

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en la camaronera Las Animas, El Salvador.

POR:

Br. Luis Miguel Delgado Diaz

Ciudad Universitaria, Julio de 2019.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**



Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en la camaronera Las Animas, El Salvador.

POR:

Br. Luis Miguel Delgado Diaz

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:

Ingeniero Agrónomo

Ciudad Universitaria, Julio de 2019.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

LIC. M. Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

LIC. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

DECANO

Ing. M. Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO

Ing. M. Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Ing. Agr. Ludwing Vladimir Leyton Barrientos

DOCENTES DIRECTORES

Ing. Agr. M.Sc. Napoleón Edgardo Paz Quevedo

Lic. M.Sc. Norma Esthela Molina Velásquez

Lic. Armando Navarrete Soriano

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García

RESUMEN

La investigación se realizó en la camaronera Las Animas ubicada en cantón Animas Abajo, Zacatecoluca, La Paz, en el periodo de agosto de 2016 a septiembre de 2017. Se realizó en dos etapas, las cuales consistían en una fase de laboratorio, en la cual se recolectaron muestras de camarones de cuatro estanques, de estos se realizó el aislamiento de *Lactobacillus*, de los cuales se obtuvieron 40 cepas, de estas se seleccionaron cuatro a las cuales se le realizaron las pruebas de factibilidad probiótica, obteniendo al final dos cepas que cumplían todos los requerimientos como probióticos, siendo estas las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* (E91) y *Lactococcus lactis* (E33). La segunda fue una fase de campo, donde se evaluó el probiótico a base de bacterias ácido lácticas nativas contra un probiótico comercial EPICIN® G2. Se configuraron cuatro tratamientos los cuales, dos contenían las bacterias nativas más el biorremediador EPICIN® PST y dos con el probiótico comercial más el EPICIN® PST, los resultados de los tratamientos conformados por bacterias ácido lácticas más EPICIN® PST presentaban un menor deterioro de los parámetros del agua, Aunque las aguas se clasificaron como pobres según el ICA (Índice de Calidad del Agua), los probióticos nativos presentaron poca variabilidad entre sus constantes, este dato fué concordante con el análisis del Índice de Estado Trófico (TRIX por sus siglas en ingles), que las aguas del estero según este índice se clasifican como Hipertróficas. En los parámetros productivos los tratamientos con bacterias ácido lácticas generaron mayor eficiencia, ya que la sobrevivencia para los tratamientos T3 y T4 es de 47.56% y 45.68%, superando a los tratamientos control T1 y T2 con 44.57% y 38.97%, al igual que en la sobrevivencia de los estanques con bacterias nativas, se tuvo mayor eficiencia en cuanto al rendimiento en la producción, ya que los T3 y T4 presentaron un rendimiento de 6,806.36 kg y 5,414.55 kg, mientras que T1 y T2 registraron un rendimiento de 5,544.09 kg y 5,387.27 kg. Al mismo tiempo se realizó un análisis de beneficio costo el cual demostró que al utilizar las bacterias ácido lácticas como probióticos se produce una reducción en costos operativos, ya que los T3 y T4 producen un egreso de \$62,614.63 y \$55,481.78 contra los egresos de los T1 y T2 que fue de \$94,105.33 y \$74,456.95; indicando que para los T3 y T4 se realizó un retorno de \$1.39 y \$1.25 por cada dólar invertido, mientras que los T1 y T2 se realizó un retronó de \$1.10 y \$1.15 por cada dólar invertido.

El *Lactococcus lactis* y el *Lactobacillus paracasei* aisladas del tubo digestivo de los camarones cultivados están dentro de la lista de bacterias que se pueden utilizar como probióticas en el cultivo de camarones en estanques.

Palabras clave: Camarón blanco, Bacterias Ácido lácticas, Probiótico, Biorremediador, Bacterias nativas, Eutrofización, ICA, TRIX, *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*.

ABSTRACT

The research was carried out in the Las Animas shrimp farm located in Canton Animas Abajo, Zacatecoluca, La Paz, from August 2016 to September 2017. It was carried out in two stages, which consisted of a laboratory phase, in which shrimp samples were collected from four ponds, of which *Lactobacillus* was isolated, from which 40 strains were obtained, of these four were selected to which the probiotic feasibility tests were carried out, obtaining at the end two strains that met all the requirements as probiotics, being these the lactic acid bacteria *Lactobacillus paracasei* (E91) and *Lactococcus lactis* (E33). The second was a field phase, where the probiotic based on native lactic acid bacteria was evaluated against a commercial probiotic EPICIN® G2. Four treatments were configured, two of which contained the native bacteria plus the EPICIN® PST bioremediator and two with the commercial probiotic plus the EPICIN® PST, the results of the treatments formed by lactic acid bacteria plus EPICIN® PST showed less deterioration of the water parameters, Although the waters were classified as poor according to the ICA (Water Quality Index), the native probiotics showed little variability between their constants, this data was concordant with the analysis of the Trophic Status Index (TRIX). English), that the waters of the estuary according to this index are classified as Hypertrophic. In the productive parameters the treatments with lactic acid bacteria generated greater efficiency, since the survival for the treatments T3 and T4 is of 47.56% and 45.68%, surpassing the control treatments T1 and T2 with 44.57% and 38.97%, as well as in the survival of the ponds with native bacteria, there was greater efficiency in terms of production yield, since the T3 and T4 showed a yield of 6,806.36 kg and 5,414.55 kg, while T1 and T2 recorded a yield of 5,544.09 kg and 5,387.27 kg. At the same time, a cost benefit analysis was carried out which showed that when using the lactic acid bacteria as probiotics, a reduction in operating costs is produced, since the T3 and T4 produce an outflow of \$ 62,614.63 and \$ 55,481.78 against expenditures of T1 and T2 which was \$ 94,105.33 and \$ 74,456.95; Indicating that for T3 and T4 a return of \$ 1.39 was made and \$ 1.25 for each dollar invested, while the T1 and T2 were made a rebound of \$ 1.10 and \$ 1.15 for each dollar invested.

Lactococcus lactis and *Lactobacillus paracasei* isolated from the digestive tract of farmed shrimp are among the list of bacteria that can be used as probiotics in shrimp culture in ponds.

Key words: White shrimp, Bacteria Lactic acid, Probiotic, Bioremediator, Native bacteria, Eutrophication, ICA, TRIX, *Lactobacillus paracasei* and *Lactococcus lactis*.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, Jesús, María, a todos los Ángeles y los Santos por ayudarme y protegerme en los momentos más difíciles que he pasado en mi vida.

A MIS PADRES el Ingeniero Agrónomo MIGUEL ANTONIO DELGADO GÁLVEZ y la Señora ELVIA JOSEFINA DIAZ AYALA por su apoyo incondicional

A MI HERMANO JOSE MARIO DELGADO DIAZ Y **MI CUÑADA** BEATRIZ ABIGAIL LOPEZ TREJO por sus sabios consejos para enfrentarme a situaciones difíciles en mi vida.

A MI FAMILIA DELGADO DIAZ por haberme aconsejado y ayudado en los momentos más difíciles que me he enfrentado en mi vida.

A MIS ASESORES Lic. Msc. NORMA ESTHELA MOLINA VELASQUEZ, Ing.Agr-MSc. NAPOLEON EDGARDO PAZ QUEVEDO, Lic. Blgo. ARMANDO NAVARRETE SORIANO y DR. FRANCISCO LARA ASCENCIO por su orientación desde el inicio del proceso de desarrollo y ejecución del proyecto de tesis.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y FISICOQUIMICO DE AGUA DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR ASI COMO A LOS ESTUDIANTES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DEL MEGATEC LA UNION por su colaboración en los procesos de obtención de resultados para el proceso de tesis.

A MI FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR por proporcionarme métodos, técnicas, habilidades, destrezas, conocimiento para poder convertirme en un profesional que pueda aportar herramientas que ayuden a la sociedad.

AL PERSONAL DE LA CAMARONERA LAS ANIMAS por su apoyo en la ejecución del proyecto de tesis y la recolección de datos necesarios para su análisis, discusión, conclusiones y recomendaciones.

A ISABEL CRISTINA MOLINA DE RODRIGUEZ (Q.D.D.G.) por haber contribuido de manera incondicional en apoyarme en el inicio del proceso de tesis.

A FERNANDO RAMOS por su colaboración en la realización de este documento, en la parte estadística y económica.

DEDICATORIA

A DIOS, Jesús, María, a todos los Ángeles y los Santos por ayudarme y protegerme en los momentos buenos y malos que he pasado en mi vida.

A MIS ABUELOS JOSE LUIS GALVEZ (Q.D.D.G.) y ANGELA DELGADO; BONIFACIO DIAZ (Q.D.D.G.) E HILARIA AYALA DE DIAZ (Q.D.D.G.) por ser modelos a seguir, por su orientación, por su sabiduría, por los valores que me enseñaron, destrezas, habilidades entre otros aspectos.

A MIS PADRES el Ingeniero Agrónomo MIGUEL ANTONIO DELGADO GÁLVEZ y la Señora ELVIA JOSEFINA DIAZ AYALA por su apoyo incondicional, sacrificio, amor, consejos en todo los procesos en mi vida.

A MI HERMANO JOSE MARIO DELGADO DIAZ Y **MI CUÑADA** BEATRIZ ABIGAIL LOPEZ TREJO por su apoyo incondicional ,sacrificio, amor, sus sabios consejos para enfrentarme a situaciones difíciles en mi vida.

A MI FAMILIA DELGADO DIAZ por estar a mi lado y siempre estar tratando de apoyarme y ayudarme en todo lo que necesite.

A MIS AMIGOS Y COLEGAS que siempre estuvieron pendientes de mí y me brindaron su apoyo, su amistad y desde luego la confianza en mí, infinitas gracias.

A LOS QUE FUERON PARTE DE MI DESARROLLO PROFESIONAL quienes tuvieron la confianza en brindarme la oportunidad de abrirme las puertas, en enseñarme y transmitirme sus conocimientos.

Luis Miguel Delgado Diaz.

Índice

Resumen	IV
Agradecimientos	VI
Dedicatoria	VII
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	2
2.1. Cultivo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)	2
2.2. La camaronicultura en El Salvador y su importancia económica.	2
2.3. Caracterización del complejo de Jaltepeque	3
2.4. El uso de antibióticos en la industria camaronera.	3
2.5. Probióticos.	3
2.6. Bacterias ácido lácticas como probióticos.	4
2.7. Bacterias del género <i>bacillus</i> spp, utilizadas como biorremediadores.	4
2.8. Mecanismo de acción de los probióticos.	5
2.8.1. Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal.	5
2.8.2. Producción de antibióticos.	5
2.8.3. Producción de compuestos benéficos.	6
2.8.4. Mejora de la calidad de agua.	6
2.8.5. Mejora de la calidad de los suelos.	6
2.8.5.1. Dinámica de la descomposición de la materia orgánica en un estanque:	7
2.9. Incidencia de enfermedades y su impacto en la productividad.	7
2.9.1. Género <i>vibrio</i> spp	7
2.9.2. Género <i>Pseudomonas</i> spp	9
2.9.3. Bacterias Heterótrofas.	9
2.10. Factor de Dilución.	10
2.11. Calidad de agua.	10
2.11.1. Parámetros físicos y químicos.	11
2.11.2. Parámetros biológicos.	14
2.11.3. Parámetros productivos.	16
2.12. Definición de eutrofización del agua.	17
2.13. Índice del Estado Trófico (TRIX).	17
2.14. Índice de calidad de agua (ICA)	18
3. Materiales y métodos	20
3.1. Descripción del lugar en estudio.	20
3.2. Recolección, condiciones de almacenamiento y transporte de muestras de camarones para la obtención de bacterias ácido lácticas nativas, análisis en fresco y muestras de aguas para la fase de campo.	20
3.3. Metodología de laboratorio.	21
3.3.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas.	21
3.3.2. Morfología macroscópica de los lactobacilos	22
3.3.3. Morfología microscópica y pruebas para confirmar presencia de lactobacilos	22
3.3.4. Pruebas bioquímicas de lactobacilos aislados	22
3.3.5. Cosecha de bacterias ácido lácticas.	23
3.3.6. Aislamiento y cosecha de vibrios a partir de hepatopáncreas del camarón.	23
3.3.6.1. Aislamiento de los vibrios.	23
3.3.6.2. Morfología macroscópica de los vibrios	23
3.3.6.3. Morfología microscópica de los vibrios	23

3.3.6.4.	Cosecha de los vibrios -----	25
3.3.7.	Caracterización de los lactobacilos aislados -----	25
3.3.8.	Parámetros químicos. -----	26
3.3.9.	Parámetros microbiológicos. -----	26
3.3.10.	Parámetros biológicos. -----	27
3.3.11.	Preparación de los masivos de Epicin® PST. -----	28
3.3.11.1.	Epicin® PST -----	28
3.3.12.	Preparación del masivo de bacterias ácido lácticas nativas -----	28
3.4.	Metodología de campo. -----	28
3.4.1.	Preparación de los estanques para la siembra. -----	28
3.4.2.	Preparación y aplicación de Epicin G2. -----	29
3.4.3.	Aplicación del Epicin PST y el probiotico a base de bacterias ácido lácticas nativas. -----	29
3.4.4.	Epicin PST. -----	29
3.4.5.	Probiotico a base de bacterias ácido lácticas nativas. -----	29
3.4.6.	Metodología para la cuantificación de los parámetros productivos. -----	30
3.4.7.	Parámetros físicos. -----	31
3.5.	Muestreos. -----	31
3.6.	Metodología estadística. -----	32
3.6.1.	Prueba estadística. -----	32
3.6.2.	Configuración de tratamientos y comparaciones. -----	33
3.7.	Metodología económica. -----	34
3.7.1.	Análisis de dominancia. -----	34
4.	Resultados y discusión. -----	35
4.1.	Caracterización e identificación de bacterias ácido lácticas y <i>Vibrios</i> spp a partir de intestino y hepatopáncreas (hp). -----	35
4.2.	Colecta y aislamiento de los lactobacilos -----	35
4.2.1.	Morfología microscópica de los lactobacilos -----	36
4.2.2.	Características macroscópicas de lactobacilos aislados -----	36
4.2.3.	Morfología microscópica de vibrios aislados -----	36
4.2.3.1.	Clasificación de vibrios de acuerdo a la tinción de Gram -----	36
4.2.3.2.	Pruebas bioquímicas para lactobacilos y <i>Vibrios</i> spp aislados. -----	37
4.2.3.2.1.	Pruebas bioquímicas para los lactobacilos aislado -----	37
4.2.4.	Prueba api CHL50 para lactobacilo -----	37
4.2.5.	Pruebas bioquímicas de los vibrios aislados -----	37
4.2.6.	Resumen de la caracterización probiótica. -----	38
4.3.	Fase de campo. -----	40
4.3.1.	Parámetros físicos y químicos. -----	40
4.3.1.1.	Parámetros físicos (oxígeno disuelto y temperatura del agua) -----	40
4.3.1.2.	Comparación de T2 – T3 para los muestreos de 6:00 am y 5:00 pm. -----	42
4.3.2.	Discusión de resultados para oxígeno disuelto para las comparaciones de T1 – T4 y T2 –T3 -----	44
4.4.	Discusión de resultados para temperatura del agua para las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3. -----	44
4.4.1.	Comparación de la turbidez del agua para T1-T4. -----	45
4.4.2.	Comparación de la turbidez del agua para T2-T3. -----	45
4.4.3.	Discusión de resultados para turbidez del agua para las comparaciones T1-T4 Y T2-T3. -----	46

4.5.	Parámetros químicos. -----	46
4.5.1.	Comparación de ph. -----	46
4.5.2.	Discusión de resultados para ph para las comparaciones T1-T4 y T2-T3. -----	48
4.6.	Comparación de los parámetros nitrógeno total, nitratos, nitritos, fosforo total y fosfatos para los T1- T4 Y T2 – T3. -----	48
4.6.1.	Discusión de resultados comparación de los parámetros nitrógeno total, nitratos, nitritos, fosforo total y fosfatos para los T1- T4 Y T2 – T3. -----	49
4.7.	Comparación de sílice para los T1- T4 Y T2 – T3. -----	51
4.7.1.	Discusión de resultados para el parámetro sílice en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	52
4.8.	Comparación de la alcalinidad y dureza para los T1- T4 Y T2 – T3.-----	52
4.8.1.	Discusión de resultados para los parámetros alcalinidad y dureza en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	54
4.9.	Comparación de la salinidad en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	54
4.9.1.	Discusión de resultados para la salinidad en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	55
4.10.	Parámetros biológicos.-----	55
4.10.1.	Comparación de la clorofila a para T1- T4 Y T2 – T3.-----	55
4.10.2.	Discusión de resultados para la clorofila a en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -- -----	55
4.11.	Análisis de fitoplancton-----	56
4.11.1.	Conteo de fitoplancton primer y segundo muestreo.-----	56
4.11.2.	Discusión de resultados para el parámetro de conteo de fitoplancton en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	59
4.12.	Análisis en fresco y su bacteriología para los tratamientos. -----	60
4.12.1.	Tratamiento 1 (T1). Según grado de severidad. -----	60
4.12.2.	Tratamiento 2 (T2). Según grado de seguridad. -----	61
4.12.3.	Tratamiento 3 (T3). Según el grado de severidad. -----	62
4.12.4.	Tratamiento 4 (T4). Según el grado de severidad. -----	62
4.12.5.	Discusión de resultados para el conteo de deformación tubular en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	64
4.12.6.	Discusión de resultados para el número de gregarinas en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	65
4.12.7.	Discusión de resultados para la necrosis en branquias en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	68
4.12.8.	Discusión de resultados para la presencia de nódulos hemocíticos en las comparaciones T1 – T4 Y T2 –T3. -----	70
4.13.	Relación del estado de salud de las branquias versus el contenido de nitrógeno y fósforo presente en el agua. -----	73
4.13.1.	Relación del índice de calidad del agua (ICA) y el grado de infestación de protozoarios y bacterias filamentosas. -----	74
4.14.	Bacteriología del análisis en fresco. -----	77
4.14.1.	Primer muestreo hemolinfa y hepatopáncreas -----	77
4.14.2.	Segundo muestreo hemolinfa y hepatopáncreas -----	77
4.14.3.	Discusión de resultados del muestreo de hemolinfa y hepatopáncreas para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.-----	79
4.15.	Resultados del análisis de antibiograma con prueba de kirby-bauer para bacterias del género <i>vibrio</i> spp. Aisladas de los camarones.-----	79

