, 2004) (P62), y *Bacillus* sp (P64) (Gullian *et al.*, 2003). Con estas bacterias se han obtenido buenos resultados en supervivencia y colonización en *L. vannamei* en laboratorio (Gullian *et al.*, 2003); y en campo, combinando las cepas P62 y P64 (Cedeño *et al.*, 2005).

### **2.3.1. Mecanismos de acción de los probióticos**

Existen varios mecanismos de acción de los probióticos; una de sus principales funciones es el desplazamiento ó la exclusión de cepas patógenas mediante su capacidad de competir por alimento, nichos ecológicos y espacio de crecimiento en el organismo, en el medio y en las superficies sólidas de un cultivo (Gatesoupe, 1993; Intriago & Jones ,1993; Intriago, 1996).

Se ha encontrado que ciertas cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus*) actúan en base a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas capaces de combatir bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium* (Aguirre, 1994); hoy en día, algunas cepas han sido modificadas genéticamente para atacar a un género específico de bacteria patógena como el género *Vibrio* (Austin *et al.*, 1995).

Otro de los mecanismos de acción de los probióticos, es la importante función que cumplen en la digestión y absorción de nutrientes (Intriago & Jones ,1993). Muchos de los organismos acuáticos mantienen un equilibrio en el tracto gastro intestinal entre organismos benéficos que comúnmente colonizan y viven en el epitelio intestinal y los organismos patógenos. Cabe recalcar que en algunos hospederos, dependiendo de la capacidad del probiótico, su estancia puede ser breve y sensible a cambios ambientales como temperatura u otros factores como estrés y alimento. Estos cambios provocan que este equilibrio se rompa y que los microorganismos patógenos se vean beneficiados (Maeda, 1992; Yasuda & Kitao, 1983).

### **2.3.2. Efectos**

Dentro de un medio de cultivo en el campo acuícola, los probióticos pueden beneficiar de muchas maneras tanto a los organismos sembrados y/o al sistema como tal.

Los probióticos pueden mejorar la actividad digestiva de los organismos por síntesis de vitaminas, cofactores, mejoramiento de la actividad enzimática y absorción de nutrientes (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1999; Jory, 1998; Ziemer y Gibson, 1998). Esta propiedad puede ser la causa por la cual exista un incremento de peso en los organismos expuestos a este tipo de bacterias pero pueden proporcionar diferentes resultados según las diferentes condiciones de cultivo (Gullian *et al.*, 2003).

Moriarty (1999), señala que con el uso de probióticos en acuicultura; la salud de los animales mejora por la remoción o disminución de la densidad de población de patógenos, mejorando la calidad del agua a través de una degradación más rápida de la materia orgánica. Por otra parte en el caso de ciertas cepas (*Bacillus sp*, *V. alginolyticus*) ha permitido tener en los animales un índice inmunitario mayor respecto al tratamiento control (Gullian, 2001).

## **2.4. CULTIVOS SEMI- INTENSIVOS EN ECUADOR**

El sistema de cultivo semi-intensivo es el procedimiento de producción de camarón más aplicado en nuestro país y en Latinoamérica. Alrededor del 58% de las

camaroneras en Ecuador utilizan este sistema y en menor escala son aplicados los métodos de cultivo extensivo e intensivo (Marriott, 2003).

Este sistema comprende una densidad de 8 a 20 PL.m<sup>2</sup><sup>-1</sup>. Los costos de operación y administrativos son relativamente moderados porque debe invertirse en alimentación, fertilización, mano de obra, controles de producción y en utilización de combustibles para aireación y bombeo en los recambios de agua.

El área de piscinas semi-intensivas es muy variable, entre 2 y 30 ha. Sin embargo, el tamaño ideal desde el punto de vista de manejo es entre 4 y 8 ha. La profundidad operacional promedio debe estar entre 1.00-1.25m; la profundidad mínima no debe ser menor de 1m, y la profundidad máxima no debe sobrepasar los 2m (Jory, 2001).

Los rendimientos promedios de este sistema son de alrededor de 1.000 kg.ha<sup>-1</sup> año, con una duración de cultivo entre 120 y 140 días por cosecha (Regueira, 2001). En las granjas de camarón donde se prefiere usar alimento suplementario durante el ciclo de crecimiento, se obtienen un buen índice de conversión (FCA), los cuales se encuentran entre 1:1 a 1,3:1 libras de alimento por libra de camarón (Talavera *et. al.*, 2005).

Mientras mayor sea la densidad de siembra bajo este sistema, se crea una mayor dependencia de la tecnología, pues el riesgo de que la cosecha falle por enfermedades, alimentación insuficiente, o estrés de las especies sembradas aumenta con la cantidad de camarones por hectárea (Marriott, 2003).

Anteriormente, en este sistema se utilizaban estanques especiales para precría en donde se colocaban a los juveniles hasta alcanzar la resistencia necesaria para poder ser sembrados o transferidos a las piscinas de engorde (Marriott, 2003). Sin embargo, la utilización de esta tecnología no fue muy eficiente por la evolución de cuadros patológicos y posteriores eventos de mortalidad que podrían presentarse debido a la estancia de animales a altas densidades por períodos que podrían superar los 30 días en temporadas de escasez de larva (Bravo, 2004).

Otra técnica aplicada en sistemas semi-intensivos que permite un mejor monitoreo de la evolución de las larvas que se siembran durante los primeros días de cultivos, es la utilización de corrales o los encierros. En Ecuador se han desarrollado algunos tipos de diseños dependiendo de las características de las piscinas, de las densidades de siembra y hasta de las costumbres de la zona (Bravo, 2004). Las desventajas que se pueden presentar en este tipo o estrategia de cultivo, está dada principalmente en el manejo, control, preparación y operación de los encierros y piscinas durante la corrida.

Antes de la presencia del WSSV en Ecuador las densidades de siembra de los cultivos semi-intensivos se manejaban entre 15 a 20PL.m<sup>2</sup><sup>-1</sup>. Una de las estrategias que tomó el productor para evitar brotes de WSSV en los cultivos, fue manejar bajas densidades de siembra (5 a 7PL.m<sup>2</sup><sup>-1</sup>). Actualmente se manejan entre 8 a 10PL.m<sup>2</sup><sup>-1</sup> y no se ha logrado subir estas densidades, sin tener algún tipo de brote infeccioso en los primeros días de cultivo. (Donoso, comunicación personal).

Rodríguez *et al.* (2003), indican que las primeras semanas de cultivo son las de mayor riesgo y las más importantes de controlar en cualquier estrategia de manejo que pretenda incrementar la producción en sistemas semi-intensivos bajo condiciones del WSSV. Con la utilización de inmonoestimulantes y probióticos se pretende incrementar las densidades de siembra y cosechas, mejorando la salud de los camarones y la resistencia ante las enfermedades existentes en un cultivo de producción.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la Estación experimental de la Fundación CENAIM-ESPOL ubicada en la provincia del Guayas, localidad de Palmar, entre los meses de Febrero y Abril del 2006.

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS DE PISCINAS EXPERIMENTALES

El cultivo se realizó en 8 piscinas de  $400\text{m}^2$ <sup>-1</sup> del sector A y 12 piscinas del sector B de la estación (Anexo 1). Las piscinas tienen una superficie promedio de  $400\text{m}^2$ <sup>-1</sup> una pendiente de fondo de 0,8%, la altura de los muros es de 1,50m y columna de agua de 1,0m con capacidad de almacenamiento de  $400\text{m}^3$ <sup>-1</sup>. Los muros laterales de división entre piscinas tienen una corona superior de 1m. Los muros que llevan la tubería para la distribución de agua y los ductos de drenaje de los efluentes tienen un ancho superior a los 3,0m. Todos los muros tienen una pendiente de 1,5:1,0.

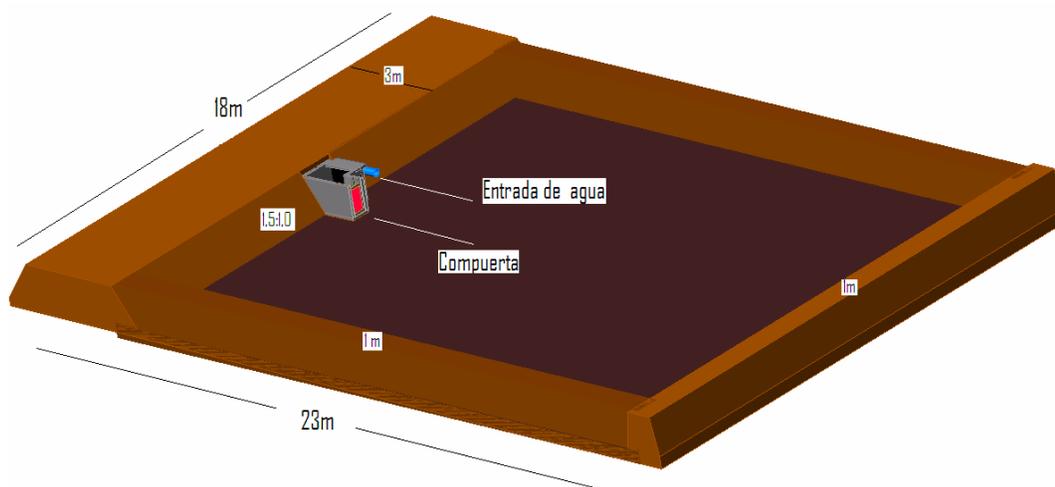


Figura 1. Piscina modelo de la estación utilizada en el bioensayo.

El sistema de abastecimiento de agua consta de un canal de aducción que es alimentado en marea alta por una bomba con motor Caterpillar de 120hp y capacidad de 9.000 gpm. El agua pasa del canal de aducción al reservorio de la estación por una compuerta. Una bomba de 11hp del reservorio alimenta un sistema de tuberías que finalmente lleva el agua a todas las piscinas.

El tiempo de llenado de las piscinas es de 2 horas y el tiempo de drenado de 40 min. Las compuertas están ubicadas en su totalidad dentro de las piscinas y tienen las dimensiones necesarias para colocar un bolso de pesca y permitir a dos personas maniobrar durante la cosecha.

El sistema de drenaje consta de un ducto cerrado ubicado en la base del muro compartido que recibe el agua de las piscinas y que está ubicado del mismo lado del sistema de distribución de agua. Los ductos tienen una pequeña pendiente hacia los pantanos de entre 0,1 y 0,05%.

### 3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.2.1. Animales Cultivados

Se obtuvieron los organismos provenientes del laboratorio EGIDIOSA ubicado en San Pablo, en el estadio Nauplio 5. Fueron cultivados en CENAIM siguiendo el protocolo de rutina del centro, el mismo que incluye el suministro del probiótico *V. alginolyticu*, (cepa Ili). Posteriormente desde PL5 hasta PL18 las larvas pasaron a 3 tanques externos de 8TM, correspondientes a 3 tratamientos distintos. En el primero

se aplicó los probióticos *V. hepatarius*, P62; *Bacillus sp*, P64. Estos fueron aplicados al agua como un inóculo para obtener una concentración final de  $1 \times 10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> en el tanque. En el segundo se aplicó BG en el alimento a una concentración de 150 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento. El tercero correspondió al control. Todos los tratamientos estuvieron a  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  (incluyendo el control). Esta temperatura se consiguió empleando una cubierta de plástico de invernadero sobre los tanques.

Finalmente se efectuó la siembra directa de los camarones a una densidad de 16 animales.m<sup>2</sup><sup>-1</sup>.