4.15.1. Discusión de resultados del antibiograma para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	--80
4.15.2. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio.	-----80
4.15.2.1. Primer muestreo en los T1-T2.	-----80
4.15.2.2. Segundo muestreo en los T1-T2.	-----81
4.15.2.3. Primer muestreo en los estanques t3-t4.	-----81
4.15.2.4. Segundo muestreo en los estanques t3-t4.	-----81
4.15.2.5. Comparación de ambos tratamientos.	-----82
4.15.2.6. Discusión de resultados del número de camarones colonizados con bacterias ácido lácticas y la concentración en el tracto intestinal para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	-----83
4.15.3. Comparación de la concentración de bacterias <i>vibrio</i> spp. Presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio.	-----83
4.15.4. Cuantificación de la concentración bacteriana lograda en los medios de cultivo líquido.	-----85
4.15.5. Bacterias ácido lácticas nativas	-----86
4.15.6. Bacterias aeróbicas contenidas en el Epicin PST y Epicin G2	-----88
4.15.7. Discusión de resultados de las bacterias aeróbicas contenidas en el Epicin PST y Epicin G2 para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	-----89
4.16. Índice de Estado Trófico (TRIX, por sus siglas en ingles)	-----90
4.16.1. Comparación del TRIX entre T1 Y T4 entrada.	-----90
4.16.2. Comparación del TRIX entre T1 Y T4 salida.	-----90
4.16.3. Comparación del TRIX entre T2 Y T3 entrada.	-----90
4.16.4. Comparación del TRIX entre T2 Y T3 salida.	-----91
4.16.5. Discusión de resultados del índice de Estado Trófico (TRIX) para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	-----91
4.17. Índice de la calidad de agua (ica)	-----92
4.17.1. Comparación del ICA para estanque T1 Y T4 entrada.	-----92
4.17.2. Comparación del ICA para estanque T1 Y T4 salida.	-----93
4.17.3. Comparación del ICA para los T2 Y T3 entrada.	-----94
4.17.4. Comparación del ICA para los t2 y t3 salida.	-----94
4.17.5. Índice de la Calidad del Agua general.	-----95
4.17.5.1. Comparación del valor ICA entre T1 Y T4.	-----95
4.17.6. Comparación del valor ICA para los T2 Y T3.	-----96
4.18. Discusión de resultados del índice de Calidad de Aguas (ICA) para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	-----97
4.19. Muestreo microbiológico del agua.	-----98
4.19.1. Conteo de bacterias heterótrofas mesófitas aerobias.	-----99
4.19.1.1. Muestreo de entrada.	-----99
4.19.2. Muestreo de salida.	-----100
4.20. Conteo de <i>Pseudomonas</i> spp.	-----101
4.20.1. Muestreo de entrada.	-----101
4.21. Conteo de <i>Vibrios</i> spp.	-----103
4.21.1. Muestreo compuerta de entrada.	-----103
4.21.2. Muestreo de la compuerta de salida.	-----104
4.22. Discusión de resultados de los muestreos de <i>Vibrio</i> spp, <i>pseudomonas</i> spp y bacterias heterótrofas para los comparativos T1-T4 Y T2-T3.	-----104

4.23.	Parámetros productivos.-----	105
4.24.	Comparación final de parámetros productivos.-----	112
4.25.	Discusión de resultados para los parámetros productivos.-----	113
4.26.	Análisis económico.-----	116
4.26.1.1.	Análisis de dominancia.-----	117
4.26.2.	Relación beneficio – costo.-----	117
5.	Conclusiones-----	119
6.	Recomendaciones-----	121
7.	Bibliografía-----	122
8.	Anexos-----	131

Índice de Cuadros

Cuadro 1.	Configuración de cada tratamiento.	33
Cuadro 2.	Variables de la investigación.	33
Cuadro 3.	Peso promedio de los camarones, intestino y hepatopáncreas (HP).	35
Cuadro 4.	Resultados de la colecta y aislamiento de los Lactobacilos.	35
Cuadro 5.	Resultados de la tinción de Gram para las bacterias ácido lácticas nativas.....	36
Cuadro 6.	Resultados de la tinción de Gram para bacterias del tipo Vibrio.	36
Cuadro 7.	Resultados de las pruebas de oxidasa y catalasa para las bacterias ácido lácticasnativas.	37
Cuadro 8.	Pruebas bioquímicas de las bacterias del tipo Vibrios aislados.	38
Cuadro 9.	Resultados de las pruebas de factibilidad probiótica para la caracterización de las bacterias ácido lácticas nativas.....	39
Cuadro 10.	Prueba de T de Student para el Oxígeno disuelto y Temperatura del agua en la comparación entre T1-T4 para los muestreo de 6:00 am y 5:00 pm.	40
Cuadro 11.	Prueba de T de Student para el Oxígeno disuelto y Temperatura del agua en la comparación entre T2-T3 para los muestreo de 6:00 am y 5:00 pm.	42
Cuadro 12.	Prueba de t de Student para los parámetros de Nitrógeno Total, Nitratos, Nitritos, Fosforo total y Fosfatos para los T1-T4 y T2-T3.	49
Cuadro 13.	Prueba de t de Student para el parámetro del Silice para los T1-T4 y T2-T3.....	51
Cuadro 14.	Prueba de t para los parámetros de Alcalinidad y Dureza para los T1-T4 y T2-T3.	52
Cuadro 15.	Prueba de t de Student para el parámetro de Clorofila a para T1-T4 y T2-T3....	55
Cuadro 16.	Análisis en fresco según el grado de severidad para T1 de los dos muestreos.	61
Cuadro 17.	Análisis en fresco según el grado de severidad para T2 de los dos muestreos.	61
Cuadro 18.	Análisis en fresco según el grado de severidad para T3 de los dos muestreos.	62
Cuadro 19.	Análisis en fresco según el grado de severidad para T4 de los dos muestreos.	63
Cuadro 20.	Relación del estado de salud de las branquias versus el contenido de nitrógeno y fosforo presente en el agua.	73
Cuadro 21.	Relacion del grado de severidad de infestación por protozoarios, el FCA, la cantidad de materia orgánica acumulada y el ICA en los cuatro estanques de la camaronera Las Animas.	74
Cuadro 22.	Relacion del grado de severidad de infestación por bacterias filamentosas, el FCA, la cantidad de materia orgánica acumulada y el ICA en los cuatro estanques de la camaronera Las Animas.	75

Cuadro 23. Diganostico bacteriológico de prevalencia de Vibriosis en camarones obtenidos en el primer y segundo muestreo, Camaronera Las Animas, El Salvador.....	78
Cuadro 24. Antibiograma de bacterias del genero Vibrio spp. aisladas de camarones del T1, T2, T3 y T4 de la camaronera Las Animas. 15 de junio de 2017.....	79
Cuadro 25. Comparación del número de camarones colonizados con bacterias ácido lácticas y la concentración en el tracto intestinal de los tratamientos aplicados en la camaronera Las Animas, El Salvador.....	82
Cuadro 26. Comparación del número de camarones colonizados con bacterias Vibrio spp. y la concentración en el tracto intestinal de los tratamientos aplicados en la camaronera Las Animas, El Salvador.....	85
Cuadro 27. Concentración de Lactococcus lactis y Lactobacillus paracasei en medios de cultivo líquido y en ambiente controlado de laboratorio.....	86
Cuadro 28. Concentración de Lactococcus lactis y Lactobacillus paracasei en medios de cultivo líquido y en ambiente externo, al aire libre.....	87
Cuadro 29. Concentracion de bacterias aeróbicas contenidas en el EPICIN PST y EPICIN G2 en medios de cultivo liquido tanto en ambiente controlado de laboratorio como externo, al aire libre.....	88
Cuadro 30. Índice de calidad de agua para T1 y T4.....	92
Cuadro 31. Índice de calidad de agua para T1 y T4.....	93
Cuadro 32. Índice de calidad de agua para T2 y T3.....	94
Cuadro 33. Índice de calidad de agua para T2 Y T3.....	94
Cuadro 34. Índice de calidad de agua para T1 y T4.....	95
Cuadro 35. Índice de calidad de agua para T2 y T3.....	96
Cuadro 36. Resultados de los parámetros microbiológicos del agua: Vibrio spp, Pseudomona spp y Bacterias Heterotrofas en la compuerta de entrada.....	98
Cuadro 37. Resultados de los parámetros microbiologicos del agua; Vibrio spp, Pseudomonas spp y Bacterias Heterotrofas en la compuerta de salida.....	99
Cuadro 38. Resultados de la prueba t de Student para los parámetros productivos para las combinaciones T1-T4 y T2-T3.....	106
Cuadro 39. Parámetros productivos al final de la cosecha del ciclo I productivo 2017 de los tratamientos realizados en la investigación en la camaronera Las Animas, El Salvador.....	113
Cuadro 40. Costos por tratamientos en los estanques evaluados en la investigación.....	116
Cuadro 41. Relación Beneficio-Costo.....	117
Cuadro- A 1. Formato de toma de peso de la Camaronera Las Animas.....	131
Cuadro- A2. Índice del Estado Trófico, TRIX, y calidad de agua.....	131
Cuadro- A 3. Selección del tamaño de la muestra y cálculo del porcentaje de prevalencia de un patógeno en una población determinada (Tomada de Lightner, 1996, y modificada de Amos, 1985, citado por Morales - Covarrubias (2010))......	132
Cuadro- A 4. Cantidad de postlarva a utilizar por cada estanque en estudio.....	132
Cuadro- A 5. Hoja de reporte de análisis en fresco.....	133
Cuadro- A 6. . Toma de datos de análisis físicos in situ.....	135
Cuadro- A 7. Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infección, infestación y síndrome (Tomado: Lightner, 1996).	135

Cuadro- A 8. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (tomado de Morales-Covarrubias et al., 2010).....	136
Cuadro- A 9. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por gregarinas utilizando análisis en fresco. (Tomado de Morales-Covarrubias 2010).	136
Cuadro- A 10. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por epicomensales en lámelas branquiales.....	137
Cuadro- A 11. T Student para oxígeno disuelto entre T1 y T4 6:00am.....	137
Cuadro- A 12. Comportamiento del Oxígeno disuelto entre T1 y T4 6:00am	137
Cuadro- A 13. T Student para oxígeno disuelto entre T1 y T4 5:00 pm.....	138
Cuadro- A 14. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T1 y T4 5:00 pm	138
Cuadro- A 15. T Student para oxígeno disuelto entre T2 y T3 6:00 am.....	138
Cuadro- A 16. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T2 y T3 6:00am	138
Cuadro- A 17. T Student para oxígeno disuelto entre T2 y T3 5:00pm.....	139
Cuadro- A 18. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T2 y T3 5:00 pm	139
Cuadro- A 19. T Student para Temperatura °C entre T1 y T4 6:00 am	139
Cuadro- A 20. Comportamiento de la Temperatura entre T1 y T4 6:00 am.....	139
Cuadro- A 21. T Student para Temperatura °C entre T1 y T4 5:00 pm	140
Cuadro- A 22. Comportamiento de la Temperatura entre T1 y T3 5:00 pm.....	140
Cuadro- A 23. T Student para Temperatura °C entre T2 y T3 6:00 am	140
Cuadro- A 24. Comportamiento de la temperatura entre T2 y T3 6:00 am	140
Cuadro- A 25. T Student para Temperatura °C entre T2 y T3 5:00 pm	141
Cuadro- A 26. . Comportamiento de la temperatura entre T2 y T3 5:00 pm	141
Cuadro- A 27. Comportamiento del pH en el Ciclo Productivo 2016.	141
Cuadro- A 28. Comportamiento del pH en el Ciclo productivo 2017.....	142
Cuadro- A 29. T Student para Fosforo Total entre T1 y T4 entrada.	142
Cuadro- A 30. T Student para Fosforo Total entre T1 y T4 salida.	142
Cuadro- A 31. T Student para Fosforo Total entre T2 y T3 entrada.	143
Cuadro- A 32. T Student para Fosforo Total entre T2 y T3 salida.	143
Cuadro- A 33. T Student para Nitrógeno total entre T1 y T4 entrada.	143
Cuadro- A 34. T Student para Nitrógeno Total entre T1 y T3 salida.....	144
Cuadro- A 35. T Student para Nitrógeno Total entre T2 y T3 entrada.....	144
Cuadro- A 36. T Student para Nitrógeno Total entre T2 y T3 salida.....	144
Cuadro- A 37. Comportamiento de la Salinidad en los 4 estanques.....	145
Cuadro- A 38. T Student para Nitritos entre T1 y T4 entrada.	145
Cuadro- A 39. T Student para Nitritos entre T1 y T4 salida.	145
Cuadro- A 40. T Student para Nitritos entre T2 y T3 entrada	146
Cuadro- A 41. T Student para Nitritos entre T2 y T3 salida.	146
Cuadro- A 42. T Student para la Alcalinidad entre T1 y T4 entrada.	146
Cuadro- A 43. T Student para Dureza Total del agua entre T1 y T4 entrada.....	147
Cuadro- A 44. T Student para Alcalinidad entre T2 y T3 entrada.	147
Cuadro- A 45. T Student para Dureza total del Agua entre T2 y T3 entrada.	147
Cuadro- A 46. Comportamiento de la alcalinidad y dureza del agua muestreo de entrada.	148
Cuadro- A 47. T Student para Alcalinidad entre T1 y T4 salida.....	149
Cuadro- A 48. T Student para Dureza Total del agua entre T1 y T4 salida.	149
Cuadro- A 49. T Student para Alcalinidad entre T2 y T3 salida.....	149

Cuadro- A 50. T Student para Dureza total del agua entre T2 y T3 salida.	150
Cuadro- A 51. Comportamiento de la Alcalinidad y la Dureza del agua muestreo de salida.	150
Cuadro- A 52. Tabla de T Student para La Turbidez del Agua entre T1 y T4.	151
Cuadro- A 53. T Student para Turbidez del agua entre T2 y T3.	151
Cuadro- A 54. T Student para Fosfatos entre T1 y T4 entrada.	151
Cuadro- A 55. T Student para Fosfatos entre T1 y T4 salida.	152
Cuadro- A 56. T Student para Fosfatos entre T2 y T3 entrada.	152
Cuadro- A 57. T Student para Fosfatos entre T2 y T3 salida.	152
Cuadro- A 58. T Student para Sílice entre T1 y T4 entrada.	153
Cuadro- A 59. T Student para Sílice entre T1 y T4 salida.	153
Cuadro- A 60. T Student para Sílice entre T2 y T3 entrada.	153
Cuadro- A 61. T Student para Sílice entre T2 y T4 salida.	154
Cuadro- A 62. T Student para Nitratos entre T1 y T4 entrada.	154
Cuadro- A 63. T Student para Nitratos entre T1 y T4 salida.	154
Cuadro- A 64. Tabla de T Student para Nitratos entre T2 y T3 entrada.	155
Cuadro- A 65. T Student para Nitratos entre T2 y T3 salida.	155
Cuadro- A 66. T Student para Clorofila a entre T1 y T4 entrada	155
Cuadro- A 67. T Student para Clorofila a entre E10 y E13 salida.	156
Cuadro- A 68. T Student para Clorofila a entre T2 y T3 entrada.	156
Cuadro- A 69. T Student para Clorofila a entre T2 y T3 salida.	156
Cuadro- A 70. Comportamiento de los parámetros del agua por estanque entrada.	157
Cuadro- A 71. Comportamiento de los parámetros del agua por estanque salida.	158
Cuadro- A 72. T Student para Índice de Estado Trófico (TRIX) entre T1 y T4 entrada.	159
Cuadro- A 73. T Student para Índice de Estado Trófico (TRIX) entre T1 y T4 salida.	159
Cuadro- A 74. T Student para Índice de Estado Trófico (TRIX) entre T2 y T3 entrada.	159
Cuadro- A 75. T Student para Índice de Estado Trófico (TRIX) entre T2 y T3 salida.	160
Cuadro- A 76. Comportamiento del Índice de Estado Trófico (TRIX) por estanque para los muestreos de entrada y salida.	160
Cuadro- A 77. Referencia para los rangos de calidad de agua (ICA) propuesto por Canadian Council of the Environment. 2001.	160
Cuadro- A 78. Límites permitidos para los parámetros considerados en el cálculo del Índice de Calidad del Agua (ICA).	161
Cuadro- A 79. Comparación de los parámetros del agua utilizados para el cálculo del Índice de Calidad del agua (ICA) para los estanques 10 y 13 en los muestreos de entrada y salida.	161
Cuadro- A 80. Comparación de los parámetros del agua utilizados para el cálculo del Índice de Calidad del agua (ICA) para los estanques 11 y 12 en los muestreos de entrada y salida.	162
Cuadro- A 81. Conteo de especies de algas en el Fitoplancton entre los estanques 10 y 13.	162
Cuadro- A 82. Conteo de especies de algas en el Fitoplancton entre los estanques 11 y 12.	163
Cuadro- A 83. Relación del comportamiento de la lluvias el fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 10 (T1).	163
Cuadro- A 84. Relación del comportamiento de las lluvias, fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 11 (T2).	164

Cuadro- A 85. Relación del comportamiento de las lluvias, fósforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 12 (T3).	164
Cuadro- A 86. Relación del comportamiento de las lluvias, fósforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 13 (T4).	164
Cuadro- A 87. Componentes del Fitoplancton en Número de Células por mililitro entre los estanques 10 y 13.	165
Cuadro- A 88. Componentes del Fitoplancton en Número de Células por mililitro entre los estanques 11 y 12.	165
Cuadro- A 89. Hepatopáncreas, conteo de la deformación de Túbulos por estanque.	165
Cuadro- A 90. Conteo de Gregarinas en el intestino por cada estanque.	166
Cuadro- A 91. Nematodos por campo en intestino.	166
Cuadro- A 92. Numero de Cianofitas en intestino por estanque.	167
Cuadro- A 93. Necrosis en Branquias por cada estanque.	167
Cuadro- A 94. Presencia de nódulos hemocíticos en branquias por cada estanque.	167
Cuadro- A 95. Protozoarios en Branquias por cada estanque.	168
Cuadro- A 96. Presencia de bacterias filamentosas en cada estanque.	168
Cuadro- A 97. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco T1.	169
Cuadro- A 98. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco T2.	171
Cuadro- A 99. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco del T3.	172
Cuadro- A 100. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T4.	174
Cuadro- A 101. Conteo e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T1.	176
Cuadro- A 102. Conteo e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T2.	178
Cuadro- A 103. Conteo e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T3.	180
Cuadro- A 104. Conteo e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T4.	182
Cuadro- A 105. Carga de vibrios sp. En el intestino primer muestreo.	183
Cuadro- A 106. Carga de Vibrio sp. en intestino segundo muestreo.	185
Cuadro- A 107. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio con Probiotico comercial primer muestreo.	186
Cuadro- A 108. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio con Probiotico comercial Segundo muestreo.	187
Cuadro- A 109. Concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos a tratamiento con las mismas en los T2 y T3. Primer muestreo.	187
Cuadro- A 110. Concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos a tratamiento con las mismas en los T2 y T3. Segundo muestreo.	188
Cuadro- A 111. T Student para Porcentaje de Supervivencia semanal entre los T1 y T4.	188
Cuadro- A 112. Comparación del comportamiento del porcentaje de supervivencia entre los T1 y T4.	188