### **3.2.2. Cepas probióticas**

Las cepas fueron almacenadas en CENAIM en recipientes plásticos estériles a una temperatura de  $-40^\circ\text{C}$ . Cada semana se transportó a la Estación (Palmar) el volumen calculado de cepas probióticas para la aplicación correspondiente de alimento.

### **3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Se utilizaron en total 20 piscinas para los 5 tratamientos: probióticos, BG y control (4 réplicas por tratamiento).

En el tratamiento con probióticos se designaron 2 protocolos de aplicación. El primero (Probiótico 1) consistió en aplicar diariamente las bacterias probióticas P62 y P64 en el alimento, desde el inicio de la corrida (siembra), hasta el final del cultivo

(cosecha). En el segundo protocolo (Probiótico 2), las bacterias probióticas P62 y P64 se aplicaron diariamente en el alimento a partir de la quinta semana de cultivo hasta la cosecha.

El tratamiento con BG se manejó en base a dosis diferentes: en el primer protocolo (BG-1) inicialmente se aplicó una dosis de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  de alimento, la misma que fue ajustada a  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  cuando los animales recibieron una tasa de alimentación menor al 5 % de la biomasa. En el segundo protocolo (BG-2) se utilizó inicialmente  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$  la misma que se ajustó hasta alcanzar los  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$  cuando los animales recibieron una tasa de alimentación menor al 5 % de la biomasa.

Los BG sólo se aplicaron en el alimento en dos ocasiones específicos de cada mes los cuales se determinaron de acuerdo al ciclo lunar. 1) La primera aplicación se realizó la semana posterior a la luna nueva. 2) La segunda aplicación se inició 2 días anteriores a la luna llena prolongándose durante todo el aguaje. Esto se hizo con la finalidad de aprovechar la sincronización del ciclo de muda con el ciclo lunar. Teóricamente con este procedimiento, los animales recibieron BG durante las etapas de postmuda a premuda temprana cuando el camarón aumenta su capacidad de ingerir alimento (Cadena, 2001).

El producto comercial utilizado es un derivado de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* de cadenas  $\beta$ -1,3-glucano con ramificaciones  $\beta$ -1,6-glucano desproteinizadas y libres de mananos.

### 3.4. MANEJO DE ALIMENTACIÓN

El alimento se distribuyó al voleo alrededor de cada una de las piscinas una vez al día (17H00). Las 3 primeras semanas se alimentó según la estimación del crecimiento del camarón (12% -10% de la biomasa). A partir de la cuarta semana hasta el final del cultivo la alimentación se ajustó según la biomasa real existente de cada piscina, obtenidas a partir de los muestreos semanales (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla de alimentación utilizada desde la cuarta semana del cultivo como referencia para este estudio. (Nicovita camarón de mar).

Peso del camarón (gr.)	Tasa de alimentación (% de peso corporal)	Supervivencia (%)
0,5	10,0	100
1	8,0	95,0
2	6,0	93,8
3	4,5	92,6
4	3,5	91,4
5	3,0	90,2
6	3,0	89,0
7	2,8	87,8
8	2,6	86,6
9	2,5	85,4
10	2,0	84,2
11	1,8	83,0
12	1,8	81,8
13	1,8	80,6
14	1,8	79,4
15	1,7	78,2
16	1,7	77,0

#### 3.4.1. Aplicación de cepas probióticas

Los recipientes que contenían las cepas bacterianas P62 y P64 a una concentración de  $1 \times 10^8$  cel.ml<sup>-1</sup> fueron descongelados 20 minutos previos a la adición en el alimento. La relación del probiótico a utilizar fue de: 1ml de cepa P62 y 1ml de cepa P64 por kg de alimento, el procedimiento consistió de:

- Preparar una solución en 98ml de agua de mar filtrada, mas 1 ml de cada cepa P62 y P64 por kg de alimento.
- Luego esta solución se aplica al alimento, revolviendo hasta que esta quede completamente absorbida.
- Finalmente el alimento se recubre con aceite de pescado a razón de 50 ml por kg de alimento.

#### **3.4.2. Aplicación de BG en el alimento**

- La dosis específica de BG (150 mg; 300 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento) se disuelve en agua de mar filtrada (100 ml.kg<sup>-1</sup> de alimento).
- Esta solución se aplica al alimento, revolviendo hasta que este quede completamente impregnado.
- Finalmente se recubre el balanceado con aceite de pescado a razón de 50 ml.kg<sup>-1</sup> de alimento.

#### **3.5. MUESTREOS**

Los muestreos fueron realizados semanalmente a partir del día 21 de cultivo. En cada muestreo se tomó aproximadamente 98 camarones de cada piscina para obtener el peso promedio y densidad en cada una de ellas. Estos datos sirvieron para el ajuste de la dosis del alimento y para llevar un control y estimación de la producción.

Los muestreos fueron realizados atarrayando en diferentes secciones de la piscinas (1-3 veces) según el número de camarones disponibles. La atarraya utilizada poseía un diámetro de 4m, un ojo de malla de 4mm y una eficiencia de trabajo del 60%.

### 3.6. PARÁMETROS ABIÓTICOS

Durante el cultivo se registraron los siguientes parámetros:

- Temperatura y Oxígeno disuelto (OD) del agua.- Se realizó su lectura todos los días en dos horarios: 06h00 y 18h00. Se utilizó un equipo YSI- 85 con sensor de temperatura incorporado.
- Salinidad.- Se tomó cada vez que hubo incidencias de lluvias fuertes, utilizando un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill.
- Fertilización.- Se fertilizó al inicio del cultivo por una sola ocasión a razón de 20 kg de urea y 7 kg de Súper fosfato triple por ha, con relación N:P de 6:1.
- Productividad primaria.- Se efectuó 2 cuantificaciones del fitoplancton en los estanques con ayuda de una cámara neubauer y microscopio.
- Se registró las reposiciones de agua en cada una de las piscinas por filtración y evaporación; se mantuvo los niveles de agua en cinco tablones, lo que corresponde a una profundidad 1m.

Los recambios fueron hasta del 50% del volumen del agua de la piscina, y fueron efectuados estrictamente para controlar el excesivo crecimiento de fitoplancton y para superar problemas causados por bajas concentraciones de OD.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Con todos los datos obtenidos se verificó las asunciones de normalidad, empleando la gráfica de normal probability plot (Data desk 6.1) y homogeneidad de varianzas

utilizando la prueba de Levene's (Statistic 5.1). Con este último programa también se realizó el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 90 y 95%. Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó el test de comparación de medias Tukey al 90 y 95% de confianza.

Con los datos que no presentaron normalidad y homogeneidad se efectuó una transformación ( $X^{-1}$ ); en el caso de la supervivencia por trabajar con porcentajes se procedió a realizar la transformación  $\arcseno.y^{1/2}$  ya que esta permite realizar una transformación a grados, obteniéndose de esta forma una distribución normal de los datos.

### 3.8. MUESTREOS PARA DIAGNÓSTICOS

Para determinar la prevalencia de WSSV en las larvas cultivadas se realizaron análisis de PCR, al inicio (PL5) y final del pre-acondicionamiento (PL18) antes de ser transportadas a las piscinas. Para cada análisis se muestreó aleatoriamente 60 postlarvas de cada tratamiento.

Durante el cultivo en piscinas de engorde, se tomaron muestras de camarones enfermos para hacer un análisis de histología.

### 3.9. ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

Para la utilización de esta técnica se realizó la extracción del ADN por medio del Método de CTAB descrito por Lo *et al.* (1996). Habiendo realizado la extracción se procedió al análisis de detección de WSSV con la técnica del PCR anidado,

utilizando los iniciadores de Kimura *et al.* (1996). Para el control interno del ADN del camarón se utilizaron los iniciadores de 441-bp codante para subunidad 18S del ARN ribosomal (Tang y Lightner, 2000).

### 3.10. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

La técnica utilizada para el respectivo análisis histológico de los camarones se realizó basado en el protocolo descrito por Bell y Lightner (1998). El muestreo de los animales se realizó durante el cultivo tomando animales que presentaban comportamiento anormal y moribundos.

## **4. RESULTADOS**

### 4.1. TRATAMIENTO DE LAS LARVAS

Las postlarvas empleadas en este bioensayo (PL 18), fueron tratadas en CENAIM durante 14 días. El tratamiento con cepas probióticas y temperatura alta dió como resultado una supervivencia del 94% y un peso promedio de 9,80mg.PL<sup>-1</sup>. Con los BG y temperatura alta se obtuvo una supervivencia del 94% y un peso promedio de 8,69mg.PL<sup>-1</sup>, mientras que en el control (larvas tratadas solo con temperatura alta) la supervivencia y el peso fueron del 82% y 10,41mg.PL<sup>-1</sup>, respectivamente. Tanto los probióticos como los BG tuvieron un efecto sobre la prevalencia para WSSV, siendo del 5 % para el tratamiento con probióticos y del 0 % para el tratamiento con BG, contra el 10 % en el control (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de peso, supervivencia y prevalencia para WSV ( $\pm$  Intervalo de Confianza; IC) de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Peso (mg)	Supervivencia (%)	Prevalencia de WSV-PL5 (%)	Prevalencia de WSV-PL18 (IC)
Control	10,4	82	0	10 ( $\pm$ 8)
Probióticos	9,8	94	0	5 ( $\pm$ 1)
BG	8,7	94	0	0

### 4.2. PARÁMETROS AMBIENTALES

Durante el ciclo de cultivo, el rango de la temperatura del agua, para las 20 piscinas, se ubicó entre 31°C y 26,2°C con un promedio de 28,6  $\pm$  0,9°C a las 06h00 horas. Mientras que a las 18h00, la máxima temperatura fue de 36,6 °C, la mínima de 28,4 °C y el promedio fue de 31,2  $\pm$ 1,2°C.

La concentración de OD, registró un valor promedio de  $3,4 \pm 1,6 \text{ mg.L}^{-1}$  a las 6:00 horas y de  $9,2 \pm 1,9 \text{ mg.L}^{-1}$  a las 18:00. Desde el día 28 de cultivo se observó una clara tendencia a la caída en el OD, durante el muestreo de las 6:00 horas, llegando en varias ocasiones a valores críticos de  $0,2$  a  $1,9 \text{ mg.L}^{-1}$  en las mañanas y máximos de  $12,1$  a  $18,5 \text{ mg.L}^{-1}$  en la tarde. Estas bajas concentraciones de OD se mantuvieron hasta el final del ciclo. Los recambios emergentes fueron del 40% y 50% del volumen total de cada piscina es decir  $150 \text{ m}^3$  a  $188 \text{ m}^3$  de agua aproximadamente (tabla 4). Debido a las complicaciones de manejo provocadas por los bajos niveles de OD, la cosecha se realizó a los 85 días, 15 días antes de lo programado.

La turbidez promedio registrada en las piscinas fue de  $40 \pm 6,6 \text{ cm}$  según la lectura del disco Secchi tomada al medio día, con una concentración de  $280.000 \text{ cel.ml}^{-1}$  entre las 20 piscinas. En algunas piscinas el valor mínimo de turbidez llegó a 20 cm y el máximo a 70 cm.

La salinidad promedio en el ciclo de cultivo fue de  $35,1 \pm 2 \text{ UPS}$ .

Tabla 3. Valores promedios por tratamiento de parámetros físicos registrados durante el período de cultivo en el agua de las piscinas experimentales.

TRATAMIENTOS	OD ( $\text{mg.L}^{-1}$ )		T( $^{\circ}\text{C}$ )		Turbidez (cm)
	06H00	18H00	06H00	18H00	12H00
Probióticos 1	$3,37 \pm 3,6$	$9,1 \pm 3,9$	$28,5 \pm 2,3$	$31,1 \pm 2,6$	40
Probióticos 2	$3,29 \pm 3,5$	$9,1 \pm 4,4$	$28,5 \pm 2,3$	$31,1 \pm 2,5$	40
BG-1	$3,28 \pm 3,9$	$9,3 \pm 4,7$	$28,6 \pm 2,3$	$31,2 \pm 2,6$	40
BG-2	$3,71 \pm 3,2$	$8,5 \pm 3,4$	$28,5 \pm 1,9$	$31,0 \pm 2,4$	40
Control	$3,42 \pm 3,9$	$9,9 \pm 4,5$	$28,8 \pm 2,3$	$31,4 \pm 3,1$	40

Tabla 4. Número de recambios de agua realizados a fin de compensar las bajas concentraciones de OD., para cada piscina por tratamiento.

Piscinas	Probiótico 1				Probiótico 2				BG-1				BG-2				Control			
	A8	B10	B17	B20	A2	A4	B14	B19	A1	A9	B12	B16	B11	B13	B18	B21	A5	A6	A7	B15
16-22 Marzo	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	0	0	1	1	1	2	1	1	2
23-29 Marzo	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0	1	3	2	0	1	1	1	1	0
30-05 Abril	1	1	2	1	1	2	1	2	0	1	2	0	1	1	0	2	1	1	0	2
06-12 Abril	1	0	1	1	3	2	0	0	1	4	0	1	1	1	1	0	2	1	1	0
13-19 Abril	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	2	1	2	1
Total Recambios	4	4	5	4	7	10	5	5	4	9	7	5	6	7	3	5	8	5	5	5

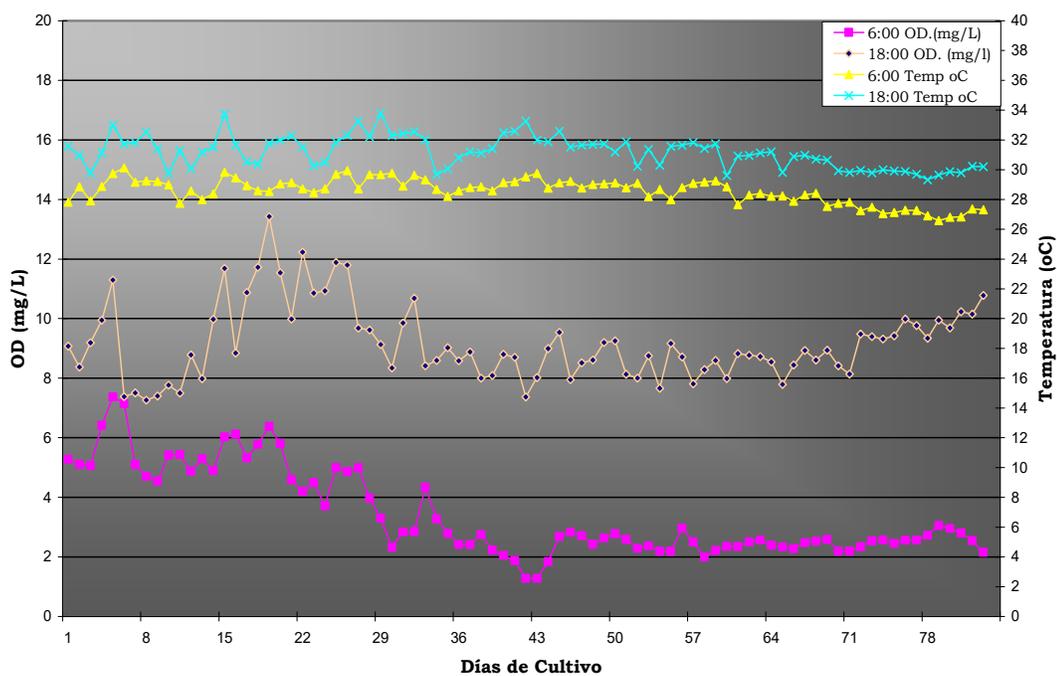


Figura 2. Promedio de la temperatura y OD de las 20 piscinas durante el ciclo de cultivo, tomados a las 06h00 y 18h00.

#### 4.3. SALUD ANIMAL

Durante el cultivo se presentó mortalidad causada por WSSV. El brote se presentó entre la séptima y novena semana, coincidiendo con las semanas en que el OD alcanzó niveles críticos (0,2 a 1,9 mg.L<sup>-1</sup>). Las muestras de camarón que fueron tomadas para el análisis histológico confirmaron niveles severos de WSD.

#### 4.4. INDICADORES DE CULTIVO

El resumen de los indicadores de cultivo y su desviación estándar se encuentra en el ANEXO 3.

##### **4.4.1. Producción**

El ciclo de cultivo tuvo una duración total de 85 días. Los resultados mostraron la mayor producción en los tratamientos probióticos 1 y BG-1, alcanzando valores de (datos proyectados por hectárea) 2337,50 libras.ha<sup>-1</sup> y 2281,25 libras.ha<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 2); observándose la más baja producción en el tratamiento control (1537,50 libras.ha<sup>-1</sup>).

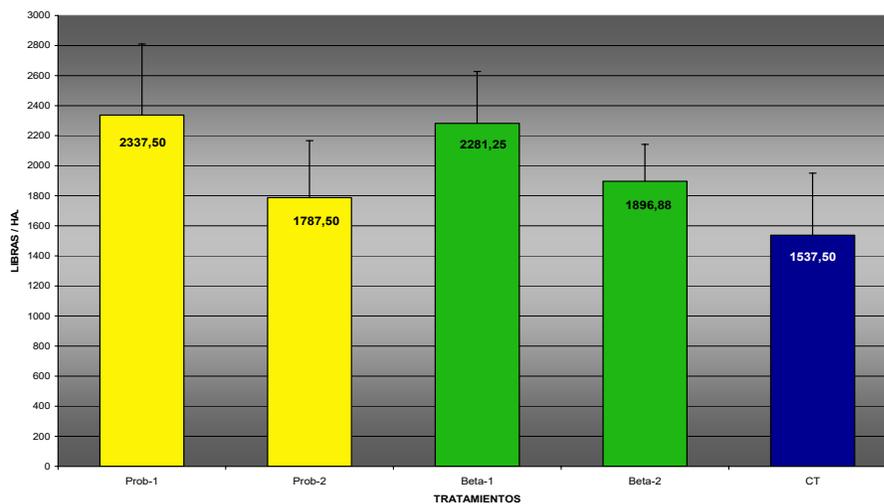


Figura 3. Proyección libras.ha<sup>-1</sup> de los cinco tratamientos empleados en el ensayo.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas a un nivel de confianza del 90% para el tratamiento probiótico 1 ( $p < 0,1$ ) y al 95% para el tratamiento BG-1 ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4.2. Supervivencia**

Numéricamente se logró obtener supervivencias mayores en todos los tratamientos versus al control (Figura 3). Con el tratamiento probiótico 1 y BG-1 se obtuvo un 34% más de supervivencia sobre el tratamiento control (Anexo 2). Sin embargo, el ANOVA realizado con los datos de supervivencia no mostró diferencias significativas entre los cinco tratamientos ( $p > 0,05$ ).

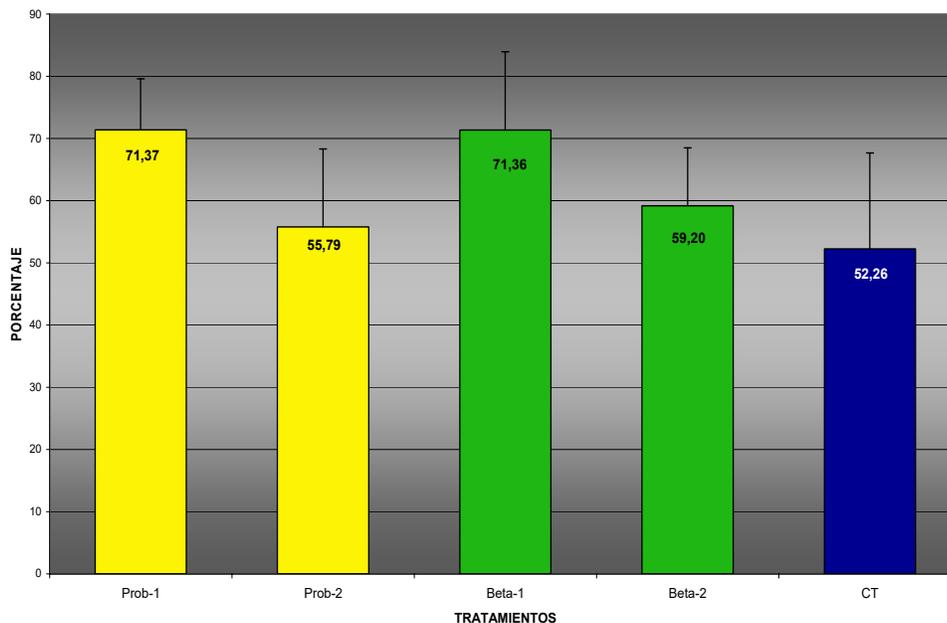


Figura 4. Supervivencias a la cosecha obtenidas de los cinco tratamientos empleados.

#### **4.4.3. Densidad de cosecha**

De la misma manera con el tratamiento probiótico 1 y BG-1 se logró obtener un incremento del 35% más de camarones por  $m^2$  que en el tratamiento control (Anexo 2). Sin embargo, el análisis estadístico efectuado con los datos de este indicador de cultivo, se observó que no existieron diferencias significativas entre los cinco tratamientos ( $p > 0,05$ ).

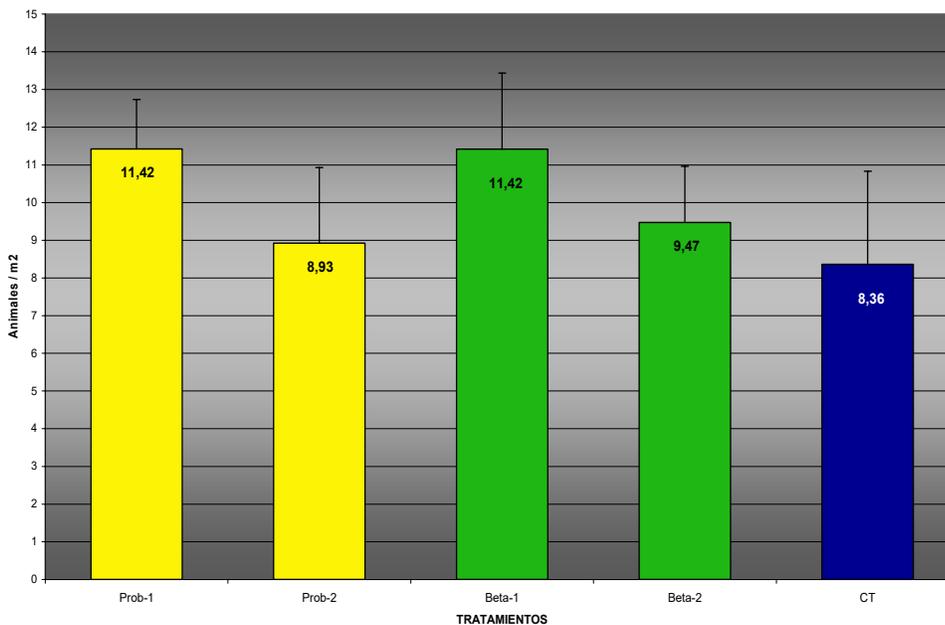


Figura 5. Densidad de cosecha (camarones.m<sup>2</sup><sup>-1</sup>) de los tratamientos.