Cuadro- A 113. T Student para porcentaje de sobrevivencia semanal entre los T2 y T3. ..	189
Cuadro- A 114. Comparación del comportamiento del porcentaje de sobrevivencia semanal entre los T2 y T3.....	189
Cuadro- A 115. T Student para Población en número de individuos entre los T1 y T4.....	189
Cuadro- A 116. Comparación del comportamiento de la población en cuanto al número de individuos para T1 y T4.....	190
Cuadro- A 117. T Student para población en número de individuos entre los T2 y T3.	190
Cuadro- A 118. Comparación del comportamiento de la población en cuanto al número de individuos para T2 y T3.....	190
Cuadro- A 119. T Student para la Biomasa (kg) entre los estanques T1 y T4.....	191
Cuadro- A 120. Comparación de la Biomasa (kg) por semana entre los estanques T1 y T4.	191
Cuadro- A 121. T Student para Biomasa (kg) entre los estanques T2 y T3.....	191
Cuadro- A 122. Comparación del Comportamiento de la Biomasa (kg) entre los estanques T2 y T3.	192
Cuadro- A 123. T Student para Peso (grs) entre los T1 y T4.	192
Cuadro- A 124. Comparación del Peso (grs) semanal entre los T1 y T4.....	192
Cuadro- A 125. T Student para Peso (grs) entre los T2 y T3	193
Cuadro- A 126. Comparación del comportamiento del Peso (grs) semanal entre los T2 y T3.	193
Cuadro- A 127. T Student para incremento de peso (grs) entre los T1 y T4.....	193
Cuadro- A 128. Comparación del comportamiento del incremento de peso (grs) entre los T1 y T4.	194
Cuadro- A 129. T Student para incremento de peso (grs) entre losT2 y T3.	194
Cuadro- A 130. Comparación del comportamiento semanal del incremento de peso (grs) entre los T2 y T3.....	194
Cuadro- A 131. T Student para Factor de conversión Alimenticia entre los T1 y T4.....	195
Cuadro- A 132. Comparación del factor de conversión alimenticia entre los T1 y T4.	195
Cuadro- A 133. T Student para Factor de conversión alimenticia entre los T2 y T3	195
Cuadro- A 134. Comparación del Factor de conversión alimenticia entre los T2 y T3.....	196
Cuadro- A 135. Cantidad de Alimento proporcionado por cada estanque en quintales.	196
Cuadro- A 136. Cantidad de Probiotico G2 para los tratamientos testigos.	196
Cuadro- A 137. Tabla de interpretación antibiograma.	197

Índice de Figuras.

Figura 1. Oxígeno disuelto para la comparación de 6:00 am y 5:00pm entre T1 - T4.....	40
Figura 2. Comparación de la Temperatura °C para T1 - T4.....	41
Figura 3. Comportamiento del Oxígeno disuelto para los muestreos de 6:00 am y 5:00 pm para T2- T3.	42
Figura 4. Comportamiento de la Temperatura para T2 - T3.	43
Figura 5. Comportamiento del pH para el ciclo productivo 2016.	47
Figura 6. Comportamiento del pH para el ciclo productivo 2017.	47
Figura 7. Comportamiento de la Dureza y alcalinidad del agua para los distintos tratamientos compuerta de entrada.....	53

Figura 8. Comportamiento de la Dureza y alcalinidad del agua para los distintos tratamientos compuerta de salida.....	53
Figura 9. Abundancia relativa del fitoplancton presente en los estanques control (10 y 11) y con tratamiento (12 y 13)	57
Figura 10. Precipitación promedio mensual de lluvia y concentración de clorofila a y parámetros químicos del agua en las compuertas.	58
Figura 11. Resultados del análisis en fresco hecho en 2 estanques control (10 y 11)	63
Figura 12. Número de gregarinas, incluyendo la suma de organismos en estado de esporozoito, gametocito y sicigia, presentes en el intestino medio y posterior del camarón de cultivo de 4 estanques.	64
Figura 13. Cuantificación de nematodos intestinales encontrados en camarones de cultivo tomados de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento el 12 y 13)	65
Figura 14. Cuantificación de cianofitas encontrados en camarones de cultivo tomados de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento el 12 y 13)	66
Figura 15. Cuantificación de lesiones con necrosis de tejido encontrado en lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control 10 y 11; con tratamiento el 12 y 13)	67
Figura 16. Cuantificación de nódulos hemocíticos encontrados en lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13)	69
Figura 17. Cuantificación de protozoarios epicomensales colonizando lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13)	71
Figura 18. Bacterias filamentosas encontradas en las lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13)	72
Figura 19. Comportamiento del Índice de Estado Trófico para los muestreos de entrada y salida en los diferentes estanques.	91
Figura 20. Comparación del valor ICA para entrada y salida en los T1 y T4.	93
Figura 21. Comparación del valor ICA para entrada y salida en T2 y T3.....	95
Figura 22. Comparación del valor ICA para los T1 y T4.	96
Figura 23. Comparación del valor ICA para los T2 y T3.	96
Figura 24. Comparación del Porcentaje de Supervivencia entre T1 y T4.	106
Figura 25. Comparación del porcentaje de Supervivencia para los T2 y T3.	107
Figura 26. Comparación de la densidad poblacional (número de individuos) para los T1 y T4.	107
Figura 27. Comparación de la densidad poblacional (número de individuos) para los T2 y T3.	108
Figura 28. Comportamiento de la Biomasa en Kilogramos para los T1 y T4.	108
Figura 29. Comportamiento de la Biomasa en kilogramos para los T2 y T3.	109
Figura 30. Comparación del peso en gramos entre los T1 y T4.	109
Figura 31. Comportamiento del peso en gramos para los T2 y T3.	110
Figura 32. Incremento de peso (grs) semanal para los T1 y T4.	110
Figura 33. Incremento de peso (grs) semanal para los tratamientos 2 y 3.	111
Figura 34. Comportamiento del factor de conversión alimenticia para los T1 y T4.	111
Figura 35. Comparación del factor de conversión alimenticia para los T2 y T3.	112
Figura 36. Relación beneficio – costo entre tratamientos.	118

Figura - A 1. Camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931)).....	197
Figura - A 2 . Interpretación de la fase de crecimiento de una población bacteriana.....	198
Figura - A 3. Mapas de ubicación del estudio.....	198
Figura - A 4. Estanque de cultivo de camarón donde se observan las cuatro áreas para la selección de organismos en muestreo aleatorio	199
Figura - A 5. Proceso toma de muestra, procesamiento y análisis para clorofila a.....	199
Figura - A 6. Secuencia del procedimiento de manejo de la cepas de bacterias ácido lácticas hasta la culminación con la aplicación en los estanques.....	200
Figura - A 7. Procedimiento para realizar el análisis en fresco:	201

ANEXOS.

Anexo 1. Metodología para la preparación de EPICIN PST	202
Anexo 2. Protocolo para la aplicación probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas (<i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Lactococcus lactis</i>).	204
Anexo 3. Metodología de bacteriología para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de bacterias del género <i>Vibrio</i> spp. Sometidas a los antibióticos: prueba de Kirby-Bauer.....	211
Anexo 4. Metodología de bacteriología para el aislamiento, identificación y cuantificación de bacterias del género <i>Vibrio</i> Spp. A partir de que muestra Camarones	214
Anexo 5. Toma de datos para el análisis en fresco en camarones.....	216
Anexo 6. Metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton presente en los estanques de camarón cultivado:	225
Anexo 7. Descripción de la metodología para el análisis de Clorofila a	226
Anexo 8. 4500- P Fosforo total.....	228
Anexo 9. Determinación de fosfatos en aguas por espectrofotometría.....	230
Anexo 10. 4500 Norg Nitrógeno total	231
Anexo 11. 4500 NH3 Amonio.....	233
Anexo 12. 4500 NO3- Nitrato	235
Anexo 13. 4500 NO2- Nitrógeno (nitrito)	236
Anexo 14. 2320 Alcalinidad.....	237
Anexo 15. 2340 DUREZA	239
Anexo 16. 4500- Si SILICE	240
Anexo 17. 9260 H. <i>Vibrio cholerae</i>	242
Anexo 18. 9213. Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	243
Anexo 19. 9215 Recuento heterótrofo de placa	243

1. INTRODUCCION

El cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en El Salvador es de mucha importancia socioeconómica, ya que genera empleos tanto directos como indirectos según Oddone (2013), existen 750 empleos directos y 750 empleos indirectos en el sector camaronero, además se vinculan otras áreas empresariales tales como: elaboración de concentrados, venta de equipo, maquinaria y empresas veterinarias.

En general, el uso de probióticos en el cultivo de camarón ha tenido mejores perspectivas; Villamil y Martínez (2009) mencionan que diversas publicaciones científicas han demostrado efectos positivos de la aplicación de probióticos; sin embargo, los resultados obtenidos en algunas granjas pueden ser variables debido a diferentes factores, como la calidad del probiótico, el modo de administración, la talla y las especies de camarón, que pueden afectar el resultado de las operaciones a largo plazo.

La investigación estuvo encaminada en la búsqueda de alternativas que generen una reducción de costos en la producción de camarón, así como el mejoramiento de las condiciones del medio ambiente en el estero de Jaltequepe de manera eficiente.

El objetivo general de la investigación fué la evaluación de la respuesta biológica que poseen las bacterias ácido lácticas, tanto en los parámetros del agua como en el desarrollo de los camarones blancos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), con el fin de poder generar una alternativa factible en el rubro de la camaronicultura, ya que esto conllevara aun desarrollo de la localidad, debido a los beneficios en cuanto a la reducción del impacto ambiental.

Debido a toda la problemática en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) surge la iniciativa de realizar la presente investigación que consistió en incorporar bacterias ácido lácticas nativas como probióticos y el biorremediador con el objetivo de analizar los parámetros químicos y el parámetro biológico (clorofila a) por medio del Índice del Estado Trófico (TRIX) e Índice de Calidad de Agua (ICA), como también los parámetros físicos, parámetros microbiológicos, análisis en fresco y parámetros productivos. También se determinó la relación beneficio-costos para observar la rentabilidad del uso de probióticos bajo esta técnica. Además se desarrolló con la finalidad de demostrar, si con el uso de probiótico se contribuirá a prevenir las enfermedades, disminuyendo la cantidad de agentes contaminantes que van en los vertidos de las aguas de descarga que llegan al estero de Jaltepeque, departamento de La Paz.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Cultivo del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

El camarón blanco, es una especie nativa de la costa oeste del océano Pacífico y su distribución va desde Sonora, en el golfo de California, México, hasta las costas de Perú. Las sobrevivencias que se han reportado para su cultivo en estanques pueden alcanzar entre 60% y 80%. Esta especie es muy apreciada por los acuicultores no solo por sus excelentes condiciones de crecimiento y sobrevivencia, sino además por su alto valor en el mercado y tolerante a muchas enfermedades (Martínez 1993) (Figura – A1).

2.2. La camaronicultura en El Salvador y su importancia económica.

En 1984, es cuando da inicio la acuicultura marina en El Salvador, la cual contó con tres granjas para el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), con la cooperación de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y ejecutado por la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social (FUSADES). En 1992 se cultivaron unas 400 Ha de lagunas de camarón blanco, que generaron unas 493 toneladas métricas con un valor de USD \$104 mil dólares. En 1995 con el apoyo de la Unión Europea se ejecutó el Programa Regional de Apoyo al Desarrollo de la Pesca en el Istmo Centroamericano que impulsó la formación de personal, readecuó las instalaciones de acuicultura y fortaleció las investigaciones. En 2001, se actualiza el marco legal promulgando la Ley General de Ordenamiento y Promoción de la Pesca y la Acuicultura (Orellana 2012). Según la Dirección General de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA 2015) la producción de camarón del año 2000 fue de 196 TM que incrementando sucesivamente excepto los años 2005 con 240 TM, 2007 con 160 TM siendo este año el más bajo de producción, 2013 con 923 TM siendo este año el más alto de producción, sin embargo; en 2014 hubo una disminución drástica de 646 TM debido a la presentación de la enfermedad conocida como Vibriosis.

2.3. Caracterización del complejo de Jaltepeque

Es el segundo bosque salobre más importante del país y tiene una extensión de 49,454 hectáreas adquiriendo una enorme importancia debido a los servicios ecosistémicos que ofrece como la pesca, la agricultura, y el turismo; su bosque de mangle cumple una función muy importante, pues funciona como barrera de protección natural ante los efectos del cambio climático. El humedal sirve como fuente de recursos para las comunidades de la zona, ya que se desarrollan diferentes actividades como la extracción pesquera y de mariscos, la ganadería, actividades agrícolas como la caña de azúcar y plantaciones de coco; tanto así que se estima que más de diez mil personas subsisten de este sistema de manglar y humedales, dándose también el aprovechamiento del turismo en la zona (MARN 2011).

2.4. El uso de antibióticos en la industria camaronera.

La disponibilidad de cepas libres de patógenos (SPF) y cepas resistentes a patógenos (SPR) constituyen un mecanismo para evitar las enfermedades en la acuicultura del camarón blanco, pero también son importantes los procedimientos de bioseguridad, incluyendo: Secado y escarificado total del fondo de los estanques entre ciclos productivos, reducción del intercambio de agua y tamizado fino de todos los ductos de abasto de agua, uso de mallas anti-pajareras o de espanta-pájaros, colocación de barreras alrededor de los estanques y procedimientos sanitarios. No existen productos químicos o medicamentos para tratar las infecciones una vez que los estanques han sido invadidos por virus, pero un buen manejo del estanque, agua, alimentos y las condiciones de salud de la población, pueden reducir su virulencia. En algunos casos, se han empleado antibióticos y otros fármacos para el tratamiento (FAO 2006).

2.5. Probióticos.

Conjunto de microorganismos y/o sustancias que contribuyen al balance de la flora benéfica del individuo y que contribuyen al bienestar y salud de los organismos. Tienen la capacidad

de competir contra bacterias patógenas tanto en el medio, como en el interior y exterior del individuo y de degradar metabolitos tóxicos y materia orgánica¹.

2.6. Bacterias ácido lácticas como probióticos.

Es uno de los grupos más estudiados por sus beneficios en los tratamientos causados por los trastornos de la microflora intestinal. Estas bacterias están clasificadas dentro del grupo de las bacterias Gram positiva, generalmente tienen movilidad y no formadoras de endoesporas, producen ácido láctico, algunos miembros de este grupo contienen bastones como los *Lactobacillus*, que junto con *Streptococcus*, *Carnobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*, están adaptadas a crecer bajo diferentes condiciones ambientales (Chávez 2008).

2.7. Bacterias del genero *Bacillus* spp, utilizadas como biorremediadores.

La biorremediación es un proceso que utiliza las habilidades catalíticas de microorganismos vivos para un aumento de la velocidad en la extensión de la destrucción de contaminantes. Las comunidades naturales pueden no ser capaces de llevar a cabo los procesos de biodegradación a la velocidad deseada debido a factores físicos o nutricionales limitantes. La actividad biológica altera la estructura molecular de los materiales y el grado de alteración determina si se ha producido una biotransformación o mineralización. La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico y la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua y compuestos celulares (Salazar 2013).

En la acuicultura, la aplicación de bacterias beneficiosas (probióticos) no solo está asociada con la salud del intestino, sino también con la biorremediación, la cual mejora el medio ambiente (agua y suelo) en el que se crían los animales. Los efectos de las cepas de biodegradación (como las *Bacillus* spp., *Paracoccus* spp., *Thiobacillus* spp.) que se añaden directamente al agua, implican la modulación del perfil microbiológico de los estanques, la degradación de los residuos indeseables (amoníaco, nitrito, sulfuro de hidrógeno), mejora la

⁽¹⁾ XII Jornada de actualización científica en acuicultura.12, 2015. Choluteca.2015.Probioticos: mecanismos de acción y uso en cultivo de camarón. Choluteca, HN.43.p.

mineralización de la materia orgánica, disminuye las condiciones anaeróbicas en el suelo del estanque y reduce la acumulación de lodos (Aquafeed 2013).

2.7.1. Fases del crecimiento de una población bacteriana.

El crecimiento bacteriano es el incremento en el número de células o aumento de la masa microbiana (biomasa). El conocimiento de cómo se expande la población celular es útil para el diseño de métodos de control para el crecimiento microbiano. Adquiere relevancia en el aumento de la biomasa y en los productos que se pueden llegar a obtener. (Figura-A2)

2.7.1.1 Fase de adaptación (Lag): representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutricional.

2.7.1.2. Fase exponencial o de crecimiento balanceado: representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente.

2.7.1.3. Fase estacionaria representa el periodo de crecimiento nulo: se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía.

2.7.1.4. Fase de muerte (López et al 2016).

2.8. Mecanismo de acción de los probióticos.

2.8.1. Colonización y adhesión en el tracto gastrointestinal.

En acuicultura, la información disponible indica que las bacterias aisladas de animales cultivados o de su entorno tienen mayor capacidad de adhesión al mucus gastrointestinal y a los tejidos, que las de otras bacterias foráneas que suelen ser transitorias, por lo que surge la necesidad de que los probióticos sean continuamente administrados, ya sea como suplemento en el alimento o a través del agua de cultivo (Villamil y Martínez 2009).