#### 4.4.4. Crecimiento

El peso promedio final de los organismos cosechados fue de  $8,55 \pm 0,6$  g (Figura 5). El mayor promedio de crecimiento diario se obtuvo en el tratamiento probiótico 1 ( $0,105$  g.día<sup>-1</sup>) y BG-2 ( $0,102$  g.día<sup>-1</sup>), mientras que el control tuvo el menor crecimiento ( $0,093$  g.día<sup>-1</sup>). El índice de crecimiento semanal a la cosecha en probióticos 1 y en BG-2 fue de un 17% más sobre el tratamiento control (Anexo 2). Sin embargo, para los pesos finales, sólo hubo diferencias significativas entre el tratamiento BG-2 y el control ( $p < 0,1$ ).

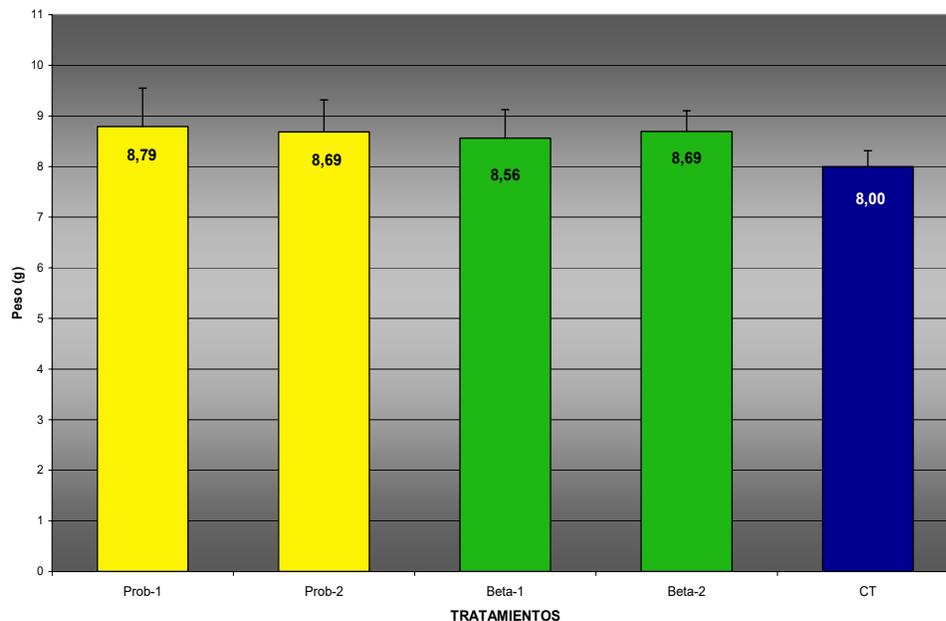


Figura 6. Peso promedio a la cosecha, alcanzado por los animales de los cinco tratamientos.

#### **4.4.5. Factor de conversión alimenticia (FCA)**

Los tratamientos con menor tasa de conversión alimenticia fueron Probiótico (1) y BG-1, mientras que el control tuvo el más alto factor de conversión de todos los tratamientos del bioensayo llegando a alcanzar una media de 2,40 (Figura 7). Es decir un 60% más alto que los dos tratamientos mencionados (Anexo 2). Encontrándose diferencias significativas entre el control y el tratamiento probiótico 1 ( $p < 0,1$ ) y entre el control y el tratamiento BG-1 ( $p < 0,05$ ).

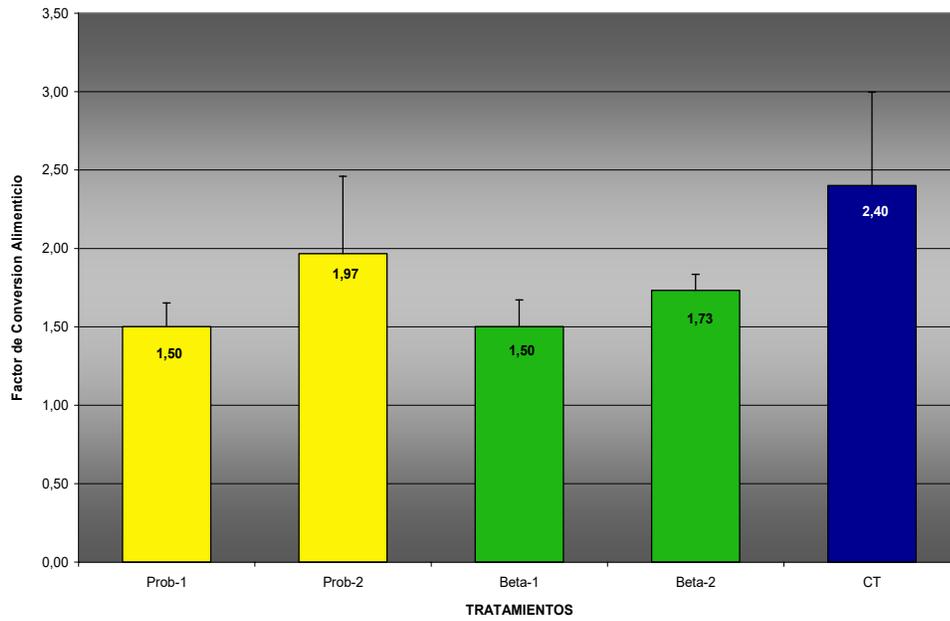


Figura 7. Medias del factor de conversión alimenticia de los cinco tratamientos.

#### 4.5. COSTO BENEFICIO DEL USO DE PROBIÓTICOS Y BG

##### 4.5.1. Costos de Investigación

El costo de los tratamientos del bioensayo proyectados por hectárea se encuentran detallados en las tablas 5, 6 y 7. En tanto el ingreso adicional en libras de camarón y en dólares americanos (USD) proyectados por hectárea se muestran en la tabla 8.

Tabla 5. Costo de BG y probióticos utilizados en el bioensayo.

Tratamientos	Unidad	Costo/unidad de inmunoestimulante. USD	Empleado unidad/ha.	Costo/ha. USD
Probiótico 1	Litro	45	3,12	140,40
Probiótico 2	Litro	45	2,62	117,90
BG-1	Kg	50	0,17	8,50
BG-2	Kg	50	0,32	16,00
Control	-	-	-	-

Tabla 6. Costos de aceite de pescado (USD) utilizados en los tratamientos y proyectados.ha<sup>-1</sup>

Tratamientos	Unidad	Costo Unidad aceite de pescado	Unidades de aceite. empleados/ha.	Costo total /ha.
Probiotico 1	Litro	0,93	78,06	72,60
Probiotico 2	Litro	0,93	76,38	71,03
BG-1	Litro	0,93	38,31	35,63
BG-2	Litro	0,93	35,77	33,27

Tabla 7. Costo total de los tratamientos e Ingreso adicional de libras y USD. Datos proyectados.ha<sup>-1</sup>

Tratamientos	Producción lbs/ha	Libras Adicionales Cosechadas	P.V.P USD	Ingreso USD	Costo Inmunoest. + Aceite de Pescado. USD	Ingreso Adicional Neto. USD
Probiótico 1	2338	800	0,95	760	213,00	<b>547</b>
Probiótico 2	1788	250	0,95	238	188,93	49
BG-1	2281	743	0,95	706	44,13	<b>662</b>
BG-2	1897	359	0,95	341	49,27	292
Control	1538	-	0,95	-	-	-

#### **4.5.2. Análisis de la inversión**

El monto de la inversión se logró determinar, tomando como referencia los costos tradicionales de inversión en una hectárea de producción de camarón por ciclo, que según el estudio ascienden a USD 890.72 por hectárea (Tabla 9). Los costos operativos adicionales en los que se incurren utilizando los tratamientos Probióticos 1 y BG-1, son de USD 213 y 44.13 respectivamente. Los cuales incrementan la inversión inicial a \$1,103.72 para el tratamiento con Probióticos y en \$ 934.85 para el tratamiento de BG. Este incremento en los costos, representan un 24% para el primer caso y el 5% para el segundo.

El cálculo de los costos de Mano de Obra y costos indirectos de producción se detallan en el Anexo No 4.

Tabla 8. Costos aproximados de inversión en una hectárea de producción tradicional de camarón.

Inversión Inicial por Hectárea por Ciclo*			
Descripción	Cantidad	Valor Unitario	Total
<b>Tratamiento inicial de la Pisina</b>			
Barbasco Kg.	18	0,20	3,60
<b>Siembra</b>			
Larvas por Millar	160	1,00	160,00
<b>Alimentos</b>			
Balanceado en quintales	24	20,00	480,00
<b>Fertilizantes</b>			
Urea Kg.	20	0,40	8,00
Super Fostato Triple Kg.	7	0,45	3,15
<b>Mano de Obra</b>			
Mano de Obra Directa Estimada por Ha.	2	40,00	80,00
Mano de Obra Indirecta Estimada por Ha.	1	25,00	25,00
<b>Costos Indirectos de Producción Estimada</b>	1	130,97	130,97
<b>Total Inversión Tradicional Aproximada</b>			<b>890,72</b>

#### 4.5.3. Proyección de ingresos

Según los resultados de nuestra investigación se logró determinar un incremento notable en la producción. Utilizando los Probióticos (tratamiento Probiótico 1) se logró cosechar 2338 libras de camarón y aplicando el BG (tratamiento BG-1) se recolectó 2281 libras. Con el cultivo tradicional (Control), solo se logró cosechar 1538 libras por hectárea.

Tabla 9. Ingreso adicional en dólares por ciclo.ha<sup>-1</sup> y tasa de retorno aplicando los tratamientos probióticos 1 y BG-1

Tratamientos	Producción Lbs	Incremento Lbs	Incremento en %	Ingreso Adicional \$	Inversión Adicional	Tasa Retorno
Control	1538	-	-	-	-	-
Probióticos 1	2338	800	52%	760	213,00	3,57
BG-1	2281	743	48%	706	44,13	16,00

En la tabla 11 se ilustra la rentabilidad del cultivo, proyectando las ganancias netas por ciclo y por año con el uso, tanto del tratamiento con probióticos 1 como de BG-1, comparados con el tratamiento control.

Tabla 10. Rentabilidad neta por ciclo y año.ha<sup>-1</sup> con la aplicación de los tratamientos Probióticos 1 y BG-1 en base a costos estimados de producción.

Tratamientos	Cantidad en Lbs.	P.V.P	Total Ventas	Total Costos	Rentabilidad Neta Estimada/ciclo/Ha.	Tasa de Rentab.	Rentabilidad Neta Estimada al Año/Ha.
Control	1538	0,95	1.461,10	890,72	570,38	39%	1.711,14
Probióticos 1	2338	0,95	2.221,10	1.103,72	1.117,38	50%	3.352,15
BG-1	2281	0,95	2.166,95	934,85	1.232,10	57%	3.696,29

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. TRATAMIENTO DE LAS LARVAS**

Desde PL4 las larvas empleadas en este estudio, fueron tratadas con probióticos y BG a una temperatura de  $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$  con la finalidad de lograr una temprana inmunoestimulación del camarón y obtener una baja prevalencia ante el virus de la mancha blanca (WSSV). Según Valladares (2006), la interacción de los dos factores temperatura y BG tienen un efecto protector contra la infección de WSSV en larvas de camarón *P. vannamei* minimizando la probabilidad de ocurrencia (o detección) del virus. Todas las larvas recibieron el probiótico *V. alginolyticus* (cepa Ili) de zoea 1 hasta PL4.

En bioensayos de desafíos con WSSV, para evaluar la supervivencia y respuesta inmune en larvas de *P. vannamei*, Rodríguez (2004) reportó que los animales cultivados con cepas probióticas tuvieron un mayor índice inmunitario que otros tratamientos de ese estudio, respondiendo al WSSV con proliferación de hemocitos.