2.8.2. Producción de antibióticos.

La selección de microorganismos con actividad probiótica también se puede determinar por la capacidad de generar productos extracelulares (ECPS), que pueden inhibir o matar otras bacterias potencialmente patógenas, entre ellos sustancias antibacteriales, sideróforos, enzimas bacteriolíticas, ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de

carbono y bacteriocinas. Las bacteriocinas son polipéptidos bacteriostáticos o bactericidas que en su mayoría son activos contra bacterias estrechamente relacionadas y microorganismos Gram-positivos (Villamil y Martínez 2009).

2.8.3. Producción de compuestos benéficos.

Las bacterias marinas y las levaduras pueden llegar a ser un recurso de proteína importante en el mejoramiento del aporte nutricional de algunas especies acuáticas cultivadas debido al perfil de aminoácidos que contienen. Por otra parte, la producción de enzimas como lipasas, quitinasas y proteasas, por parte de microorganismos seleccionados, pueden contribuir al proceso digestivo de los organismos cultivados, especialmente en estadios larvales de bivalvos y camarón (Villamil y Martínez 2009).

2.8.4. Mejora de la calidad de agua.

Se ha propuesto que las bacterias del género *Bacillus* spp seleccionadas como probióticos pueden convertir la materia orgánica en CO₂, en contraste con las bacterias Gram-negativas que se caracterizan por convertir materia orgánica en biomasa bacteriana o limo comprobaron la capacidad de tres aislados del género *Bacillus* spp para disminuir las concentraciones de nitritos, nitratos y amonios en el agua de cultivo de peces ornamentales (Villamil y Martínez 2009).

2.8.5. Mejora de la calidad de los suelos.

Un proceso importante que sucede en el cultivo de camarón es la acumulación y descomposición de materia orgánica en los estanques. Las principales fuentes en la acuicultura lo constituyen los restos de microorganismos (fitoplancton, zooplancton y zoobentos) producidos dentro del estanque, así como las heces de los animales cultivados y el sobrante de alimento no consumido. Solamente una proporción relativamente pequeña menor al 10% de la materia orgánica se estima que se convierte en biomasa de camarones cosechados. El resto de la materia orgánica puede degradarse en dióxido de carbono por efecto de la descomposición hecha por las bacterias, otra cantidad puede evacuarse junto con el agua de recambio y otra cantidad puede llegar acumularse como sedimento en el fondo del estanque (Navarrete 2017).

2.8.5.1. Dinámica de la descomposición de la materia orgánica en un estanque:

La descomposición de la materia orgánica sucede en la columna de agua, pero una gran parte de material particulado se deposita en el fondo del estanque. Cuando se va hacia el fondo, la descomposición puede ser rápida al acumularse en la inter fase agua-sedimento. Pero también sucede que una parte de ésta materia orgánica se mezcla con el sedimento subyacente y puede llegar a cubrirse con nuevos sedimentos antes de que se termine de descomponer del todo.

En la columna de agua y en la superficie del fondo de un estanque, por lo general hay varios miligramos por litro de oxígeno disuelto y se tiene condiciones aeróbicas; pero a una profundidad de pocos milímetros del sedimento subyacente, la actividad microbiana agota rápidamente el oxígeno y el ambiente generado es anaeróbico. Las condiciones aeróbicas convierten los compuestos orgánicos en dióxido de carbono y agua; el proceso es más eficiente, la biodegradación es a mayor velocidad, se dice entonces que el “estanque respira”. Existen, sin embargo, otras bacterias capaces de degradar materia orgánica en condiciones anaeróbicas y la convierten en sub productos como metano, sulfuro de hidrógeno y otros; el proceso en estas condiciones es lento, poco eficiente y a menudo incompleto (Navarrete 2017).

2.9. Incidencia de enfermedades y su impacto en la productividad.

2.9.1. Género *Vibrio* spp

Es un género de bacterias que afectan a todas las especies de *Litopenaeus* spp en camarones juveniles y adultos; los síntomas más visibles, incluyen signos conductuales y clínicos producidos por la infección. La conducta de los camarones afectados puede incluir periodos de nado errático o desorientado, alternados con periodos largos de letargo. Los signos clínicos varían con el tipo de infección (Lightner 1993). Entre las especies del *Vibrio* denominadas *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* son las más comunes que causan infecciones y enfermedades en *L. vannamei*. La mortalidad en la población de camarones es del 90% (Tsang *et al.* 2013). Para la identificación de Vibrios se utiliza el método 9260 H establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992). (Anexo 17).

2.9.1.1. *Vibrio alginolyticus*: es un bacilo corto curvo o recto, Gram negativo quimiorganotrofico, móvil por flagelos peritricos y polares, es el más halófilico de todos ya que es capaz de crecer en concentraciones de 3, 6, 8 y hasta 10% de NaCl. Se aísla con frecuencia

de aguas costeras templadas y tropicales, especialmente en cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C. El reservorio de este microorganismo lo constituyen las aguas (principalmente las saladas) y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. Utiliza como fuente de carbono y energía la D – glucosa y como fuente de nitrógeno, sales biliares, produce ácido a partir de: glucosa, maltosa, manitol y sacarosa. En cuanto a su morfología colonial, se describe en base a su crecimiento en agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS), como colonias de 2 a 4 mm de diámetro, de color amarillo, esto por la fermentación de la sacarosa presente en el medio, característica con la cual se clasifican como sacarosa positiva (Zavala 2005).

2.9.1.2. *Vibrio parahaemolyticus*: es una bacteria de hábitat marino, Gram negativo, con un tamaño de 1.4 – 2.6 µm de longitud por 0.5 – 0.8 µm de diámetro, móvil, crece en condiciones de salinidad entre el 3 al 8 %, crece a temperatura entre 10°C – 44°C con una temperatura optima de 35°C – 37°C, en cuanto al pH varia de 5 a 11 con intervalo óptimo de 7.5 a 8.6, es anaerobio facultativo (tolera el oxígeno), con metabolismo oxidativo y fermentativo, tiene como reservorios: sedimento, partículas suspendidas, plancton, pescados y mariscos (almejas, ostiones, camarón, calamar y cangrejo), se adhiere a las superficies de quitina (componente estructural de algunos mariscos, como es el caso de la superficie del camarón), sobre ellas incrementa su concentración, ya que los nutrientes para su utilización se encuentran más disponibles (UNAM 2005).

2.9.1.3. *Vibrio vulnificus*: es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales, puede estar presente en alimentos de origen marino como los bivalvos (ostiones, almejas, entre otro), y pescados que tienen un importante papel en la transmisión de agentes etiológicos debido a que se consumen crudos o insuficientemente cocidos. Este microorganismo también está presente en el sedimento, plancton y otras formas de vida marina (Dávalos *et al* 2005).

2.9.1.4. *Vibrio harveyi*: es una bacteria marina Gram negativa, bioluminiscente del género *Vibrio*, tiene forma de bastón, es móvil (a través de flagelos polares), facultativamente anaeróbico, halófilo y es competente para el metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. se puede encontrar nadando libremente en aguas marinas tropicales, en la microflora intestinal de animales marinos, y como patógeno primario y oportunista de los animales marinos,

incluidos corales de *Gorgonia*, ostras , langostinos , róbalo común, rodaballo (Surette *et al* 1999).

2.9.1.5. *Vibrio hollisae*: es una especie halófila que recientemente fuere clasificada como *Grimontia hollisae*, Se sabe que este microorganismo ha estado asociado a casos de gastroenteritis, que van de moderados a graves por el consumo de alimentos marinos (Muñoz *et al* 2013). Las bacterias *Grimontia hollisae* son Gram negativas, móviles por un flagelo polar y oxidasa positiva (Hinestrosa *et al* 2007).

2.9.1.6. *Protobacterium damsella*: la especie *V. damsella* fue aislada por vez primera por Love *et al.* en 1981. La especie *V. damsella* es un *Vibrio* halofílico perteneciente (Franco-Monreal *et al* 2014). Es miembro autóctono de los ecosistemas acuáticos. Las cepas de este patógeno han sido aisladas del mar y las aguas estuarinas, de algas marinas, de animales marinos aparentemente no infectados (Rivas *et al* 2013).

2.9.2. Género *Pseudomonas* spp

Son bacterias Gram-negativa, con forma de bastoncillo y motiles, de tamaño pequeño de 0.6 x 2 μm ; muchas especies de este género son comunes ya sea en el agua, suelo, plantas y animales vertebrados e invertebrados, y en los ambientes de agua dulce o marina pueden infectar tanto a peces como crustáceos; En el cultivo de camarón, se desarrolla en ambientes de malas condiciones de calidad del agua y suelo; algunas actúan como oportunistas y generalmente, atacan a animales que tienen las defensas anormales. En el camarón se recomienda utilizar quinolonas como la ciprofloxacina junto con neomicina; aunque también se utilizan terramicina, furanasa y Oxitetraciclina para erradicarlos (Talavera *et.al.*1999). Para la cuantificación de *Pseudomona aeruginosa* se utiliza el método 9213 F modificado en la que se plantea una serie de diluciones para cuantificarla establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et al.* 1992). (Anexo 16)

2.9.3. Bacterias heterótrofas.

Son las que necesitan conseguir sustancias del medio para extraer la energía. Se les llama células heterótrofas, porque no pueden elaborar su propio alimento y necesitan de los productores para obtener la energía a través del alimento que ellas fabrican para seguir viviendo. Las células heterótrofas utilizan la materia orgánica que obtienen del medio para

obtener energía, mediante las reacciones del catabolismo. La molécula más utilizada para obtener energía es la glucosa. Ésta es sometida a diversas reacciones químicas de oxidación en el interior celular, hasta que es degradada completamente y transformada en dióxido de carbono (CO₂) (Puelles *et.al.* 2010). Para el conteo de bacterias heterótrofas se utilizará el método 9215 B Placa fluida, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992) en la que se plantea una serie de diluciones para cuantificar las bacterias heterótrofas y reportarlas como unidades formadoras de colonias por mililitro. (Anexo 19)

2.10. Factor de dilución.

Una dilución se define como el acto de añadir un solvente a un soluto para reducir la concentración del soluto. El soluto puede ser un compuesto químico como la glucosa o un microorganismo como *Escherichia coli*. El principio en ambos casos es el mismo, reducir la concentración (Ayala s.f.).

El factor de dilución puede ser definido como una proporción que indica el número de veces que hay que diluir el material original. Esta proporción nos indicará cuántas partes de la muestra original hay que colocar en el total de partes de la mezcla (Ayala s.f.).

2.10.1. Dilución Bacteriana

Es una técnica que permite evaluar bacterias heterotróficas, aerobias totales (BAT), bacterias reductoras de sulfato (BRS), anaerobias heterotróficas totales (BA_nT). La técnica de dilución consiste en inocular una serie de frascos tipo antibiótico que contienen 9 mililitros del medio de cultivo apropiado según el tipo de bacteria que se quiere evaluar. Se obtiene un mililitro de la muestra usando una jeringa descartable, estéril de 1 o 2 mililitros, de capacidad. Se inocula el primer frasco, sin retirar la aguja del mismo, se invierte y se retira 1 mililitro que se inocula en el 2do frasco. Con una nueva jeringa se retira 1 ml del frasco no. 2, previamente agitado y se inocula el frasco No. 3, y así sucesivamente utilizando una nueva jeringa para cada frasco (García 2014).

2.11. Calidad de agua.

Son todos los factores bióticos, abióticos y tecnológicos del agua que indican las condiciones de esta, para un fin específico. Los abióticos se dividen en parámetros

físicos (turbidez, temperatura y salinidad) químicos (nitrógeno, fosforo, amoniaco, amonio, sulfato, pH y Oxígeno). Los bióticos son: carga bacteriana, la población, la clorofila a y zooplancton y los factores tecnológicos son: densidad de siembra, tasa de renovación, biomasa, carga, rendimiento y alimentación².

2.11.1. Parámetros físicos y químicos.

2.11.1.1. Temperatura: es un factor independiente importante que afecta a la producción debido a su influencia en la supervivencia de las primeras fases post-larvales y por acelerar o retardar los procesos relacionados con la ingestión de alimentos y el crecimiento. Las especies de camarón crecen más rápido a temperaturas entre 25 y 32 °C (UCA 2010).

2.11.1.2. Oxígeno Disuelto: parámetro importante en la sobrevivencia de la postlarvas y cría de camarón. Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto por tiempos prolongados, además de causar mortalidad, puede predisponerlas a contraer enfermedades. El rango oscila entre 5 mg/l a 15 mg/l ;cuando cae por debajo de 5 mg/l, la vida acuática es puesta bajo estrés, cuando más baja es la concentración más alto es el estrés (Tomada de Sandino, 2003; citada por Vides y De Paz 2008).

2.11.1.3. Salinidad: el camarón blanco se adapta con facilidad a la salinidad. Puede sobrevivir y crecer en rangos que varían entre 0.5~45 ppt. La salinidad óptima para su crecimiento y desarrollo es 25~28 ppt. Cambios drásticos de salinidad es peligroso para la sobrevivencia del camarón (Aguilón y Tsang 2008).

2.11.1.4. Nitrógeno total: es una medida de todas las varias formas de nitrógeno que se encuentran en una muestra de agua además consiste en formas inorgánicas y orgánicas. El rango optimo está entre 40-60 mg/l (De Andrés 2003). Para la determinación de nitrógeno total se utilizó el método 4500 Norg B, establecido en el APHA (American Public Health Association) APHA *et. al.* 1992).

⁽²⁾ Taller de capacitación sobre producción intensiva de camaron.2012, Jiquilisco, Usulután.2012.parametros físico - químico. Duran, WP; Peña, AA. Usulután, SV. Asociación de camaroneros de El Salvador (ACAME). p. 1 – 39.

2.11.1.5. Amonio NH_4 : el amonio es producido naturalmente en el suelo por bacterias, plantas y animales en descomposición y por desechos animales. Se produce naturalmente por descomposición de la materia orgánica. El rango óptimo es de 2 mg/l ⁽²⁾. Para la determinación de amonio se utilizó el método 4500 NH_3 F, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.6. Nitrito: en altas concentraciones se combina con la hemocianina en la sangre de los camarones y reduce drásticamente la capacidad de la sangre para transportar oxígeno. El rango es entre 1 a 2 mg/l (Boyd 2001). Para la determinación de nitrito se utilizó el método 4500 NO_2^- B, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.7. Nitrato: se forma en la naturaleza por la descomposición de los compuestos nitrogenados como las proteínas, la urea, etc. En esta descomposición se forma amoniaco o amonio respectivamente. en presencia de oxígeno este es oxidado por microorganismos de tipo nitrobacter a ácido nítrico que ataca cualquier base (generalmente carbonatos) que hay en el medio formando el nitrato correspondiente. El rango es entre 2 a 10 mg/l ⁽²⁾. Para la determinación de nitrato se utilizó el método 4500 NO_3^- B, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.8. Alcalinidad: es la concentración total de bases en el agua, expresada en miligramos por litro de carbonato de calcio (CaCO_3). La alcalinidad debe ser superior a 75 mg/l en estanques de camarón (Boyd 2001). Para la determinación de alcalinidad total se utilizará el método 2320 B, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.9. Dureza: Se refiere a la cantidad de sales de calcio y magnesio disueltas en agua. Estos minerales tienen su origen en las formaciones rocosas calcáreas, y pueden ser encontrados, en mayor o menor grado, en la mayoría de las aguas naturales. El rango óptimo está entre 40 - 400 ppm (Rodríguez 2010). Para la determinación de dureza total se utilizará el método 2340 C, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.10.Sílice: el agua oceánica contiene una concentración promedio de silicatos de 6.4 mg/l de SiO₂. Las diatomeas normalmente se ven limitadas por concentraciones de silicatos menores de 1.0 mg/l ⁽²⁾. Para la determinación de Sílice se utilizará el método 4500 Si D, establecido en el APHA (American Public Health Association) (APHA *et. al.* 1992). (Anexo 16).

2.11.1.11.Fosforo total: es un nutriente esencial para la productividad de un sistema acuático. En los sistemas riparios la mayor parte de este se encuentra en forma particulada, el cual al contacto con el agua marina y debido a los cambios químicos que se generan, se precipita quedando solo la fracción disuelta para ser utilizada por los organismos vivos (De Andrés 2003). Para la determinación de fosforo total se utilizará el método 4500- P C, establecido en el APHA (American Public Health Association)(APHA *et. al.* 1992).

2.11.1.12.Fosfato: Fuente de energía para procesos metabólicos. Componente estructural de varios compuestos (Ej. Ácidos nucleídos). El fosforo (P) elemental es químicamente muy reactivo. En aguas con altas concentraciones de calcio y un elevado pH, hace que el fosforo se precipite como fosfato de calcio (Ca₃(PO₄)₂), directamente desde el agua. La disponibilidad del P en el agua varia con el pH (más disponible pH < 6.5). El rango es entre 0.005 a 0.2 mg/l ⁽²⁾.

2.11.1.13.pH: Es un valor variable entre 0 y 14 que mide el nivel ácido o básico de una disolución. Es un parámetro muy especial en el ambiente acuático, ya que permite medir la acidez del agua de los estanques donde se encuentran los camarones y demás especies. Su rango óptimo se encuentra en el rango de 6 a 9 (UCA 2010).

2.11.1.14.Turbidez: es la cantidad de partículas suspendidas en el agua (tierra, sedimento y plancton). Se puede considerar que la turbidez es un buen parámetro indicativo de la cantidad de fitoplancton (UCA 2010).

⁽²⁾ Taller de capacitación sobre producción intensiva de camaron.2012, Jiquilisco, Usulután.2012.parametros físico - químico. Duran, WP; Peña, AA. Usulután, SV. Asociación de camarones de El Salvador (ACAME). p. 1 – 39.

2.11.2. Parámetros biológicos.

2.11.2.1. El plancton: según su forma de alimentación se puede clasificar en fitoplancton y zooplancton. El fitoplancton está constituido por algas microscópicas principalmente diatomeas y por dinoflagelados que poseen la habilidad de producir su propio alimento a partir de la fotosíntesis, es decir que son organismos autótrofos que requieren de la energía del sol, CO₂ disuelto y nutrientes para poder alimentarse y desarrollar todas sus actividades. El zooplancton por otra parte, está compuesto por una gran variedad de organismos heterótrofos (Galdámez 2014).