### **5.2. PARÁMETROS AMBIENTALES**

La temperatura en el ciclo del cultivo estuvo dentro de los rangos óptimos para crecimiento y supervivencia del camarón, entre 28 y 31°C; en efecto, Ponce-Palafox *et al.* (1997), reportan como rangos óptimos 25 a 35°C para el crecimiento de estos organismos, mientras que, Wyban *et al.* (1995), indican que el rango óptimo para esta especie se encuentra entre 28° a 31°C siendo 35°C el límite máximo de resistencia a

altas temperatura (Sonnenholzner, 2002a). Rodríguez (2003), reporta también que en esta especie a partir de temperaturas inferiores a 27°C se incrementa la prevalencia de WSSV, en tanto que la patogenicidad de esta enfermedad se reduce con el incremento de la temperatura.

La productividad primaria en el agua fue baja al inicio del cultivo (50,000 cel.ml<sup>-1</sup>), siendo lo recomendado para un sistema semi-intensivo entre 80,000 cel.ml<sup>-1</sup> y 300,000 cel.ml<sup>-1</sup> (Clifford, 1994) (Anexo 5). Wyban y Sweeney, (1991) reportan que un buen nivel de productividad primaria en los estanques permite un mejor manejo del cultivo de camarón manteniendo una adecuada calidad del agua a través de diferentes mecanismos:

- Incremento en la producción de oxígeno a través de la fotosíntesis.
- Abatimiento de metabolitos y sustancias tóxicas como amonio, nitritos, gas sulfhídrico, metales pesados y otras.
- Regulación del pH en la columna de agua y sedimento.
- Prevención del desarrollo de algas filamentosas.
- Incremento de la turbidez de la columna del agua lo cual minimiza los problemas de depredación por aves.
- Aumento del apetito en el camarón y como consecuencia un incremento en el crecimiento y supervivencia de la población.

Los valores bajos de concentración de algas durante los primeros días de cultivo se acompañaron de lecturas altas del disco Secchi, así en la mayoría de las piscinas estuvo entre 60 cm y 70 cm, siendo lo recomendado para un sistema de cultivo semi-intensivo de camarón entre 35 y 40 cm (Jory, 2001). Martínez *et al* (2004), reportan que una pobre turbidez en los estanques permite el desarrollo de algas bentónicas indeseables (por la llegada directa de los rayos solares al fondo de los estanques), ocasionando problemas en el manejo del cultivo e impidiendo el desarrollo de comunidades de fitoplancton por el consumo de nutrientes. Además, estas pueden atrapar partículas de alimento y postlarvas en el fondo y su descomposición, ocasionar una alta carga orgánica, abatir el oxígeno, permitiendo el desarrollo de bacterias y malos olores.

Debido a la baja productividad primaria y a la pobre turbidez en los estanques se procedió a fertilizar. El fertilizante tuvo efectos negativos en el sistema de cultivo, una semana después de su aplicación se dió una caída brusca del OD. La combinación de Nitrógeno y Fósforo potencializó el crecimiento de dinoflagelados y cianobacterias (Donoso y Massaut, comunicación personal) de acuerdo a las observaciones de Yussof *et al* (2002). Las cianobacterias son consideradas una molestia en estanques acuícolas por aportar poco OD al medio y estar asociadas con una pobre calidad del agua y eutrofización (Paerl, 1988). El agua del sector de Palmar posee altos niveles en nutrientes y materia orgánica, producto de una mala recirculación de los efluentes de los estuarios y esto hizo que la fertilización haya sido contraproducente (Massaut, comunicación personal).

Según Martínez *et al.* (2004), no existe un régimen de fertilización que sea universalmente el mejor, ya que la eficiencia de la fertilización depende de numerosos factores tales como: características del estanque (incluyendo el tipo de suelo), estación del año (cálida-húmeda o fría-seca), características del agua, densidad de siembra y variables ambientales, entre otros.

Posiblemente; la baja concentración de OD en el cultivo durante cinco semanas consecutivas y los frecuentes recambios de agua (condiciones estresantes para el camarón), facilitaron los brotes de WSSV. Boyd y Watten (1989), reportan que niveles bajos de OD incrementan la susceptibilidad a enfermedades, aumentando la mortalidad en camarón; rangos de 0,2 -1mg.L<sup>-1</sup> (hipoxia) son letales para varias especies de peneidos (Parra, 1992). En un estudio realizado por Zenteno-Savin *et al.* (2005), en *P. vannamei*, se reportó que una reoxigenación después de condiciones de hipoxia en el cultivo, afectó el metabolismo oxidativo del hepatopancreas y músculo de camarón disminuyendo sus defensas ante patógenos existentes en el medio y ocasionando daño en los tejidos.

Se intentó manejar el problema de la hipoxia mediante recambios de agua y disminución de la ración de alimento para el camarón, sin embargo esto no fue suficiente para regular y estabilizar los niveles de OD, por lo que se anticipó el momento de la cosecha cuando los organismos presentaban un peso promedio de 8,5g. Al respecto, cabe anotar que los continuos recambios pudieron incrementar la mortalidad, por WSD (Bayot, comunicación personal).

### 5.3. INDICADORES DE CULTIVO

Todas las larvas utilizadas en este estudio recibieron un tratamiento térmico, incluso las del control, posiblemente eso influyó en los resultados de piscina. Rodríguez (2005), sugiere que la temperatura actúa de forma positiva sobre la respuesta inmune del camarón, observándose una mayor proliferación celular. Por otra parte los camarones inmunoestimulados tempranamente tienen un sistema inmune más desarrollado y están mejor preparados para enfrentar desafíos virales.

El uso de probióticos en la dieta de camarón ejerció un efecto satisfactorio en cuanto a rendimiento, supervivencia, densidad de cosecha, factor de conversión alimenticia y crecimiento en comparación con el control. De acuerdo con Conway (1990); Roques & Dussert (1991), el incremento de peso en los animales puede estar relacionado directamente a la utilización de los probióticos como fuente de alimento. La relación también puede ser indirecta por la producción de enzimas y/o vitaminas. Lo segundo mejoraría la asimilación de nutrientes, el rango de crecimiento, la supervivencia y la tasa de conversión alimenticia (Doüillet & Langdon, 1994; Garriques & Arevalo, 1995). Los probióticos influyen en los procesos de digestión al mejorar la población de microorganismos benéficos, la actividad enzimática microbiana, la digestibilidad y por tanto la salud del organismo (Bomba *et al.*, 2001). Gullian *et.al.* (2003), observaron un efecto inmunoestimulante en la salud y crecimiento en juveniles de *P. vannamei*, cuando utilizaron las cepas probióticas P62, P64 y *V. alginolyticus* en el cultivo.

La supervivencia en el tratamiento con probióticos fue alta a pesar de la presencia del brote de WSD. Un estudio realizado por Balcázar (2002), indica que el efecto de la mezcla de las bacterias probióticas P62 y P64 frente al WSSV, ejerció un efecto protector, cuando el grado de infección fue moderado.

El tratamiento probiótico 2 posiblemente no fue tan eficiente como el tratamiento probiótico 1 debido a la diferencia en la frecuencia de aplicación de las cepas probióticas en el alimento. Los animales del tratamiento probiótico 1 recibieron las cepas desde el inicio del cultivo a diferencia de los animales del tratamiento probiótico 2, que las recibieron desde la 5ta semana. Rodríguez *et al.* (2003), indican que las primeras semanas de cultivo son las de mayor riesgo y las más importantes de controlar en cualquier estrategia de manejo que pretenda incrementar la producción bajo condiciones del WSSV. Estos resultados sugieren que la aplicación de las cepas probióticas desde el inicio del cultivo produjo un mayor efecto protector y fue fundamental para alcanzar mejores supervivencias. Al respecto Bomba *et al.* (2001), declaran que la eficacia del probiótico no depende solamente de su mecanismo de acción sino de otros factores relacionados al organismo como, salud, estado nutricional, edad, estrés, genética, uso de cepas probióticas compatibles a la especie, dosis y frecuencia de administración.

De igual manera, los tratamientos con BG fueron superiores al control, en todos los indicadores de cultivo; la supervivencia no fue afectada considerablemente por el

brote de WSD durante el ciclo. Estos resultados concuerdan con Cheng-Fang *et al.* (1999), ellos demostraron la efectividad de la incorporación de  $\beta$ -1,3 glucanos en la dieta, aumentando la resistencia al WSSV de postlarvas (PL. 15) y juveniles ( $5.5 \pm 0.5$  g), de *P. monodon*. Adicionalmente, estudios realizados por Cornejo (2001), en la misma especie, mostraron también que inmunoestimulando desde postlarvas y juveniles con  $\beta$ -1,3-glucanos, se obtuvo un efecto protector ante un desafío con WSSV, logrando alcanzar supervivencias significativamente mayores (48%) que el tratamiento control (11%).

Es muy importante manejar la dosis y frecuencia de aplicación del inmunoestimulante; una excesiva inmunoestimulación en el organismo podría causar un desgaste energético reduciendo la actividad fenoloxidasa (PO), actividad antibacteriana, número de hemocitos circulantes y proteínas plasmáticas encargadas de las defensas del organismo (Cedeño *et al.*, 1999). Tal vez por esta causa, los animales del tratamiento BG-2 que recibieron una dosis final de 600 mg de BG por kg de alimento mayor que el tratamiento BG-1 ( $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), estuvieron más afectados por el brote de WSD. Posiblemente con la dosis del tratamiento BG-2 se obtuvo un mayor desgaste energético volviendo a los organismos más vulnerables ante el WSSV, reflejándose al final con menores supervivencias que el tratamiento BG-1.

Es importante recalcar que el tratamiento BG-2, a pesar de no tener supervivencias similares al tratamiento probiótico 1 y BG-1, fue el único que tuvo diferencias significativas en el peso de los organismos con respecto al control ( $p < 0,1$ ). Estos resultados sugieren un efecto positivo sobre el peso de los camarones con una mayor dosis de BG. Estos resultados concuerdan con estudios posteriores realizados en CENAIM utilizando el mismo protocolo pero en el ciclo de verano 2006 (datos no publicados). En este estudio también se obtuvo un peso significativamente superior en animales tratados con la dosis BG-2 que en los del control.

La utilización de estos tratamientos en los sistemas de cultivos de camarón han demostrados ser eficientes, manejando las dosis y concentraciones planteadas. El incremento en la producción de camarón, su bajo costo y fácil aplicación del probiótico o BG en el alimento hacen de estos aditivos una alternativa confiable y práctica para aumentar la rentabilidad de este cultivo. La inversión de aplicación de probiótico desde el inicio del cultivo se justifica económicamente por la producción de 2400 libras por año.ha<sup>-1</sup> adicionales con respecto al control. Esto representa un margen de USD 1641 de ganancia neta por ha de producción cada año, sin considerar el ahorro del 60% en el FCA. La utilidad en dólares usando el tratamiento probiótico 2 (aplicación del probiótico desde la quinta semana del cultivo) representa solo un margen de USD 147 ha cada año. Esto sugiere que si se desea incrementar la producción y la utilidad considerablemente, el probiótico debe ser aplicado desde la siembra.