2.11.2.2. Las diatomeas: son organismos unicelulares, eucariotas y autótrofos. Se reproducen de forma asexual por bipartición y sexual por meiosis presentando oogamia o anisogamia. Actualmente se conocen unas 10,000 especies que se encuentran adaptadas a diferentes rangos ecológicos, razón por la cual se pueden utilizar para determinar el estado de fuentes de agua (Alegre, *et al* 2004 citado por Rivas, Gómez y Monterrosa 2010). Poseen cloroplastos, clorofila A y C, betacaroteno y fucoxantina. Debido a su gran capacidad fotosintética se consideran como productores primarios. La membrana celular se compone de pectina y sílice lo que las hace resistente a ácidos y bases fuertes. Poseen la capacidad de depurar el medio ambiente acuático, por lo cual se encuentran en ríos sin polución con muchas especies y bajo número de individuos y ríos polucionados con bajo número de especies (Rivas, Gómez y Monterrosa 2010).

2.11.2.3. Los dinoflagelados: son un grupo de microorganismos unicelulares eucariontes pertenecientes al grupo de los protistas característicos por ser nadadores libres y conforman uno de los mayores grupos del micro plancton en los mares y cuerpos de agua dulce. Son especies autótrofas con capacidad de fotosintetizar, contienen clorofila a y c, y pigmentos rojos-anaranjados. En su pared presentan una cobertura denominada teca. Su núcleo celular y la presencia de dos flagelos incrustados entre las placas son una de las principales características que los diferencia de otros grupos de algas. La pared celular o teca puede ser lisa o relativamente ornamentada como en *Gymnodinium* o puede tener placas compuestas de polisacáridos formando bordes o espinas, como en el género *Pyrodinium* (Hasle y Tomas 1996 citado por Alvarado 2012). Actualmente se han identificado cerca de 2000 especies de dinoflagelados de los cuales se conoce un aproximado de 60 especies

productoras de toxinas; Se reproducen asexualmente por fisión binaria y sexualmente al formar quistes de resistencia (Spector 1984 citado por Alvarado 2012).

2.11.2.4. Las cianobacterias o algas azules verdosas: poseen características tanto de algas como de bacterias. Ante condiciones favorables, tales como, aguas con alto contenidos de nutrientes o residuos químicos, entre otros, ocurre un fenómeno denominado “floreamiento o bloom algal”, durante el cual se advierte la formación de espuma y se alcanza una densidad celular sumamente elevada. Las cianobacterias producen una gran cantidad de efectos adversos sobre el recurso hídrico y los ecosistemas acuáticos, la más importante es su capacidad de generar toxinas que se liberan durante la finalización del “Bloom” y la muerte celular (Pérez, Soraci y Tapia.2008).

2.11.2.5. La clorofila a: es el pigmento fotosintético primario de todos los organismos fotosintetizadores que desprenden oxígeno, y está presente en todas las algas. La tasa fotosintética está directamente relacionada con la intensidad de la luz. No obstante, la respuesta a ella es variable según las especies y, en muchas de ellas se da un grado considerable de adaptación a los cambios de intensidad luminosa (Contreras 1994). (Figura-A5).

2.11.2.6. El análisis en fresco: es la técnica que se utiliza para monitorear el estado de salud de los organismos y realizar diagnósticos presuntivos en laboratorio y campo. Consiste en la disección del camarón en todos sus estadios, para observar las alteraciones y patógenos que presenten sus órganos y tejidos (Morales y Cuellar 2008). (Figura-A7).

Para una evaluación sanitaria con el análisis en fresco, deben examinarse las muestras lo más pronto posible después del muestreo y después de la preparación del montaje en un portaobjetos. Se deben utilizar organismos vivos siempre que sea posible, o usar muertos frescos que han sido mantenidos en frío (refrigerado o enhielado), o especímenes fijados en formalina 10% tamponada, cuando no sea posible trabajar con camarones vivos. Si se puede contar con un laboratorio de campo adecuado, debe usarse para procesar y examinar las muestras lo más cerca del sitio de muestreo (Morales y Cuellar 2008).

2.11.2.7. Las gregarinas: son parásitos protozoarios de diversos tipos, ampliamente distribuidos en la naturaleza y comunes en muchos grupos de invertebrados, especialmente

artrópodos, anélidos y moluscos. En éstos, las gregarinas pueden aparecer ínter o intracelularmente, y aunque las células hospedero individuales son destruidas por el estadio intracelular, muchas especies no son consideradas como de alta patogenicidad. Sin embargo, cada especie de gregarinas suele ser específica de una especie de hospedero en particular (Morales y Cuellar 2008).

2.11.2.8. Los nematodos acuáticos: son gusanos de tamaño milimétrico que viven en el suelo y en medios acuáticos y marinos. La mayoría de nematodos son bacteriófagos, alimentándose de microorganismos y materia orgánica del suelo (UA s.f.).

2.11.2.9. Bacterias filamentosas: son bacterias Gram negativo, aeróbica estrictas, de ambientes salinos, que se desarrolla bien en agua de baja cálida o ricas en materia orgánica, a temperatura elevada y niveles altos de fosforo. La bacteria es un epibio comensal o sea que utiliza la superficie externa, cuerpo y branquias del camarón como sustrato, obteniendo sus nutrientes del agua. El principal problema que presentan los camarones peneidos que son afectados por estas bacterias es una reducción del movimiento y dificultad con la respiración. En casos extremos la bacteria provoca la muerte del animal por asfixia (Araujo 1999).

2.11.3. Parámetros productivos.

2.11.3.1. Densidad de siembra: es la cantidad de postlarvas de camarón blanco por m². El rango óptimo oscila entre 20 - 40 postlarvas/m² (Aguilón y Tsang 2008).

2.11.3.2. Población: es un conjunto de todos los elementos que estamos estudiando, acerca de los cuales intentamos sacar conclusiones y que presentan una característica común (Morales 2013).

2.11.3.3. Peso: el camarón se vende por tallas. Las tallas de camarón expresan el número de los camarones contados por libras (Mundo del camarón 2011).

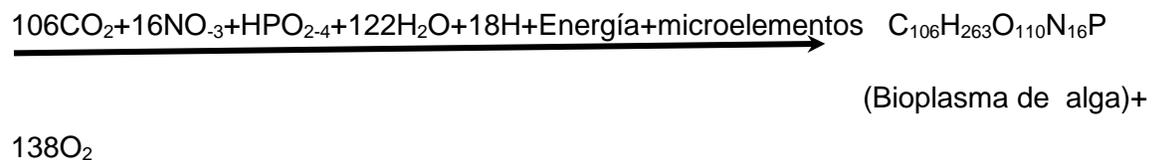
2.11.3.4. Biomasa: cantidad total de materia viva presente en una comunidad o ecosistema expresada en libras o kilogramos (Morales 2013).

2.11.3.5. Índice de conversión alimenticia: es la comparación de la cantidad de alimento abastecido y el crecimiento del camarón permite que sea calculado el índice o factor de conversión alimenticia (I.C.A). El I.C.A. varía durante el ciclo de producción y entre las poblaciones, pero es una guía muy buena y debería ser entre 0.6-1.0 en camarones de hasta 10 gramos de peso y entre 1.0 y 1.3 para tallas mayores. Idealmente el I.C.A. no debe ser mayor de 1.5 (Talavera *et. al.* 1997).

2.11.3.6. Rendimiento: Es la cantidad de producto producido por unidad de área por ciclo productivo. El rango oscila entre 816.47 a 907.19 kg/ha/ciclo (Oddone 2013).

2.12. Definición de eutrofización del agua.

La eutrofización se puede definir como la suma de los efectos del excesivo crecimiento de fitoplancton que conduce a un desequilibrio primario y secundario de la productividad. En términos generales, la eutrofización del agua es causada por las algas autótrofas que florece en el agua, que componen su bioplasma por la luz solar y la energía sustancias inorgánicas mediante fotosíntesis. El proceso de eutrofización se describe como sigue:



Según la ecuación anterior, se puede concluir que el nitrógeno y el fósforo inorgánico son los principales factores de control para la propagación de las algas, especialmente el fósforo (Yang *et. al.* 2008).

2.13. Índice del Estado Trófico (TRIX).

El índice de estado trófico se ha propuesto como un análisis de rutina en el monitoreo de la calidad del agua. El índice del estado trófico, TRIX, se creó con el objeto de poder comparar información en un amplio intervalo de situaciones, al conjugar factores que están directamente relacionados con la productividad, la Clorofila a y el oxígeno disuelto, con los nutrientes, nitrógeno y fósforo (De la Lanza 2013).

$$\text{TRIX} = \log (\text{Chla} \times \text{aD} \% \text{OXNTXPT}) + 1.5 / 1.2$$

TRIX: es el índice del estado trófico.

Chla: es la concentración de Clorofila a en $\mu\text{g l}^{-1}$.

aD%O: es el valor absoluto de la desviación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, es decir, $|100 - \%OD|$.

NT: es el nitrógeno total en $\mu\text{g l}^{-1}$.

PT: es el fósforo total en $\mu\text{g l}^{-1}$.

Las constante $k= 1.5$ y $m = 12/10 = 1.2$, son valores de escala introducidos para ajustar el valor del límite más bajo del índice y la extensión de la escala trófica relacionada de 0 a 10 unidades TRIX (Aranda 2004). (Cuadro-A 2).

2.14. Índice de Calidad de Agua (ICA)

Los índices pueden generarse utilizando ciertos elementos básicos en función de los usos del agua, el "ICA", define la aptitud del cuerpo de agua respecto a los usos prioritarios que este pueda tener. Estos Índices son llamados de "Usos Específicos" (MARN s.f.)

El Índice de calidad de agua propuesto por Brown es una versión modificada del "WQI" que fue desarrollada por La Fundación de Sanidad Nacional de EE.UU. (NSF), que en un esfuerzo por idear un sistema para comparar ríos en varios lugares del país, creó y diseñó un índice estándar llamado WQI (Water Quality Index) que en español se conoce como: INDICE DE CALIDAD DEL AGUA (ICA) (MARN s.f.). (Cuadro-A85).

Este índice es ampliamente utilizado entre todos los índices de calidad de agua existentes siendo diseñado en 1970, y puede ser utilizado para medir los cambios en la calidad del agua en tramos particulares de los ríos a través del tiempo, comparando la calidad del agua de diferentes tramos del mismo río además de comparar lo con la calidad de agua de diferentes ríos alrededor del mundo. Los resultados pueden ser utilizados para determinar si un tramo particular de dicho río es saludable o no (MARN s.f.).

Para la determinación del "ICA" intervienen 9 parámetros, los cuales son:

Coliformes Fecales (en NMP/100 ml)

pH (en unidades de pH)

Demanda Bioquímica de Oxígeno en 5 días (DBO_5 en mg/ l)

Nitratos (NO_3 en mg/l)

Fosfatos (PO_4 en mg/l)

Cambio de la Temperatura (en $^{\circ}\text{C}$)

Turbidez (en FAU)

Sólidos disueltos totales (en mg/ l)

Oxígeno Disuelto (OD en % saturación)

- **Fórmula para el cálculo del valor del Índice de Calidad de Agua.**

- **$ICA=100 - \sqrt{(F1)^2(F2)^2(F3)^2}/1.732$**

- F1= PNO/TP Donde PNO= parámetros que no cumplieron y TP= total de parámetros.

- F2=ENO/Te Donde ENO = ensayos que no cumplieron y TE = total de ensayos.

- F3= (nse/0.01 nse+0.01) Donde excursión = (valor fallido/valor normado)-1 y nse = Σ excursión/ total de ensayos.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Descripción del lugar en estudio.

El presente estudio se desarrolló de agosto del 2016 a septiembre del 2017 en la camaronera Las Animas ubicada en el cantón Animas Abajo, jurisdicción de Zacatecoluca, departamento de La Paz, a 5 msnm cuyas coordenadas son: latitud norte 13°21'38.26'' longitud oeste 88°51'11.57''. Las características del terreno donde están construidos los estanques tienen una topografía plana, la textura del suelo está compuesta de arcilla, arena fina y en menor grado materia orgánica, y son del tipo Grumosoles (Vertisoles) que son aquellos de arcillas negras con un alto poder de contracción y dilatación, en la época seca, se rajan y se cuarteán. En estos suelos los minerales están en sus primeros 18 cms. por lo general mezclados, de este límite a un metro de profundidad, tienen un contenido de arcilla superior a 30% (Rico 1974) (MAG 2012). El área de los estanques es: # 10: 32,377 m² o 3.24 ha, #11: 25,567 m² o 2.56 ha, # 12: 21,116 m² o 2.11 ha y #13: 23,442 m² o 2.34 ha haciendo un área total de 102,502 m² o 10.25 ha y cuentan con una profundidad de 1.5 m. (Figura-A3).

3.2. Recolección, condiciones de almacenamiento y transporte de muestras de camarones para la obtención de bacterias ácido lácticas nativas, análisis en fresco y muestras de aguas para la fase de campo.

La recolección de los camarones vivos utilizados para extracción de bacterias ácido lácticas y análisis en fresco, fueron capturados con una atarraya de 2 m² de área, luego fueron depositados en bolsas plásticas conteniendo treinta litros de agua extraída del mismo estanque, luego se les agregó cuatro gramos de alimento peletizado al 30% de proteína por bolsa e inmediatamente se empacó añadiendo oxígeno puro en estado gaseoso 12 mg/l (Niveles óptimos de Oxígeno de 8-12 mg/l los cuales deben de mantenerse durante la aclimatación) (Treece 2001). (Figura-A4). No obstante para la recolección de los camarones utilizados para el análisis en fresco se les colocó hielo, con el fin que los animales disminuyeran su metabolismo.

De cada uno de los cuatro estanques se recolectaron dos muestras de agua; una en la compuerta de entrada (CE) y la otra en la compuerta de salida (CS), recolectando ocho muestras en cada muestreo, el cual fue realizado cada mes durante un periodo de cuatro meses, haciendo un total de 32 muestras durante toda la investigación. Las muestras de agua para los parámetros químicos fueron analizadas en el laboratorio Físicoquímico de aguas

de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES) mientras las muestras de agua para los parámetros microbiológicos fueron analizadas en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES) utilizando la metodología establecida en aguas y aguas de desecho APHA (1992) y el parámetro biológico en el laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión, ya que, dicha institución es la única que cuenta con la certificación necesaria para realizar los análisis de clorofila a, cuantificación y clasificación del fitoplancton.

3.3. Metodología de Laboratorio.

3.3.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas.

Las muestras de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) utilizadas fueron recolectadas en la camaronera “Las Animas”, la cual cuenta con 13 estanques de cultivo de camarón, seleccionando cuatro de ellos: Estanque tres (E3), Estanque siete (E7), Estanque nueve (E9) y Estanque diez (E10), puesto que, estos estanques cumplen con el criterio de alta producción lo que genera mayor probabilidad de encontrar bacterias ácido lácticas; al mismo tiempo estos estanques contaban con una alta presencia del pez Sambo (*Dormitator latifrons*), el cual es una especie detritívora, la cual, constituyen una parte importante de los ecosistemas porque contribuyen a la descomposición y reciclado de los nutrientes, y las bacterias ácido lácticas resisten al paso de tracto digestivo de este.

Se recolectaron 60 camarones en total, 15 camarones de cada uno de los cuatro estanques seleccionados, debidamente identificadas con el número de estanque, fecha de recolección, persona que los recolectó y la hora de recolección, luego se almacenaron en hielera para trasladarlos al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Para el aislamiento de los Lactobacilos, se utilizaron 10 camarones por cada estanque, se pesaron en una balanza semianalítica aún con vida, luego se desinfectó con alcohol isopropílico, se extrajo el tubo digestivo con ayuda de tijeras y pinzas estériles, se colocó en tubo cónico de 1 ml estéril, debidamente tarado, seguidamente se pesó. Se le agregó 1.0 ml de solución salina y se maceraron. El proceso se repitió para cada uno de los 40 camarones, primero los del E3 y así sucesivamente para el E7, E9 Y E10.

Se pipeteo 0.1 ml del macerado y se colocó en el centro de una Placa de Petri que contenía 20 ml de Agar RMS solidificado y luego se procedió a extenderlo con una asa de *Digitalssky* estéril, finalmente se incubo a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

3.3.2. Morfología macroscópica de los lactobacilos

Después del periodo de incubación se observaron las colonias formadas en el medio de Agar RMS, comparándolas con las establecidas en el Manual de Merck (The MERCK group s.f.)

3.3.3. Morfología microscópica y pruebas para confirmar presencia de lactobacilos

Tinción de Gram: De las colonias puntiformes color azul en medio de RMS, se tomó con una asa estéril una porción de la colonia y se suspendió en una gota de solución salina en una lámina portaobjeto, se fijó al calor y se dejó secar, luego se realizó la tinción de Gram, se enfocó en el microscopio hasta llegar al 100X con ayuda de aceite de inmersión.

Prueba de catalasa y oxidasa: De las colonias puntiformes se resembraron en Agar Tripticasa Soya y se incubaron a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas

Prueba de catalasa: Después del periodo de incubación se coloraron dos gotas de peróxido de hidrogeno H_2O_2 en una lámina portaobjeto limpia y luego con un palillo de madera estéril se recolecto una porción de una colonia y se emulsiono en las gotas de H_2O_2 , la ausencia de burbujeo confirma la presencia del Lactobacilo.

Prueba de oxidasa: Después del periodo de incubación se seleccionó una colonia y se impregno la tira que contiene el reactivo de Kovac en la colonia, la ausencia de coloración purpura en la tira confirma la presencia del Lactobacilo.

3.3.4. Pruebas bioquímicas de lactobacilos aislados

Pruebas API CHL 50: Después del periodo de incubación se hizo una suspensión bacteriana utilizando agua destilada como diluyente hasta llevarlo a una concentración de 10^7 UFC/ml, luego con una jeringa estéril se llenaron los 50 pozos que tiene la galería de API CHL50, se le adiciono aceite estéril y luego se incubaron a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas, la primera lectura se realizó a las 24 horas y se anotaron los resultados en la hoja de resultados y finalmente a las 48 horas.

3.3.5. Cosecha de bacterias ácido lácticas.

Una vez confirmada la presencia de bacilos Gram positivos, prueba de Catalasa, prueba de Oxidasa y las API CHL50 se procedió a realizar la resiembra de los microorganismos aislados con asa estéril, en placas con agar RMS por el método del extendido de tal forma que en toda la superficie del medio quedara extendida la bacteria y lograr un mayor crecimiento de esta, las placas resultantes se codificaron según el código de la muestra y se incubaron a 37 °C/ 48 h.