Los tratamientos con BG también justifican económicamente su inversión. Con el tratamiento de BG-1 la utilidad adicional por año alcanza los USD 1986 sin considerar el ahorro del 60% en el FCA. La utilidad en el tratamiento BG-2 solo logra USD 876 de utilidad por año. Estos resultados sugieren que siguiendo los protocolos de aplicación de este estudio, los mejores resultados en cuanto a producción y ganancia se obtienen cuando se trabaja con una dosis baja de BG ( $150 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

A pesar de que con el tratamiento probiótico 1 se obtuvo una mayor producción que todos los tratamientos, con el tratamiento BG-1 se alcanzó una tasa de retorno mayor por cada dólar invertido en el tratamiento y una mayor tasa de rentabilidad. La inversión en el tratamiento BG-1 fue menor que el tratamiento probiótico 1.

En conclusión, para poder incrementar la producción de camarón, es importante mantener la salud de los organismos en todas las fases de desarrollo. No se puede obtener una buena supervivencia en las piscinas si las larvas no han recibido una buena inmunoestimulación; y una inmunoestimulación temprana de las larvas no es suficiente para mantener durante todo un ciclo de producción una protección eficaz contra las enfermedades existentes en el medio. El uso de probióticos y BG permite mejorar la salud y supervivencias del camarón, incrementar su producción ( $\text{libras.ha}^{-1}$ ) significativamente y generar un ingreso adicional (USD). La baja

inversión de estos aditivos en el cultivo, y alta respuesta en la producción hacen que estos tratamientos sean aplicables al sector productor de camarón.

## **6. CONCLUSIONES**

- 1.- La aplicación de probióticos y BG en las larvas antes de la siembra, disminuyó la prevalencia de WSSV alcanzando valores del 5% y 0% respectivamente en comparación con el tratamiento control (10%).
- 2.- Se puede lograr incrementar significativamente la producción de camarón de *P. vannamei* en un sistema semi-intensivo entre un 48% y 52% con el uso de BG y probióticos en el alimento.
- 3.- La dosis de BG en el alimento que permitió alcanzar mejores resultados en supervivencia y producción en el cultivo de camarón, fue de  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  correspondiente al tratamiento BG-1.
- 4.- El tiempo o frecuencia de administración de las cepas probióticas en el cultivo mediante el alimento, tendrían efecto sobre la supervivencia y producción. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el probiótico fue aplicado durante todo el ciclo de producción desde la siembra.
- 5.- La aplicación de una dosis mayor de BG en el alimento, no incrementó de manera significativa la supervivencia, pero si tuvo un efecto positivo sobre el peso de los organismos cultivados.

6.- Con la aplicación de los probióticos y BG se puede disminuir notablemente el factor de conversión alimenticia hasta un 60%, bajando considerablemente los costos de producción.

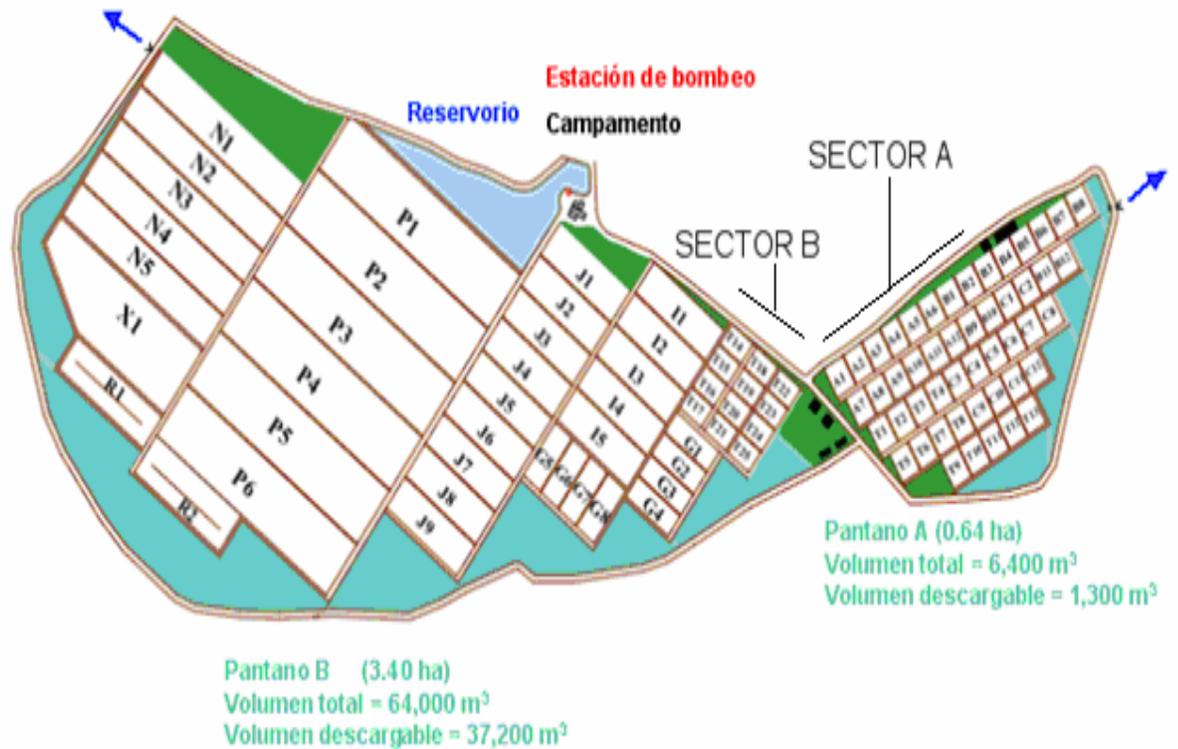
7.- Económicamente se justifica la aplicación de probióticos y BG por su baja inversión y alta rentabilidad. Con los protocolos probiótico 1 y BG-1 se puede obtener ingresos adicionales de USD 1641 y USD 1986 respectivamente por cada hectárea año de producción de camarón.

## **7. RECOMENDACIONES**

- 1.- Repetir el ensayo en invierno, sin efectuar un programa de fertilización para evitar posibles problemas de hipoxia o problemas en la calidad del agua en el ciclo de producción.
- 2.- Evaluar la respuesta de los tratamientos planteados hasta alcanzar tamaños más comerciales de los organismos (>12gramos).
- 3- Implementar nuevas técnicas que permitan introducir las cepas probióticas en el alimento a mayor escala, manteniendo las concentraciones ideales para el buen funcionamiento de las bacterias probióticas y optimizar la respuesta en el camarón.
- 4.- Evaluar la introducción del BG en el balanceado en planta, para optimizar el proceso y mejorar el manejo de las dosis requeridas por kilogramo de alimento.

## 8. ANEXOS

**ANEXO 1.** DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ÁREA DE ESTUDIO. FUERON UTILIZADAS OCHO PISCINAS DEL SECTOR A Y DOCE PISCINAS DEL SECTOR B DE LA ESTACIÓN CENAIM-ESPOL PARA ESTE ESTUDIO



TOMADA DE: QUEVEDO, 2005

**ANEXO 2. TASA DE INCREMENTO ADICIONAL DE LOS INDICADORES DE CULTIVO DE CADA TRATAMIENTO SOBRE EL CONTROL**

INDICES DE PRODUCCION	PROBIOTICO - 1	PROBIOTICO - 2	BG-1	BG-2
Tasa de supervivencia (%)	34	6	34	12
Densidad de Cosecha (m2)	35	6	35	12
Peso promedio corporal(g)	12	10	9	11
Crecimiento Diario (g.día-1)	13	10	10	12
Crecimiento semanal (g.s-1)	17	11	13	17
Producción (lbs.Ha-1)	52	16	48	23
FCA	60	22	60	39

**ANEXO 3. RESUMEN DE LOS INDICADORES DE PRODUCCIÓN DE LOS CINCO TRATAMIENTOS DEL ESTUDIO**

Parámetros de Producción	TRATAMIENTOS				
	PROBIOTICO 1	PROBIOTICO 2	BG-1	BG-2	CONTROL
Tasa de supervivencia (%)	71,37±8,24	56,35±12,94	71,36±12,60	59,20±9,30	53,08±14,12
Densidad de Siembra (m2)	16	16	16	16	16
Densidad de Cosecha (m2)	11,42±1,32	9,02±2,07	11,42±2,02	9,47±1,5	8,49±2,26
Peso promedio corporal(g)	8,79 ±0,76	8,61±0,57	8,56±0,56	8,69±0,41	7,82±0,42
Crecimiento Diario (g.día-1)	0,105±0,009	0,102±0,007	0,102±0,007	0,104±0,005	0,093±0,006
Crecimiento semanal (g.s-1)	0,83±0,04	0,79±0,06	0,80±0,03	0,83±0,05	0,71±0,07
Cosecha total (lb.)	93,50±18,93	71,50±15,18	91,25±13,84	75,88±9,82	61,50±16,54
Producción (lbs.Ha-1)	2337,50±473,24	1787,50±379,42	2281,25±346,03	1896,88±245,45	1537,50±413,57
FCA	1,50±0,21	1,97±0,55	1,50±0,21	1,73±0,15	2,40±0,73

**ANEXO 4. CÁLCULO DE LOS COSTOS DE MANO DE OBRA Y COSTOS INDIRECTOS POR HECTÁREA DE PRODUCCIÓN EN CULTIVOS SEMI-INTENSIVOS DE CAMARÓN**

*Costo de Mano de Obra Directa*

Descripción	Cantidad	Valor Unitario	Total	Costo por Hectárea por Ciclo*
Dos operarios trabajan y controlan 20 hectáreas promedio				
Sueldo Operario	2	200	400	80
<b>Total Costo de Mano de Obra Directa</b>				<b>80</b>

*Costo de Mano de Obra Indirecta*

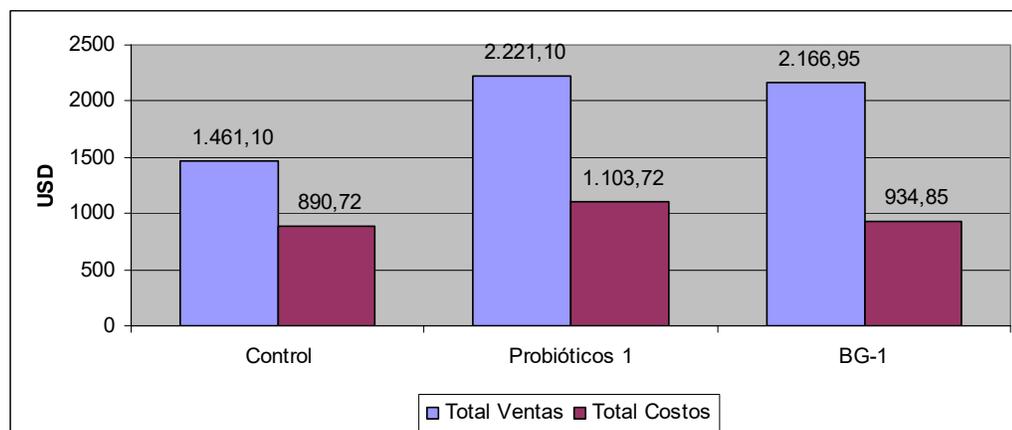
Descripción	Cantidad	Valor Unitario	Total	Costo por Hectárea por Ciclo*
Un supervisor puede manejar una camaronera de 80 hectáreas promedio				
Sueldo Supervisor	1	500	500	25
<b>Total Costo de Mano de Obra Indirecta</b>				<b>25</b>