Al finalizar el periodo de incubación se realizó la cosecha de los microorganismos, recogiendo la mayor cantidad de bacterias de la placa y colocándolas en 10 tubos plásticos de fondo cónico conteniendo 1.5 ml de caldo RMS + 15 % de glicerol como agente crioprotector, luego se homogenizaron y fueron debidamente identificados con el código de muestra y la fecha, los tubos fueron colocados en gradillas y almacenados en refrigeración a 5° por 12 horas y finalmente en el ultra congelador.

3.3.6. Aislamiento y cosecha de Vibrios a partir de hepatopáncreas del camarón.

3.3.6.1. Aislamiento de los Vibrios.

De los mismos camarones utilizados para aislar los lactobacilos, se extrajo el hepatopáncreas y se pesó y se colocaron en tubos plásticos de fondo cónicos de 1.0 mL, se le agregó 0.9 mL de solución salina y se maceraron. El proceso se repitió para uno de los 40 camarones, primero los del E3 y así sucesivamente para el E7, E9 Y E10.

Se pipeteo 0.1 ml del macerado y se colocó en el centro de una Placa de Petri que contenía 20 ml de Agar TCBS solidificado y luego se procedió a extenderlo con una asa de Dridaskil estéril. Finalmente se incubo a temperatura de 35° ± 2°C durante 12-24 horas.

3.3.6.2. Morfología macroscópica de los Vibrios

Después del periodo de incubación se observó las colonias formadas en el medio de Agar TCBS, comparándolas con las establecidas en el Manual de Merck.

3.3.6.3. Morfología microscópica de los Vibrios

Tinción de Gram: De las colonias circulares color amarillo y verde en medio de TCBS, se tomó con una estéril en aro una porción de la colonia color amarillo y verde por separado se suspendió en una gota de solución salina, se fijó al calor y se dejó secar, luego se realizó la

tinción de Gram. Se enfocó en el microscopio hasta llegar al 100x adicionándole aceite de inmersión.

Pruebas bioquímicas

De las colonias circulares de color verde en medio de TCBS se resembraron en Agar Trypticase Soya y se incubaron a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, para luego realizarse las siguientes pruebas:

Prueba de catalasa: Después del periodo de incubación se colocaron dos gotas de peróxido de hidrogeno H_2O_2 en una lámina portaobjeto limpia y luego con un palillo de madera estéril se recolecto una porción de una colonia y se emulsiono en las gotas de H_2O_2 , la ausencia de burbujeo confirma la presencia del Vibrio.

Prueba de oxidasa: Después del periodo de incubación se seleccionó una colonia y se impregno la tira que contiene el reactivo de Kovac en la colonia, la presencia de coloración purpura en la tira confirma la presencia del Vibrio.

Pruebas Bioquímicas: Después del periodo de incubación de las colonias verdes se le realizó las siguientes pruebas:

TSI: Con un asa en punta estéril se tomó parte de la colonia y se inoculo hasta el fondo y se estrió sobre el bisel de medio de TSI en forma inclinada y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Citrato: Con un asa en punta estéril se tomó parte de la colonia y se inoculo hasta el fondo y se estrió sobre el bisel de medio de Agar Citrato de Simmons en forma inclinada y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Movilidad: Con un asa en punta estéril se tomó parte de la colonia y se inoculo en el centro y hasta la mitad del medio de Agar de Movilidad y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Rojo de Metilo: Con un asa en anillo se tomó parte de la colonia y se inoculo en el medio líquido de Rojo de Metilo - Voges Proskahuer y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Voges Proskahuer: Con un asa en anillo se tomó parte de la colonia y se inoculo en el medio líquido de Rojo de Metilo - Voges Proskahuer y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Indol: Con un asa en anillo se tomó parte de la colonia y se inoculó en el medio líquido de Indol y se incubaron los tubos a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

3.3.6.4. Cosecha de los Vibrios

De las colonias características de *Vibrio parahemolyticus* en Agar TCBS y que cumplieron la Tinción al Gram, Prueba de Catalasa, Prueba de Oxidasa y las Pruebas Bioquímicas, se sembraron por el método del extendido en dos placas de Agar TCBS y se incubaron a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Después del periodo de incubación se recolectaron las colonias y se depositaron en 10 tubos cónicos que contenían 1.0 ml de Caldo de Tripticasa Soya más Glicerol al 15%, se agitaron para tener una suspensión homogénea, luego se dejaron en refrigeración durante 12 horas y finalmente se almacenaron a -70°C en un ultracongelador en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

3.3.7. Caracterización de los Lactobacilos aislados

Para las pruebas de caracterización de los Lactobacilos nativos con función probiótica se seleccionaron cuatro muestras de las 40, una muestra de cada uno de los cuatro estanques, y de ellas se utilizaron dos *Lactobacillus* nativos en la investigación, mencionando a continuación dichas pruebas:

1. Prueba de hemólisis en sangre humana.
2. Cinética de crecimiento bacteriano de los Bacilos Ácido Lácticos.
3. Conteo de UFC ml^{-1} de Bacilos Ácido lácticos.
4. Prueba de tolerancia a salinidad.
5. Prueba de tolerancia a pH.
6. Actividad antibacteriana.
1. Prueba de adhesión a solventes.
2. Prueba de adhesión a xileno.
3. Prueba de adhesión a tolueno.
7. Prueba de adhesión a cloroformo.
1. Determinación actividad enzimática extracelular.
2. Prueba de degradación de la caseína (proteasas).
3. Prueba de hidrólisis de la gelatina (proteasas).

4. Prueba de hidrólisis de Tween 80 (lipasas).

3.3.8. Parámetros Químicos.

Para los análisis químicos se utilizó la metodología establecida en aguas y aguas de desechos (APHA) 1992, se realizaron en el laboratorio Físicoquímico de aguas de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Las pruebas realizadas se denotan a continuación:

1. 4500- P Fosforo total: 4500- P C. Método colorímetro del ácido vanadomolibdofosforico. (Anexo 8).
2. Determinación de fosfatos en aguas por espectrofotometría- (Anexo 9).
3. 4500 Norg Nitrógeno total: 4500 Norg B. Método macro Kjeldahl (Anexo 10).
4. 4500 NH₃ Amonio: 4500 NH₃ F Método Fenato (Anexo 11).
5. 4500 NO₃⁻ Nitrato: 4500 NO₃⁻ B. Método espectrometrico ultravioleta selectivo (Anexo 12).
6. 2340 DUREZA: 2340 C. Método título métrico de EDTA. (Anexo 15).
7. 4500- Si SILICE: 4500 –Si D. Método colorímetro del complejo azul. (Anexo 16).
8. 4500 NO₂⁻ Nitrógeno (nitrito): 4500 NO₂⁻ B. Método Colorimétrico. (Anexo 13).
9. 2320 Alcalinidad: 2320 B. Método de titulación. (Anexo 14).

3.3.9. Parámetros Microbiológicos.

Para los análisis microbiológicos se utilizó la metodología establecida (APHA) 1992, se realizaron en el laboratorio Microbiología de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y el Laboratorio de Microbiología del MEGATEC – La Unión, las pruebas de identificación de Vibrios realizando el análisis en fresco (Morales 2010). Para el estudio se usó el 20% de prevalencia (es el número de individuos de una especie de huésped infectada con una especie particular de parásito/número de huéspedes examinados (Margolis, *et al.* (1982), citado por Morales 2010)). Se realizó identificación y cuantificación de *Vibrio* spp en la hemolinfa y del hepatopáncreas de los camarones blancos vivos. Los resultados obtenidos de las placas bacterianas en agar TCBS provenientes del hemolinfa (UFC/ml) y el hepatopáncreas (UFC/g) de cada uno de los camarones se interpretó haciendo uso de la tabla de referencia para el mismo propósito que establece (Gómez, citado por Cuellar *et al.* (2010))

los resultados obtenidos de la bacteriología se sometieron a interpretación auxiliándose de los datos obtenidos del análisis en fresco, ya que con esta técnica se puede evaluar y cuantificar el posible daño estructural que el organismo pueda presentar y más específicamente en cuanto al daño tubular hepático. Se utilizó la tabla de evaluación cualitativa del grado de severidad de daño tubular hepático (Morales 2013). El análisis en fresco se realizó dos veces durante el transcurso de la investigación. (Anexo 5).

Las pruebas realizadas se denotan a continuación:

1. 9260. H. *Vibrio cholerae*. (Anexo 17).
2. 9213. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. (Anexo 18).
3. 9213. F. Técnica de tubos múltiples para *Pseudomonas aeruginosa*. (Anexo 18).
4. 9215. Recuento heterótrofo de placa: 9215 B. Método de placa fluida. (Anexo 19).
5. Metodología de bacteriología para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* spp. sometidas a los antibióticos: prueba de Kirby-Bauer. (Anexo 3).
6. Metodología de bacteriología para el aislamiento, identificación y cuantificación de bacterias del género *Vibrio* spp. (Anexo 4).

3.3.10. Parámetros Biológicos.

Para medir la clorofila a se utilizó la metodología de Strinckland y Parson (1972) y modificada de Navarrete (2015), citado por Escobedo (2010), en la cual se utilizó un equipo de filtración, y es necesario trabajar sin luz solar para proteger la muestra, conservar la muestra con hielo, filtrar con ayuda de bomba de vacío, homogenizar cada vez que se agregue al filtro, la cantidad depende de la capacidad de saturación del filtro, la membrana doblada se colocó en papel aluminio debidamente etiquetada, el doblez no debe tocar el centro de la membrana, medir el volumen de agua filtrado, colocar en bolsa tipo Ziploc® y poner en congelador por 18- 24 horas. Este se realizó en el laboratorio de microbiología del MEGATEC- La Unión. Al mismo tiempo se utilizó la Metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton presente en los estanques de camarón cultivado. (Anexo 6 y 7)

3.3.11. Preparación de los masivos de EPICIN® PST.

3.3.11.1. EPICIN® PST

La preparación del **EPICIN® PST** se desarrolló en dos etapas, la primera consistió en la preparación de un volumen de 18 litros y la segunda consistió en la preparación de 2,000 litros, en el Laboratorio de Probiótico de la Camaronera las Ánimas, las formulaciones se detallan en Anexo 1.

3.3.12. Preparación del masivo de bacterias ácido lácticas nativas

La preparación del probiótico a base de bacterias ácido lácticas nativas se desarrolló en el laboratorio de Probiótico de la Camaronera Las Ánimas, que consistió en la preparación de un volumen inicial de un litro a partir de las cepas madre, luego se procede a la preparación de los volúmenes de 18, 72 y 750 litros, cada una de estas preparaciones tarda un periodo de 18 a 24 horas, las formulaciones se detallan en el anexo 2. (Figura-A7).

3.4. Metodología de Campo.

Previo a la preparación de los estanques para la siembra, se realizó una aplicación de 300 grs de **EPICIN®PST** por cada estanque.

3.4.1. Preparación de los estanques para la siembra.

Se utilizó una densidad de siembra de 55 ind/m² para cada uno de los cuatro estanques, haciendo un total de 5,637,610 postlarvas. La siembra de los estanques se realizó el día 10 de abril de 2017. (Cuadro-A4).

Se realizó el proceso de aclimatación, el cual consistió en la medición de las constantes de temperatura y salinidad para no afectar a las postlarvas. Seguidamente se realizó la siembra a los estanques por medio del método de la manguera. A partir de la siembra se realizó un muestreo de sobrevivencia, el cual consistió en medir a partir de una muestra por estanque en una caja por un periodo de 2 días a partir de la siembra cuantas larvas sobrevivieron. Obteniendo los valores de 88.33% para el T1, 93.33% para el T2, 83.33% para T3 y 90% para el T4.

3.4.2. Preparación y Aplicación de EPICIN G2.

La preparación del EPICIN G2 consistió en la incorporación de 100 grs del probiotico comercial a 45.45 kg del concentrado de la marca MOR al 35% de contenido proteico, mezclándolo homogéneamente en una tolva. Su aplicación se realizó al voleo, mediante una lancha con motor fuera de borda de 5 caballos de fuerza. La frecuencia de aplicación de este fue de 5 días.

3.4.3. Aplicación del EPICIN PST y el probiotico a base de bacterias acido lácticas nativas.

3.4.4. EPICIN PST.

1. Volumen del masivo: 1,000 litros por estanque.
2. Tiempo de incubación: 16 horas.
3. Modo de aplicación: al voleo.
4. Recursos: Lancha con motor fuera de borda de 5 hp.
5. Frecuencia de aplicación: cada 2 días.

3.4.5. Probiotico a base de bacterias acido lácticas nativas.

En el agua:

1. Volumen del masivo: 2 tinacos de 750 litros (1,500 litros por estanque).
2. Tiempo de incubación: 16 horas.
3. Modo de aplicación: al voleo.
4. Recursos: Lancha con motor fuera de borda de 5 hp.
5. Frecuencia de aplicación: cada 5 días.

En el alimento:

1. Adicionalmente se utilizó 2.5 litros de inóculo de cepa de bacterias acido lácticas por separado (según el tratamiento designado) por 1.0 quintal del concentrado de la marca MOR® al 35% de contenido proteico, mezclándolo homogéneamente y aplicándolo al voleo por todo el estanque.
2. La frecuencia de aplicación para cada uno de los estanques utilizados en el estudio fue cada 5 días.

3.4.6. Metodología para la cuantificación de los parámetros productivos.

Para la determinación de peso se utilizó el cuadro general de datos, el cual es utilizado en la camaronera Las Animas para el muestreo de peso: partiendo de que se conoce la cantidad de camarones sembrados en cada estanque, se extrajeron muestras “al azar” utilizando atarrayas de 1.0 m² de diámetro, se realizó cada siete días, los resultados se presentan en gramos.

Densidad de siembra: el presente estudio se utilizó 55 camarones por metro cuadrado.

Peso: se utilizó un recipiente donde se colocó los camarones, báscula semianalítica, atarraya, cubeta. El procedimiento es: anotar el número de estanque y la cantidad de postlarva sembrada, la fecha de siembra, la fecha de muestreo y los días de cultivo: (fecha de muestreo- fecha de siembra sin contar el día de siembra de la larva), colocar agua del estanque en la cubeta, con la atarraya capturar los camarones y agregarlos a la cubeta con agua, colocar camarones en el recipiente y pesar en la báscula, anotar el dato que se observa: peso bruto (PB) , después contar los camarones y anotar, luego pesar el recipiente con agua: Tara (T), la resta del peso bruto (PB) y la tara (T) es el peso neto (PN). El peso neto (PN) se divide entre el número de camarones para obtener el peso de camarón (P/C), se realizaron cuatro repeticiones por estanques. (Cuadro-A1)

Población y porcentaje de sobrevivencia: se realizaron utilizando la técnica del transepto que consiste en trazar una línea transversal en el estanque realizando diez lances con una atarraya de 2.0 m² de diámetro. En cada lance se contabilizan los camarones, al finalizar el muestreo se suman todos los camarones de los lances. Se utilizó la siguiente formula:

1. $N^{\circ}Tca/N^{\circ}Lan = Pca$
 1. $Pca/Aat = Cantmc$
 2. $Cantmc * 10,000 \text{ metros cuadrados} = PobHc$
 3. $PobHc * AHcE = PobE$
 4. $PobE/Lavsem = \%Sobrevivencia$

❖ Donde:

1. $N^{\circ}Tca =$ Numero de camarones totales
2. $N^{\circ}Lan =$ Numero de Lances realizados
3. $Pca =$ Promedio de camarones
4. $Aat =$ Área de la Atarraya
5. $Cantmc =$ Cantidad de camarones por metro cuadrado

6. PobHc= Población de camarones por Hectárea
7. AHcE= Area de los estanques en Hectáreas
8. PobE= Población en número de individuos por estanque
9. Lavsem= la cantidad de larvas sembradas al inicio

Biomasa: se determinó utilizando la fórmula: $(P \times PS/454 \text{ g}/2.2 \text{ lbs})$ donde P: población, PS: peso semanal en gramos entre 454 gramos para obtenerlo en libras y entre 2.2 libras para obtenerlo en kilogramos.

Factor de conversión: formula: $(PC \times A)$ donde PC: peso de camarón y A: alimento abastecido. El rango que se utilizó esta entre 1.1 a 1.3 para el estudio.

Rendimiento: formula: $(c \times UA)$ donde c: cantidad de camarón producido y UA: unidad de área.

3.4.7. Parámetros físicos.

Se realizó la medición de del oxígeno disuelto y temperatura desde el centro del estanque por medio de un oxigenometro de la marca YSI® modelo Pro20, haciendo llegar la sonda hasta el fondo del estanque durante un periodo de dos a tres minutos hasta que se estabilizó el valor. La turbidez se midió por medio de un disco Secchi, tomando la medición desde el centro del estanque. (Cuadro-A6).

3.5. Muestras.

Para los parámetros físicos, temperatura, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno se realizaron muestreos semanales en dos periodos uno a las 6:00 am y el otro a las 5: 00 pm, los cuales fueron tomados directamente de los estanques en estudio. Mientras que los parámetros químicos, microbiológicos y biológicos, se realizaron una vez por mes en dos puntos, uno se realizó en la compuerta entrada (CE) y el otro en la compuerta de salida (CS) de cada estanque. El agua que se utilizó para los parámetros químico se recolectó en frascos de un litro, para los parámetros microbiológico en frascos de un litro estériles, y para el parámetro biológico en frascos ámbar de un litro. El pH se realizó un muestreo semanal en el periodo de 6:00 am. Para los parámetros productivos los muestreos se realizaron semanalmente durante un periodo de 15 semanas en las que duro la investigación. Para el análisis en fresco de los camarones se realizaron dos muestreos, el primero se realizó dos meses a partir de la fecha de siembra y el segundo 30 días después del primer muestreo.

3.6. Metodología estadística.

Para los parámetros físicos, químicos, biológicos, microbiológicos y productivos se utilizó la estadística descriptiva que trata con datos numéricos concretos que sirven de base al proceso estadístico de descripción; para esto se vale de la recolección, presentación, tabulación y análisis de resultados (Bonilla 1986). Para la interpretación de los resultados obtenidos se utilizó el índice del Estado Trófico (TRIX) y el Índice de Calidad de Agua (ICA), aplicando su fórmula y comparándolo con su cuadro de interpretación. Para la recopilación de datos se utilizó el programa de Microsoft Excel 2010®, para el análisis estadístico descriptivo de los resultados se utilizó el programa estadístico llamado InfoStat® y para medir la diferencia significativa entre los tratamientos se utilizó la prueba de T Student.

3.6.1. Prueba Estadística.

La prueba para el análisis de resultados fue la prueba estadística de “t” de Student, donde se comparan las medias y las desviaciones estándar de grupo de datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias (Ramos 1999). La fórmula es:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Dónde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student.

\bar{X}_1 = valor promedio del grupo 1.

\bar{X}_2 = valor promedio del grupo 2.

σ_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos.

N_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

N_2 = tamaño de la muestra del grupo 1.

Ecuación para obtener la desviación estándar ponderada:

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{SC_1 + SC_2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

Dónde:

σ_p = desviación estándar ponderada.

SC = suma de cuadrados de cada grupo.

N = tamaño de la muestra 1 y 2.

3.6.2. Configuración de tratamientos y comparaciones.

Cuadro 1. Configuración de cada tratamiento.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Estanque 10	Estanque 11	Estanque 12	Estanque 13
EPICIN PST + EPICIN G2	EPICIN PST + EPICIN G2	EPICIN PST + E91*	EPICIN PST + E33**

*E91: Estanque 9, muestra 1 **E33: Estanque 3, Muestra 3.

Fuente: Propia 2017.

El cuadro 1 muestra la forma en que se configuraron los tratamientos que se evaluaron durante la investigación realizando las comparaciones en grupos de dos, para cual, se decidió comparar los resultados entre los tratamientos 1 – 4 y tratamientos 2 -3. Ya que, el objetivo de la investigación es medir la eficiencia de los probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas contra los estanques con probiotico comercial.

Las variables a las cuales se les aplico la prueba de T Student se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables de la investigación.

Variables	Unidad
Oxígeno disuelto	mg/l
Porcentaje de Saturación de oxígeno	%
Temperatura del agua	°C
pH	Log I H
Fosforo total	mg/l
Fosfatos	mg/l
Nitrógeno Total	mg/l
Nitratos	mg/l
Nitritos	mg/l
Sílice	mg/l
Clorofila <u>a</u>	mg/m ³
Turbidez	cm
Salinidad	mg/l
Alcalinidad	mg/l
Dureza	mg/l
Porcentaje de sobrevivencia	%
Población	Número de individuos

Biomasa	kg
Peso promedio del camarón	grs
Incremento de peso	grs
Factor de conversión alimenticia	

Fuente: Propia 2017.

Al mismo tiempo se realizaron comparaciones de los análisis en fresco y su respectiva bacteriología, abundancia e identificación de fitoplancton, bacteriología del agua (Bacterias heterótrofos, *Pseudomonas* spp y *Vibrios* spp), comparación de colonización de bacterias ácido lácticas.

3.7. Metodología económica.

Se realizó una relación beneficio-costo que es el cociente de dividir el valor actualizado de los beneficios del proyecto (ingresos) entre el valor actualizado de los costos (egresos) (Pérez 2009). La fórmula es: **R B/C: valor presente de los ingresos/ valor presente de los egresos**. Para el proyecto se utilizó el costo de la larva, costo de la cosecha, costo de alimentación, pago de planilla, pago de combustible y los ingresos obtenidos de la venta de camarón blanco comparando dos estanque testigo con respecto a dos estanques que tiene similares condiciones, utilizando la aplicación de las bacterias ácido lácticas nativas para determinar si es rentable o no su uso en la camaronicultura.

3.7.1. Análisis de dominancia.

Se realizó un análisis de dominancia, el cual evaluó que tratamiento posee los mejores resultados en cuanto al análisis de la relación de beneficio costo, este propuso cuál de los tratamientos es dominado por la mejor rentabilidad al final de la investigación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Caracterización e identificación de bacterias ácido lácticas y *Vibrios* spp a partir de intestino y hepatopáncreas (HP).

Se recolectaron 60 camarones de los cuales para la extracción y caracterización de las bacterias ácido lácticas, se utilizaron 40 camarones, 10 por cada uno de los estanques seleccionados (E3, E7, E9 y E10). A los cuales se les realizó una disección para la extracción del intestino y hepatopáncreas (HP), los promedios de peso por estanque se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Peso promedio de los camarones, intestino y hepatopáncreas (HP).

Órgano	Estanque 3	Estanque 7	Estanque 9	Estanque 10
Peso promedio del camarón (g)	28.3	28.59	29.01	28.95
Intestino (g)	0.076	0.075	0.077	0.073
Hepatopáncreas (g) (HP)	0.659	0.584	0.819	0.741

Fuente: laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2. Colecta y aislamiento de los Lactobacilos

La colecta de muestras en los estanques seleccionados fue acertada ya que los Lactobacilos fueron aislados en un 100% de las muestras a partir del tubo digestivo de los camarones cultivados en los cuatro estanques, considerando que el pez Sambo, presente en esos estanques es el que aporta la carga de los Lactobacilos. Las 40 muestras procesadas presentaron crecimiento bacteriano. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de la colecta y aislamiento de los Lactobacilos.

CRECIMIENTO EN AGAR RMS							
ESTANQUE 3		ESTANQUE 7		ESTANQUE 9		ESTANQUE 10	
E31	+	E71	+	E91	+	E101	+
E32	+	E72	+	E92	+	E102	+
E33	+	E73	+	E93	+	E103	+
E34	+	E74	+	E94	+	E104	+
E35	+	E75	+	E95	+	E105	+
E36	+	E76	+	E96	+	E106	+
E37	+	E77	+	E97	+	E107	+
E38	+	E78	+	E98	+	E108	+
E39	+	E79	+	E99	+	E109	+
E310	+	E710	+	E910	+	E1010	+

Fuente: laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2.1. Morfología microscópica de los lactobacilos

Después de realizar la tinción de Gram y enfocarlos en el microscopio se observaron bacilos cortos Gram positivos en cadenas cortas. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de la tinción de Gram para las bacterias ácido lácticas nativas.

MUESTRA	TIPO DE TINCIÓN GRAM.	
	GRAMPOSITIVAS	GRAMNEGATIVAS
E33	+	-
E72	+	-
E91	+	-
E107	+	-

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2.2. Características macroscópicas de lactobacilos aislados

El medio de cultivo Agar RMS es selectivo y diferencial para bacterias ácido lácticas; las colonias que se observaron presentaron forma circular, bordes enteros, superficie lisa, de aspecto húmedo, una elevación convexa, brillantes y una coloración azul intensa tanto de las colonias como del medio de cultivo.

4.2.3. Morfología microscópica de Vibrios aislados

Se observaron bacilos curvos Gramnegativos en cadenas cortas o solas que mide 0.5 – 0.8 μm de diámetro, 1.4 - 2.6 μm de largo.

4.2.3.1. Clasificación de Vibrios de acuerdo a la tinción de Gram

Cuadro 6. Resultados de la tinción de Gram para bacterias del tipo Vibrio.

Colonias	TIPO DE TINCIÓN GRAM.	
	GRAMPOSITIVAS	GRAMNEGATIVAS
Amarillas	-	+
Verdes	-	+

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2.3.2. Pruebas bioquímicas para lactobacilos y *Vibrios* spp aislados.

4.2.3.2.1. Pruebas bioquímicas para los lactobacilos aislado

Para realizar las pruebas de caracterización de los Lactobacilos con función probiótica se seleccionó únicamente una bacteria para cada estanque.

Las bacterias aisladas cumplen la prueba de la oxidasa y catalasa las cuales tienen que ser negativas para los Lactobacilos. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de las pruebas de oxidasa y catalasa para las bacterias ácido lácticas nativas.

MUESTRA	PRUEBAS	
	OXIDASA	CATALASA
E33	-	-
E72	-	-
E91	-	-
E107	-	-

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2.4. Prueba API CHL50 para lactobacilo

Las cuatro bacterias aisladas a partir del tubo digestivo de los camarones según resultados de la prueba API 50 CHL son E33 *Lactococcus lactis* ssp, E72 *Lactococcus lactis* ssp, E91 *Lactobacillus paracasei* ssp y E107 *Lactobacillus paracasei* ssp, bacterias que pueden utilizarse como probióticas en la dieta alimentaria de los camarones con el fin de mejorar su sistema inmunológico y por ende la productividad.

4.2.5. Pruebas bioquímicas de los *Vibrios* aislados

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para identificar la especie de *Vibrio* (Cuadro 8), se pudieron aislar dos bacterias, las amarillas corresponden al *Vibrio alginolyticus* y las verdes al *Vibrio parahemolyticus* y la bacteria que se utilizó para realizar la prueba de actividad antibacteriana de los Lactobacilos fue el *Vibrio parahemolyticus*, por considerarse un patógeno para los camarones cultivados en estanques.

Cuadro 8. Pruebas bioquímicas de las bacterias del tipo *Vibrios* aislados.

PRUEBA	BACTERIA	
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Tinción de Gram	-	-
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
TSI	A/A, Gas (-) H ₂ S (-)	K/A, Gas (-), H ₂ S (-)
Citrato	-	-
Movilidad	+	+
Rojo de Metilo	+	-
Voges Proskauer	+	-
Indol	-	+
Crecimiento a 0% NaCl	-	-
Crecimiento a 10% NaCl	+	-

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.2.6. Resumen de la caracterización probiótica.

Una de las principales características a considerar en una especie bacteriana para evaluar su potencial probiótico es su inocuidad, tanto para los camarones como para el ser humano que es el consumidor final de la especie de cultivo. La prueba de hemólisis es una de las más aplicables en este sentido, ya que se basa en la capacidad de la bacteria de lisar las células sanguíneas del hospedero; las cepas *Lactococcus lactis* ssp y el *Lactobacillus paracasei* ssp aisladas del E33 y E91 no representan un riesgo para los camarones al presentar hemólisis gamma. Además estas dos bacterias presenta un amplio rango de pH que se extiende de 4 a 10, una amplia tolerancia a la salinidad que va de 0% a 10%, la prueba de actividad enzimática extracelular indica que no presentan actividad proteolítica ni lipolítica observable en medio sólido, la prueba de adhesión es otro parámetro muy importante a considerar porque brinda información aproximada de la adherencia del microorganismo en el epitelio intestinal del camarón, indicado que en la superficie existen propiedades donadoras de electrones gracias a la presencia de grupos básicos, como por ejemplo, grupos carboxílicos (COO-), fosfatos

(PO₄⁻²) y grupos aminos (NH₂). La capacidad de adherencia de los aislados obtenido del tracto gastrointestinal de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) se determinó in vitro. Otra prueba a tomar en cuenta en la selección de las bacterias aisladas con potencial probióticos es la actividad antibacteriana, para lo cual dicha prueba se realizó utilizando el *Vibrio parahaemolyticus* aislado a partir de hepatopáncreas de los camarones de los E3, E7, E9 y E10. En la cual permite identificar la liberación de sustancias bactericidas por parte de los *Lactococcus* y *Lactobacillus* aislado que inhiben el crecimiento del *Vibrio parahemolyticus* que es considerado como patógeno para los camarones. (Cuadro 9).

Después de haber realizado todas las pruebas de caracterización de las bacterias aisladas a partir del *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Las que tienen potencial probiótico porque cumplen con todas las características probióticas son las E33 y la E91 por lo que estas dos bacterias fueron seleccionadas, para realizar la segunda fase del proyecto de Investigación.

Cuadro 9. Resultados de las pruebas de factibilidad probiótica para la caracterización de las bacterias ácido lácticas nativas.

PRUEBAS		MUESTRAS			
		E33	E72	E91	E107
Tinción Gram		+	+	+	+
Hemolisis		γ	γ	γ	γ
Conteo UFC/ml		6.00E+08	1.00E+06	5.00E+08	6.50E+08
Tolerancia a pH		4 – 10	5 – 10	4 – 10	4– 10
Tolerancia a Salinidad		0% - 10%	0% - 6%	0% - 10%	0% - 7%
Actividad enzimática	Degradación de la caseína	NDS	NDS	NDS	NDS
	Degradación de la gelatina	NDS	NDS	NDS	NDS
	Degradación del Tween 80	NDS	NDS	NDS	NDS
Adhesión a solventes	% de adhesión a cloroformo	60.91	57.82	82.11	57.37
	% de adhesión a tolueno	70.32	52.12	65.47	59.02
	% de adhesión a xileno	55.24	35.52	54.64	45.20
Actividad antibacteriana (mm)		14.0	7.0	15.0	7.0
Identificación según API HCL50		<i>Lactococcus lactis</i> ssp	<i>Lactococcus lactis</i> ssp	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador 2016.

4.3. Fase de Campo.

4.3.1. Parámetros Físicos y Químicos.

4.3.1.1. Parámetros Físicos (Oxígeno Disuelto y Temperatura del Agua)

Como muestra el cuadro 10 la prueba de T para el muestreo de 6:00 am y 5:00 pm en cuanto al parámetro de oxígeno disuelto, resulto no significativo, obteniendo el mejor promedio en ambos muestreos el T4, mientras que el parámetro de temperatura en ambos muestreos la prueba de T demostró que no existen diferencias significativas, se registró que en el muestreo de las 6:00 am el mejor promedio es del T1, mientras que a las 5:00 pm el mejor promedio lo registro el T4. (Cuadro-A11, 13, 19, 21).

Cuadro 10. Prueba de T de Student para el Oxígeno disuelto y Temperatura del agua en la comparación entre T1-T4 para los muestreo de 6:00 am y 5:00 pm.

Oxígeno Disuelto (mg/l)					Temperatura °C			
Muestreo de 6:00 am								
Comparación de tratamientos	Valor P	CV	Desviación	Promedio	Valor P	CV	Desviación	Promedio
T1	0.660	24.77	0.969	3.43	0.707	1.81	0.538	30.84
T4		5	20.86	0.83		7	2.65	0.7874
Muestreo de 5:00 pm								
Comparación de tratamientos	Valor P	CV	Desviación	Promedio	Valor P	CV	Desviación	Promedio
T1	0.382	24.02	2.1	8.26	0.113	2.32	0.72	32.32
T4		7	31.99	3.408		7	2.49	1.1

Fuente: Granja Las Ánimas 2017.

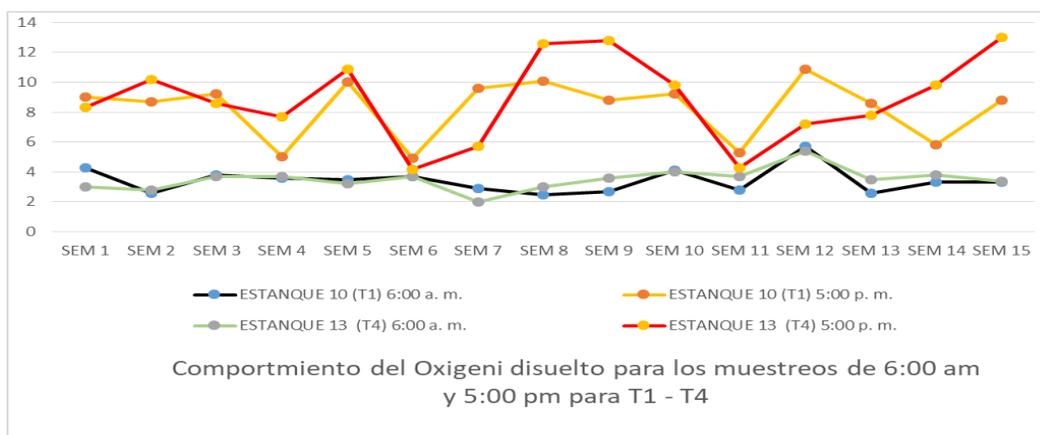


Figura 1. Oxígeno disuelto para la comparación de 6:00 am y 5:00pm entre T1 - T4.

Como muestra la figura 1, en la semana 1 las concentraciones de oxígeno disuelto tenían una diferencia de 1.3 mg/l, ya para el periodo de la semana 2 a la semana 6 las concentraciones se comportan de manera similar con diferencias de 0.1 a 0.3 mg/l, obteniendo el T4 su menor registro con 2.0 mg/l, para la semana 7, comenzando un aumento progresivo hasta la semana 10 con un valor de 4.0 mg/l, registrando para la semana 11 su mayor concentración con 5.4mg/l, contra el mayor registro presentado por el T1 en la semana 11 de 5.7 mg/l, todo esto para el muestreo de 6:00 am. Mientras que para el muestreo de 5:00 pm, el T4 posee la mayor concentración de oxígeno disuelto en la semana 15 con un valor de 13.0 mg/l, contra un 8.8 mg/l para el T1 en la misma semana, y la mayor concentración registrada por el T1 es de 10.9 mg/l en la semana 12, contra un 7.2 mg/l del T4 para la misma semana. (Cuadro-A12, 14).

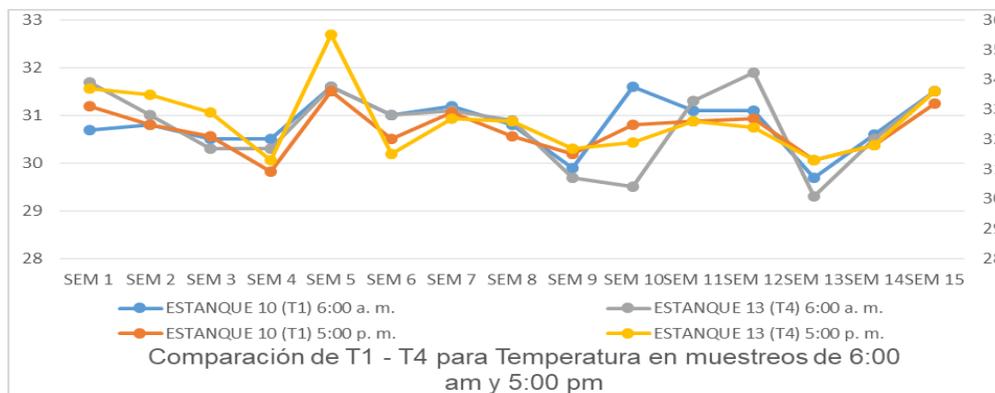


Figura 2. Comparación de la Temperatura °C para T1 - T4.

Como muestra la figura 2 el comportamiento de las oscilaciones de la temperatura para las 6:00 am, es similar en ambos tratamientos, registrando en la semana 12 para el E13 la mayor con valor de 31.9°C y la menor en la semana 13 con 29.3, mientras que el E10 registra su mayor temperatura en la semana 5 y 10 con valor de 31.6°C y su menor registro en la semana 13 con 29.7°C. Mientras para las 5:00 pm, 22 las temperaturas se comportan de forma fluctuante para ambos tratamientos, pero se puede observar que existe menor variación en el E10, registrando la mayor temperatura en la semana 5 con 33.6°C y el menor registro en la semana 4 con 30.9°C, por otra parte el mayor registro del E13 en la semana 5 con valor de 35.5°C y el menor en la semana 13 con 31.3°C. (Cuadro-A20, 22).