Ciclo de 4 meses

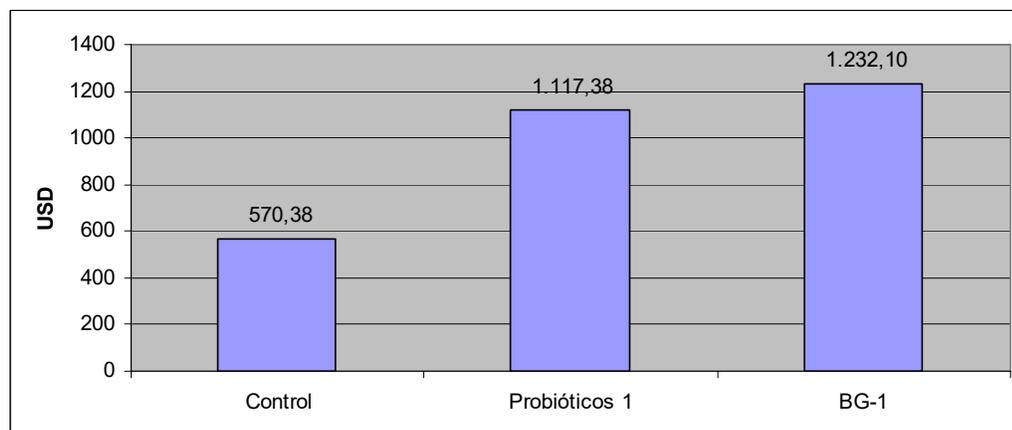
*Costos Indirectos de Producción.*

Descripción	Cantidad	Valor Unitario	Total	Costo por Hectárea por Ciclo*
Diesel utilizado en 18 horas de Bombeo en Gl.	40	1,04	41,60	41,28
Movilización de Materiales e insumos	1	25,00	25,00	25,00
Servicios Básicos, mantenimiento, pesca, varios	1	64,69	64,69	64,69
<b>Total Costos Indirectos de Producción</b>				<b>130,97</b>

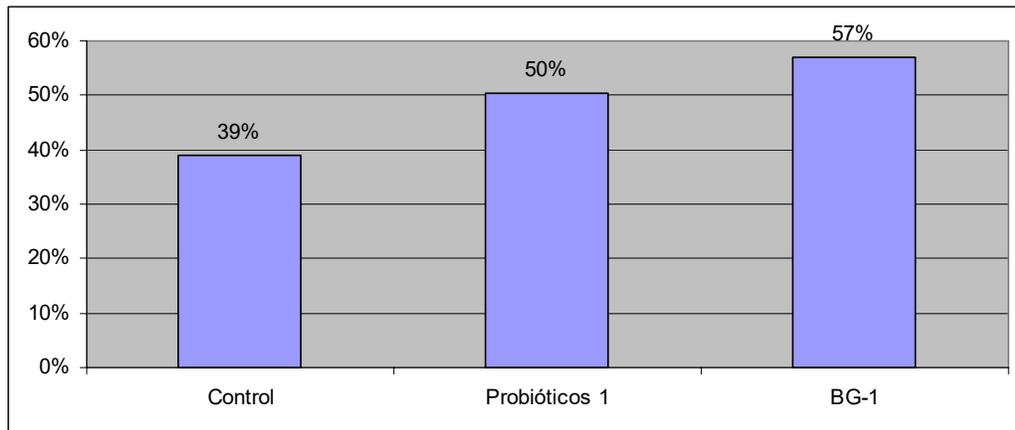
**ANEXO 5. INGRESOS Y COSTOS DE PRODUCCIÓN POR CICLO.HA<sup>-1</sup> CON LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS PROBIOTICO 1, BG-1 Y CONTROL**



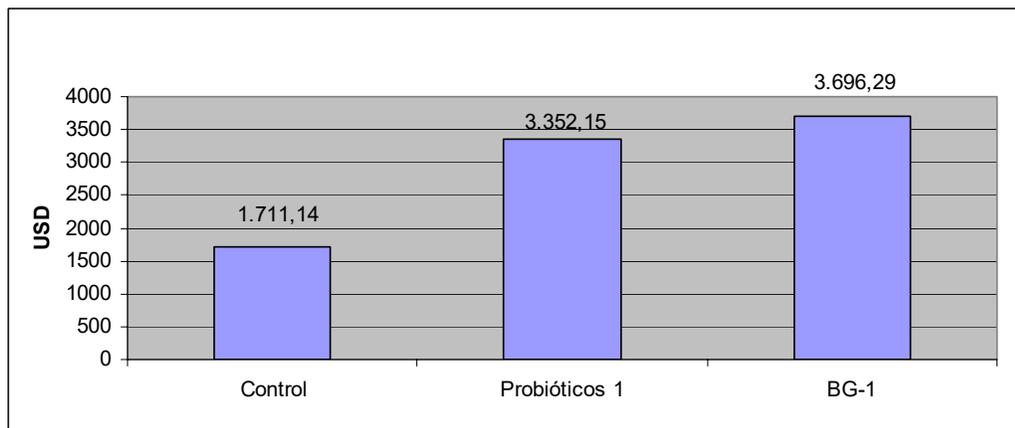
**ANEXO 6. RENTABILIDAD NETA POR CICLO.HA<sup>-1</sup> Y POR TRATAMIENTO EN BASE A COSTOS ESTIMADOS DE PRODUCCIÓN**



**ANEXO 7. TASAS DE RENTABILIDAD POR TRATAMIENTO POR CICLO.HA<sup>-1</sup>**



**ANEXO 8. RENTABILIDAD NETA ESTIMADA POR AÑO.HA<sup>-1</sup> APLICANDO LOS TRATAMIENTOS PROBIÓTICOS 1 Y BG-1 EN UN CULTIVO DE CAMARÓN VERSUS AL TRATAMIENTO CONTROL**



**ANEXO 9.** DENSIDADES DESEABLES DE FITOPLANCTON (CEL.ML<sup>-1</sup>) EN ESTANQUES DE CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE CAMARÓN (ADAPTADO DE CLIFFORD 1994)

Componente del Fitoplancton	Células/mL	
	Mínimo	Máximo
Bacillariophytes and Chrysophytes (diatomeas)	20,000	
Chlorophytes (green algae)	50,000	
Cyanophytes (blue-green algae)	10,000	40,000
Dinophytes (dinoflagellates)	---	500
<b>Total de células en el fitoplancton</b>	<b>80,000</b>	<b>300,000</b>

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G. 1994. Evaluación Nutricional de diferentes levaduras como fuentes de proteína y/o Probiótico en la alimentación de camarón blanco *P. vannamei*. F.C.B. U.A.N.L. Tesis de maestría. pp 1-110.
- Alpuche, J., C. Angundis, C. Solórzano, y A. Pereyra. 2003. Lectina en *L. Setiferus* una alternativa en cultivo ante enfermedades que afecten al cultivo de camarones (Lectins from *L setiferus* a posible solution for culture shrimp diseases). Laboratorio de inmunología, departamento de bioquímica, Facultad de Medicina UNAM, 04510 México. Revista Electrónica de veterinaria REDVET ISSN 1695-7504.
- Austin, B., L.F. Stuckey, P. Robertson, I. Effendi, y D. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. Journal of Fish Diseases 18. 93-96.
- Balcázar, J. 2002. Evaluación de Mezcla de cepas probióticas en juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de grado, Universidad de Machala, Machala, Ecuador.
- Barracco, MA., B. Duvic, y K. Söderhäll. 1991. The  $\beta$ -1, 3-glucan- binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a  $\beta$ -1,3-glucan, induces spreading and de-granulation of crayfish granular cells. Cell Tissue Res 266:491-497.

- Bergey, L. 1994. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Noel. R. Krieg (ed.). Editorial Williams & Wilkins. Baltimore. London. 8(2):4-6.
- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno estimulación de camarones peneidos. En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M. y Civera, R., (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Bell, T., y D. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society. State of Hawaii, Arizona. USA. 2-3.
- Bomba, A., R. Nemcoá, S. Gancarciková, R. Herich, P. Cuba, y D. Mudronová. 2001. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodex-trins, fruco-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids, British Journal of Nutrition 88 (Suppl. 1), 55-99.
- Boyd, C., y B. Watten. 1989. Aeration systems in aquaculture. Rev Aquat. Sci. 1, 425-472.
- Bravo, M. 2004. "Efecto sobre la supervivencia en engorde de la combinación inmunoestimulación e hipertermia aplicada a camarones *Litopenaeus vannamei*". Reporte Técnico. Fundación CENAIM- ESPOL.
- Burgos, F. 2005. "Efecto de las cepas probióticas P62 (vibrio sp.) y P64 (Bacillus sp.) en un sistema de cultivo del camarón *Litopenaeus vannamei*". Tesis de

- Magister en ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Cadena, E. 2001. “ Relación entre el ciclo de Muda y actividad de las Enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el Crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Cedeño, R., C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela, M.A. Sotomayor, y J. Rodríguez. 1999. Aspectos nutricionales e inmunoestimulación. V Congreso ecuatoriano de acuicultura, Guayaquil, Ecuador.
- Cedeño, R., M.A. Sotomayor, F. Burgos. 2005. Probióticos y su aplicación en el cultivo de camarón en Ecuador. VII Congreso ecuatoriano de acuicultura Guayaquil, Ecuador.
- Chang, Ch. 1999. Effect of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 36:163-168.
- Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su, I.C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary 1-3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 10, 505– 514.
- Cheng-fang, Ch., S. Mao-Sea, Ch. Houng-Yung, L. Chu-fang, K. Guang-Hsiung, y L. l-Chiu. 1999. Effect of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms: 31(36):163-168.

- Clifford, H. 1994. El manejo de estanques camaroneros: estudio manejo de un estanque. En: Zendejas-Hernández J (ed). Memoria del Seminario Internacional de Camarones "Camarón 94". 10-12 de Febrero, Mazatlán, Sinaloa, México. 38-50.
- Conway, P. 1990. Effect of probiotic administration and dietary composition on gastrointestinal microflora of turbot. Annual report 1990/91, University of Goteborg, Sweden. P. 1-8.
- Cornejo, F. 2001. Estudio de la resistencia contra el virus de la Mancha blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei* inmunoestimulado y su posible relación con inmunidad adaptativa. Escuela Académica Profesional de Pesquera, Perú.
- Douillet, P.A., y C.J. Langdon. 1994. Use of probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thumberg). Aquaculture. 119,25-40.
- Douillet, P. 1998. Aplicación de la biotecnología en el control de la calidad de agua. En Memorias de II Symposium Internacional de Acuicultura. Mazatlan, Sinaloa, Mexico. 5(3): 55-57.
- Duvic, B., y K. Söderhäll. 1990. Purification and characterization of a  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem 265:9332-9337.
- Duvic, B., y K. Söderhäll. 1994. Purification and partial characterization of a 1,3  $\beta$ -glucans-binding protein-membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Eur. J. Biochem; 207: 233-238.

- Douillet, P. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 182:241-248.
- Estrada, A., C.H. Yun, A. Van Kessel, B. Li, S. Hauta, y B. Laarveld. 1997. Immunoregulatory Activities of Oat Beta-Glucan in Vitro and in Vivo. *Microbial Immunol.* 41 (12): 991-998.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals-a review. *J Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Garriques, D., y G. Arévalo. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (ed)., *Swimming Throught Troubled Water. Preceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture '95.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, 53-59.
- Gatesoupe, F. 1993. Elevage Larvaire du Turbot: Ls Probitiques la Rscousse. *Aqua. Reveu.* 48. 25-28.
- Gatesoupe, F. 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture.* 180: 147-165
- Gómez, G., T. Mayen, A. Roque, JF. Turnbull, V. Inglis, A. y L. Guerra. 1998. Species of vibrios isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 163, 1-9.

- Gómez-Gil B., A. Roque, y J. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191, 259-270.
- Griffith, D.R. 1995. Microbiology and the role of Probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: P. Lavens, E. Jaspers, I Roclants (ed). Larvi'95-Fish and Shellfish Larviculture Symposium European Aquaculture Society, Special Publication Gent, Belgium.
- Guerrero, M. 2006. Vuelve la Bonanza Camaronera. *Diario El Universo*, Sección Economía, Pag. 15.
- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Gullian, M., F. Thompson, y J. Rodríguez. 2003. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233 (2004) 1 –14.
- Günther, J., y R. Jiménez. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio; *Rev.Biol.Trop.* (Int.J.Trop.Biol.ISSN-0034-7744) vol.52(4):937943, Diciembre 2004 ([www.tropiweb.com](http://www.tropiweb.com)).

- Hashimoto, T., N. Ohno, Y. Adachi, y T. Yadomae. 1997. Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal beta-glucans. *Biol Pharm Bulletin*. 20 (9): 1006-1009.
- Intriago, P., y D.A. Jones. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 13. 115-127.
- Intriago, P. 1996. Métodos para la manipulación de poblaciones bacterianas en acuarios de camarón para la prevención o limitación de expresión de patógenos. Resumen de conferencia Aqualab, S.A. Guayaquil, Ecuador pp 1-7.
- Irianto, A., y B. Austin. 2002. Probiotics in Aquaculture *Journal of fish Diseases*. *Aquac. Mag.* 25,633-642.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakayawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo, y Y. Takahashi. 1998. Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164:272-28
- Jory, D.E. 1998. Use of probiotics in penaeid shrimp growout. *Aquac. Mag.* 24: 62-67.
- Jory, D. 2001. Manejo integral de alimento de camarón, de estanques de reproducción, camaroneros y principios de bioseguridad. Curso Lance en acuicultura 26-30 de marzo 2001. Monterrey Nuevo León, México.

- Kennedy, S.B., J.W. Tucker, C.L. Neidig, G.K. Verner, V.R. Cooper, J.L. Jarrell, y D.G. Sennett. 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snok (*Centropomus undecimalis*). *Bull.Mar.Sci* 62,573-588.
- Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye. 1996. Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR, *Fish Pathology*, 31(2), 93-98.
- Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chour, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang, y G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase Chain reaction. *Diseases Aquatic Organisms*. 25,133-41.
- Maeda, M., y I. Liao. 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bull.Natl.Res. Inst. Aquaculture* 21,25-29.
- Maeda, M., K. Nogami, y N. Ishibashi. 1992. Utility of microbial food assemblages for culturing of *Portunus trituberculatus*. Abstract: *Buul. Natl. Res. Inst. Aquacult. (Japan/yoshokukenho)* 21. 31-38., ISSN 0389-5858.
- Marriott, F. 2003. Análisis del sector camaronero; Apuntes de Economía No 29. Dirección general de Estudios.
- Martínez, L., A. Campaña, y M. Martínez. 2004. Manejo de la productividad natural en el cultivo del camarón. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

- Molina, C. 2002. Efecto de la suplementación de glucanos y vitaminas C y E en la producción de camarón *Litopenaeus vannamei*. Boletín Informativo No.61, Fundación CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.
- Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*. 151,33-349.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. 164,351-358.
- Moriarty, D. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. En: Proceedings of the 8 International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C., Brylinsky, M. and Johnson, G., (Eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
- Moss, S., B.R. Leamaster, y J.N. Sweeney. 2000. Relative abundance and species composition of Gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. *J World Aquac Soc.* 31,255-263.
- Nanba, H., y K. Kubo. 1997. Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention. *Acad Sci.* 833 (3): 204-7.
- Otero, V. 2001. Evaluación de los  $\beta$ -Glucanos como inmunoestimulantes del sistema de defensa del camarón blanco *Penaeus vannamei* (Boone,1931). Tesis de grado, Universidad Laica "Eloy Alfaro", Manta, Ecuador.

- Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnology and Oceanography* 33:823-847.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Animal Nutrition Health*. 29, 4-8.
- Pascual, C., G. Gaxiola, y C. Rosas. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology*, 2003 (142): p. 735-745.
- Peeters, M., y J. Rodríguez. 1999. Problemas Bacterianos en la Industria Camaronera Ecuatoriana, Prácticas de Manejo y Alternativas de Control. *El mundo Acuícola Fundación CENAIM-ESPOL*. Vol. 5, No 1, pp. 13-18.
- Ponce-Palafox, J., C.A. Martínez-Palacios, y L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and Temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp. *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157:107-115.
- Queiroz, J.F., y C.E. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.* 29,67-73.
- Rabinowitz, J.C., y M. Roberts. 1986. Translational barriers limiting expression of E.coli genes in Bacillus and other Gram-positive organisms. In: Levy, S. B, Novick R. P (ed). *Banbury Report 24: Antibiotic Resistance Genes: Ecology, Transfer and Expression*. Cold Spring Harbour Laboratory. Pp. 297-312.

- Raa, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds, Avances en nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Merida Yucatan, Mexico, P. 47-56. [jan.raa@biotec.as](mailto:jan.raa@biotec.as).
- Regueira, E. 2001. Patrones espaciales y temporales de la producción camaronera en el Golfo de Guayaquil. Tesis de Magister en ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, y P. Menasaveta. 1998. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11) Aquaculture. 191:271-288.
- Rodríguez, R., J.M. Ameneiros, L. Sánchez, Y. Acosta, y T. Pérez. 1998. Secado y evaluación de parámetros físico-químicos y biológicos del producto obtenido. Rev. Salud Anim. 20 (2): 1028-1033.
- Rodríguez, R. 2000. Determinación de la isoterma de absorción del  $\beta$  1-3 glucano (EVIMUNK). Rev. Salud Anim. 22 (2): 130-131.
- Rodríguez, J., R. Cedeño, C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela, y M.A. Sotomayor. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Rodríguez, R. 2003. La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón. Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.

- Rodríguez, J. 2003a. Inmunoestimulación temprana de camarones *L. vannamei* para inducir un mejor desarrollo del sistema inmune y resistencia al WSSV. Resultados en estanques de engorde. CENAIME informa, Boletín informativo No 87.
- Rodríguez, J. 2003b. El incremento en la supervivencia al WSSV por efecto de la inmunoestimulación sería una característica familiar en *Litopenaeus vannamei*, CENAIME Informa, Boletín Informativo No 94.
- Rodríguez, J., F. Echeverría, C. Molina, y S. Sonnelhozner. 2003. “El efecto combinado de una precria en hipertermia e inmunoestimulación. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos semi-intensivos en condiciones de wssv”. Revista El mundo acuícola, Fundación CENAIME-ESPOL.
- Rodríguez, J. 2004. Inmunoestimulación temprana de camarones *Litopenaeus vannamei* para inducir un mejor desarrollo del sistema inmune y resistencia al WSSV. CENAIME INFORMA, Boletín informativo No 99.
- Rodríguez, J., F. Echeverría, A. Arias, y J. Apolo. 2004. El efecto combinado de una precria en invernadero e inmunoestimulación con  $\beta$ -1,3-glucanos sobre el cultivo de camarón *L. vannamei* en el verano del 2003, CENAIME Informa Boletín Informativo No 108.
- Rodríguez, J. 2005a. Efecto sobre la respuesta inmune y la supervivencia a desafíos con WSSV de la combinación temperatura inmunoestimulantes. CENAIME Informa, Boletín informativo No 125.

- Rodríguez, J. 2005b. Información sobre el uso de inmunoestimulante en cultivo de camarón con particular referencia a los  $\beta$ -glucanos. CENAIM Informa, Boletín informativo No 129.
- Roques, C., y L. Dussert. 1991. The interest of live yeast supplementation in aquaculture and its providing effects on feed conversation. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 14,37-45.
- Rorstad, G., P.M. Asjord, y R. Robertsen. 1993. Adjuvant effect of yeast glucan in vaccine against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmon salar*) Fish Shellfish immunology. 3,179-190.
- Sánchez, L., J. Noda, M. Pedroso, D.R. Iglesias. 1995. Beta 1-3 Glucano A partir de *Saccharomyces cerevisiae*: Aislamiento y Caracterización. Rev. Salud Anim. 17 (1): 9-17.
- Sánchez, L. 1997. Obtención, caracterización y producción a escala piloto de un polisacárido,  $\beta$  (1-3) glucano con actividad inmunomoduladora. La Habana 103 h. Tesis (en opción del grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Söderhäll, K., y V.J. Smith. 1983. Separation of the haemocytes populations of *carrcinus maenas* ad other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7:229-239.
- Söderhäll, K. 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods Ann. Boll. Zool; 59:141-151.

- Söderhäll, K., y L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*, 3-23.
- Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Perez, I. Betancourt, F. Echeverria, y F. Panchana. 2002a. Supervivencia, prevalencia del virus y respuesta inmune de camarones juveniles, *L. vannamei*, desafiados a WSSV a diferentes temperaturas. CENAIM-INFORMA Boletín informativo No.48
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuo, y Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus sp.* Strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. 165,269-280.
- Sung, H.H., G.H. Kou y Y.L. Song. 1993. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 29 (1), 11-17.
- Sung, H.H., G.H. Kou, y Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11-17.
- Sung, H.H., Y.L. Yang, y Y.L. Song. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* vía immunostimulation, *Journal of crustacean biology*, 16 (2): 278-284.
- Tang, K., y D.V. Lightner. 2000. Quantification of White spot syndrome virus DNA though a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189 : 11-21.
- Talavera, V., D. Sánchez, y M. Zapata. 2005. Alimentación en el cultivo de camarón. *Manual de cultivo de camarón* pag. 25.

- Taobada, A., L. Sánchez, T. Gómez, E. De Armas. 2001. Caracterización física de una suspensión de  $\beta$  1-3 glucano obtenido a partir de *Saccharomyces cerevisidae*. Rev. Salud Anim. 23 (3): 175-180.
- Thompson, F., C. Thompson, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gullian, J. Swings. 2004. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. International Journal of Systematic and Evolutionaty Microbiology 53, 1495-1501.
- Valladares, A. 2006. “Tratamientos basados en alta temperatura y  $\beta$ -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de *Penaeus vannamei*”. Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- Vargas, A.F., C.I. Higuera, V.F. Jimenez, L.J. Hernandez, G.T. Gollas, y P.G. Yepiz. 1999. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Avance en Nutrición Acuícola III: 433-439.
- Vargas-Albores, F., y G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture 191, 13–21.
- Verschuere, L., NET. Rombaut, P. Zorruelos, y W. Verstraete. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. Microbiology and Moleclar Riology Reviews. 64, 655-671.

- Vetvicka, V., B.P. Thornton, T.J. Wieman, G.D.J.Ross. 1997. Targeting of natural killer cells to mammary carcinoma via naturally occurring tumor cell-bound iC3b and beta-glucan-primed CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 159 (2): 599-605.
- Wang, X., H. Jiw, y H.S. Xu. 1999. Application of probiotic. Aiken Murray Corp. 237-249pp.
- Wyban, J.A., y J.N. Sweeney. 1991. Intensive Shrimp Production Technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, U.S.A. 158 p.
- Wyban, J., W.A. Walsh, y D.M. Godin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific shite shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture.* 138, 267-279.
- Yasuda, K., y T. Kiatoa. 1983. Bacterial Flora in the Digestive Tract on Prawns, *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture.* 19. 229-234.
- Yusoff, F.M., M.S. Zubaidah, H.B. Matias, y T.S. Kwan. 2002. Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. *Aquaculture Research* 33 Issue 4 Page 269.
- Zenteno-Savin, T., R. Saldierna, y M. Ahuejote-Sandoval. 2005. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Article in press, Page 9.

Ziemer, C.J., G.R. Gibson. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8, 473–479.