4.3.1.2. Comparación de T2 – T3 para los muestreos de 6:00 am y 5:00 pm.

Cuadro 11. Prueba de T de Student para el Oxígeno disuelto y Temperatura del agua en la comparación entre T2-T3 para los muestreo de 6:00 am y 5:00 pm.

Oxígeno Disuelto (mg/l)					Temperatura °C			
Muestreo de 6:00 am								
Comparación de tratamientos	Valor P	CV	Desviación	Promedio	Valor P	CV	Desviación	Promedio
T2	0.2629	25.28	1.081	3.62	0.0468	1.8	0.529	30.71
T3		28.48	1.296	3.81		2.1	0.6244	30.93
Muestreo de 5:00 pm								
Comparación de tratamientos	Valor P	CV	Desviación	Promedio	Valor P	CV	Desviación	Promedio
T2	0.5314	30.47	2.11	7.17	0.9708	3.15	0.985	32.31
T3		32.54	2.43	7.74		2.87	0.894	32.31

Fuente: Granja Las Ánimas 2017.

Como se muestra en el cuadro 11, para el parámetro de oxígeno disuelto en ambos muestreos la prueba de T, resultaron no significativas, registrando el mejor promedio en ambos muestreos el T3, mientras que para el parámetro de temperatura en el muestreo de 6:00 am, la prueba de T muestra un resultado significativo, es decir que existen diferencias entre los tratamientos, siendo el T3 el que presenta los mejores resultados, mientras que para el muestreo de las 5:00 pm la prueba es no significativa y en ambos tratamientos el promedio es igual. (Cuadro-A15, 17, 23, 25).

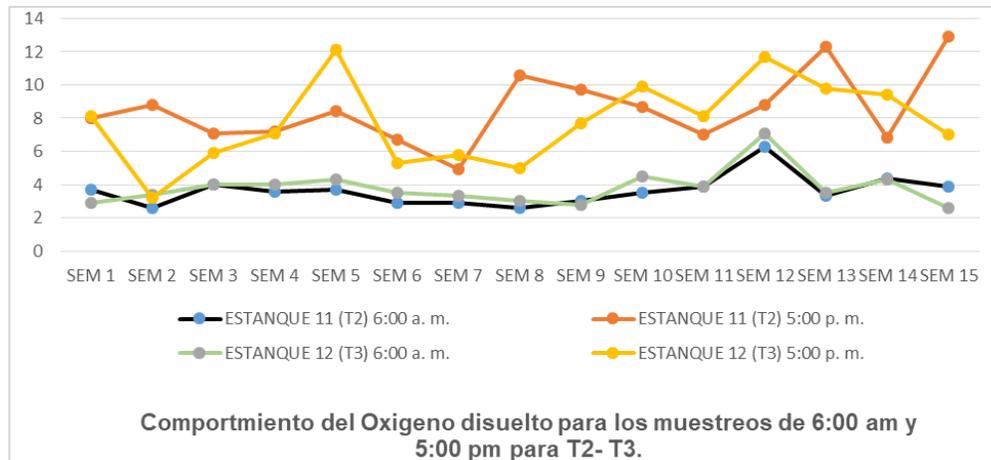


Figura 3. Comportamiento del Oxígeno disuelto para los muestreos de 6:00 am y 5:00 pm para T2- T3.

Como muestra la figura 3 el comportamiento de la concentración de oxígeno a las 6:00 am para el T3 muestra un aumento desde la semana 1 a 5, comparada con la oscilación del T2 que registra mayor concentración de oxígeno en la semana 1, disminuyendo en 1.1 mg/l para la semana 2, fluctuando entre 0.1 a 1.4 mg/l en las semanas 3 a la 5, registrando una disminución para ambos tratamientos de la semana 6 a la 8, registrando su mayor concentración en la semana 12 con valor de 7.1 mg/l para el T3 y 6.3 mg/l para el T2. Mientras que para las 5:00 pm, muestra el comportamiento heterogéneamente oscilante que las concentraciones de oxígeno disuelto de ambos tratamientos, registrando para el T3 en la semana 5 su mayor concentración con valor de 12.1 mg/l y la menor en la semana 2 con 3.2 mg/l, contra lo registrado por el T2 con un valor máximo de 12.3 mg/l en la semana 13 y su menor concentración en la semana 7 con valor de 4.9 mg/l. (Cuadro-A16, 18).

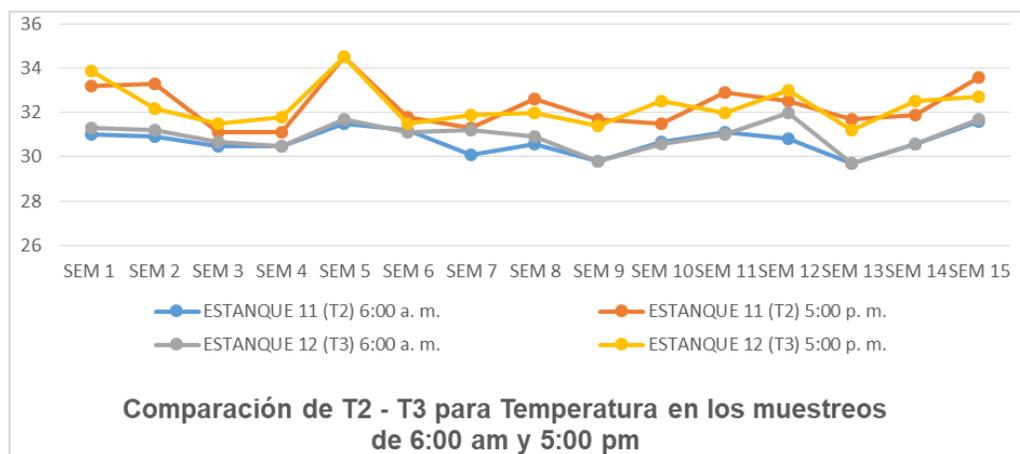


Figura 4. Comportamiento de la Temperatura para T2 - T3.

Como se puede observar en la figura anterior existen cambios oscilatorios de la temperatura del agua en el muestreo de 6:00 am en ambos tratamientos, registrando en el T2 la mayor temperatura en la semana 15 con 31.7°C y la menor en la semana 13 con 29.7°C; mientras los registros del T3 muestran que la mayor temperatura se manifestó en la semana 12 con 32.0°C y la menor en la semana 13 con 29.7°C. Mientras que para el muestreo de 5:00 pm, las temperaturas se comportan de manera fluctuante, denotando el mayor registro para el T2 con valor de 34.5°C en la semana 15, y la menor registrada en la semana 3 y 4 con valor de 31.1°C, mientras que para el T3 en la semana 5 se presenta su mayor registro de temperatura con valor de 34.5°C y el menor en la semana 13 con valor de 31.2°C. (Cuadro-A24, 26).

4.3.2. Discusión de Resultados para Oxígeno Disuelto para las comparaciones de T1 – T4 y T2 –T3.

Según Lara-Espinoza *et al* (2015), que ocupó un muestreo igual al utilizado en la investigación en periodos de 6:00 am y 5:00 pm, para lo cual registro un promedio de 4.71 ± 0.64 mg/l, siendo este valor el promedio de ambos muestreos; valor que se encuentra por debajo por lo registrado por tratamientos, ya que, en los que se utilizó los probióticos registran un promedio de 5.61 mg/l y mientras en los que se utilizó las bacterias nativas registraron un promedio de 5.77 mg/l para *Lactobacillus paracasei* y de 6.18 mg/l para *Lactococcus lactis*.

Los datos obtenidos en la investigación para los muestreos de 6:00 am para las comparaciones entre los tratamientos donde se utilizó el probiotico comercial y las bacterias nativas, se encuentran ligeramente arriba de los 3.0 mg/l, propuesto por Martínez (1998), el cual fue citado por Barreto (2012), ya que, este valor puede ser fatal para los camarones. Por otra parte, los resultados promedios de la investigación están por debajo de lo registrado en la investigación de Aragón-Noriega *et al* (2000), ya que para el muestreo que se realizó en la mañana el promedio era de 4.83 mg/l, mientras que para el muestreo que Aragón-Noriega realizó por la tarde el promedio fue de 9.01 mg/l, ligeramente superior para el registro de las 5:00 pm para los tratamientos 1 y 4 con 8.26 mg/l y 8.86mg/l respectivamente, mostrando una diferencia de 1.55 mg/l en promedio con lo registrado por los tratamientos 2 y 3.

Los resultados de la investigación para el oxígeno disuelto, concuerdan con lo presentado por Rugama (2015), para lo cual en sus dos tratamientos en estudio la oscilación del oxígeno disuelto se encontraba dentro del rango de 3 a 8 mg/l, mostrando que para la investigación de Rugama al igual que en esta se obtuvieron valores menores a 3.0 mg/l, sin mayores consecuencias.

4.4. Discusión de resultados para Temperatura del Agua para las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Los resultados presentados en la oscilación de la temperatura para los distintos tratamientos difiere de lo presentado por Anaya (2005), ya que, la oscilación en su investigación es de 28.8 ± 0.6 °C, obteniendo un rango de 28.2 a 29.4 °C, mientras que la oscilación de las temperaturas para los distintos tratamientos se encuentra entre 29.3 a 35.5°C. Por otra parte estos resultados son similares a lo propuesto por Rugama (2015), ya que, en su investigación la oscilación del rango de las temperaturas es de 26.8 a 35.5 °C, una diferencia de 3.5°C para el valor mínimo. Mientras que lo propuesto por Aragón-Noriega *et al* (2000), en dos muestreo

uno por la mañana con 23.64°C y el otro por la tarde con 26.30°C, son inferiores a los registros de los tratamientos en estudio con promedios para T1=30.84°C para la mañana y 32.32°C por la tarde, para el T2 = 30.71°C por la mañana y de 32.31°C por la tarde, para el T3= 30.93°C por la mañana y de 32.31°C por la tarde y para el T4 =30.72°C por la mañana y de 32.60°C por la tarde. Al mismo tiempo los resultados son superiores a los que recomienda Limsuwan (2005), con un rango de 27 a 31°C, este afirma que por debajo del límite inferior el crecimiento es lento y arriba del límite superior los camarones pierden peso por el alto metabolismo; pero por la ubicación de la granja las temperaturas superiores a 31°C son comunes y no afectan tan drásticamente a los camarones.

4.4.1. Comparación de la Turbidez del Agua para T1-T4.

La prueba de T demuestra estadísticamente que no existen diferencias significativas para la turbidez del agua con $P>0.4027$, es decir que las partículas en suspensión se comportan de maneras similares, mostrando esto un ligero aumento en T1 con un promedio de 38 cm con respecto a los 36.33 cm del T4. Esto indica que existe una mayor variación entre el comportamiento de la lámina de turbidez dentro del T1, ya que posee una desviación estándar de 6.00, mostrando una oscilación que va desde los 32 a 44 cm de lámina de turbidez y su coeficiente de variación igual a 16.34%, indicando una mayor variación entre datos; contrastando con el T4 con una desviación estándar de 3.85, determinando una oscilación entre 32.4 a 40.2 cm de lámina de turbidez y coeficiente de variación de 10.99% el cual demuestra que los datos de las láminas de turbidez son más homogéneos. (Cuadro-A52).

4.4.2. Comparación de la Turbidez del agua para T2-T3.

Estadísticamente se puede concluir que no existen diferencias significativas para la prueba de T con $P>0.1689$, es decir, que el comportamiento de la lámina de turbidez del agua en ambos tratamientos es igual; obteniendo leves diferencias entre sus parámetros, tales como el promedio que en el T2 es de 37.67 cm y el T3 es de 35.33 cm; con valores de la desviación estándar de 5.734 para T2 mostrando una oscilación entre 31.9 a 43.4 cm, con un comportamiento homogéneo debido a que su coeficiente de variación es de 15.76%; y mientras que el T3 posee una desviación estándar de 6.182 oscilando sus valores de lámina entre 29.1 a 41.51 cm con un coeficiente de variación de 18.11%. (Cuadro-A53).

4.4.3. Discusión de Resultados para Turbidez del Agua para las comparaciones T1 – T4 y T2 – T3.

La investigación comprueba que los tratamientos con las bacterias nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*) se encuentran dentro del rango óptimo de eficiencia ya que el promedio de la lámina de Turbidez para T3 = 35.33 cm y T4 = 36.33 cm, ya que la lectura del disco de Secchi según Boyd (2001), el rango óptimo de eficiencia se encuentra en láminas de turbidez entre 30 a 45 cm de espesor.

La turbidez del agua para los rangos por tratamiento fueron de 30 a 50 cm, con promedio de 38 cm para T1; 30 a 50 cm y promedio de 37.67 cm para T2; 30 a 45 cm y promedio de 35.33 cm para T3; 30 a 45 cm y promedio de 36.33 para T4, registros superiores a los observados por Hernández (2016) ya que el rango que registro es de 20.5 a 30.9 cm; y similares a los propuestos por (Martínez- Córdova *et al* 1998; Yusoff *et al* 2002; Buford *et al* 2003; Hari *et al* 2004; Casillas – Hernández *et al* 2007) con un rango de 30.5 a 60 cm, estos autores fueron citados por Hernández (2016).

4.5. Parámetros Químicos.

4.5.1. Comparación de pH.

En estanques de producción la medición de este parámetro es de vital importancia ya que afecta el metabolismo y otros procesos fisiológicos de los organismos acuáticos. Puede crear estrés, aumentar la susceptibilidad a enfermedades, disminuir los niveles de producción, causar un pobre crecimiento y muerte.

Debido a esto en la investigación se realizó un análisis de los niveles de pH en ciclo productivo I 2016, para verificar el comportamiento de este vital parámetro ya bajo los lineamientos de la investigación para el ciclo productivo I 2017.

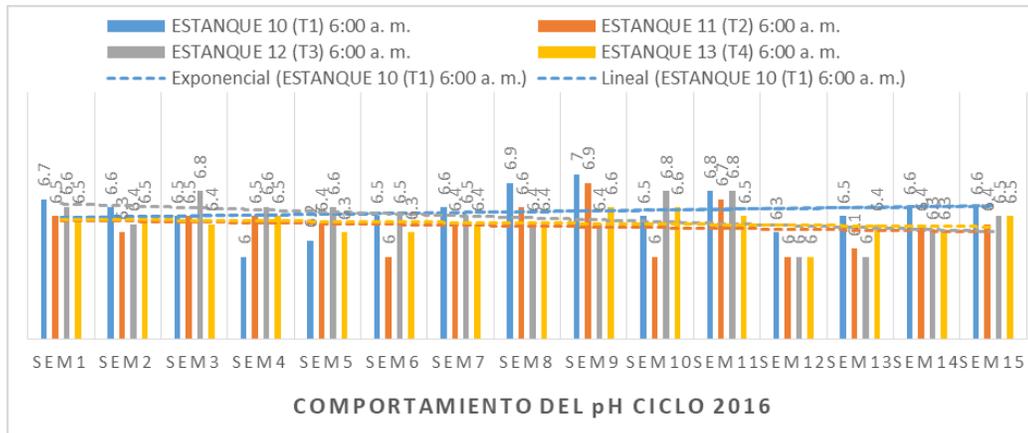


Figura 5. Comportamiento del pH para el ciclo productivo 2016.

Según la figura 5, el comportamiento del pH en el ciclo productivo antes del montaje del experimento con bacterias nativas se comportó de manera fluctuante, podemos observar que para el T1 la constante del pH oscilo entre 6 a 7, determinando que el índice más bajo de pH, para este estanque fue de 6 en diferentes periodos de muestreo, mientras que el T2 su oscilación se encuentra entre el rango de 6 a 6.9, seguido del T3 con oscilación entre 6 a 6.6 y el T4 con una oscilación de 6 a 6.5. (Cuadro-A27).

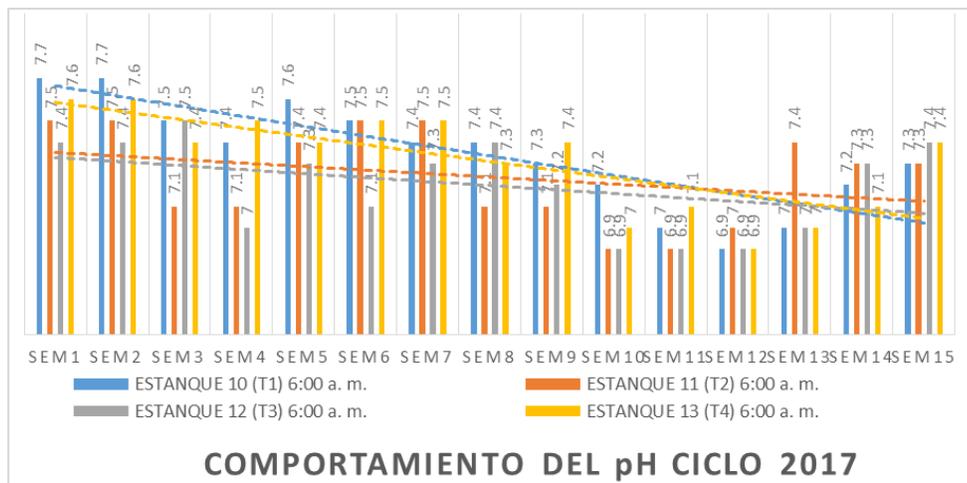


Figura 6. Comportamiento del pH para el ciclo productivo 2017.

La figura 6 muestra como oscilo el pH durante el ciclo productivo I 2017, ya con la incorporación de las bacterias nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*), se puede denotar el incremento del pH con respecto al ciclo I 2016, ya que el comportamiento del T1 con respecto

a esta variable fue entre los valores de 6.9 a 7.7, comparando con los valores del ciclo I 2016 se registran aumentos de 0.9 al menor valor y 0.7 en comparación al mayor valor; el resultado de T2 en el ciclo 2017 registró una oscilación entre 6.9 a 7.5, mostrando un aumento a comparación del menor valor del ciclo I 2016 en 0.9 y el máximo valor en 0.6; mientras el T3 registró una oscilación entre 6.9 a 7.5, se puede determinar que se registró un aumento con respecto a los valores del ciclo I 2016 para el menor valor de 0.9 y para el mayor valor de 0.7; obteniendo para el T4 una oscilación entre 6.9 a 7.6, registrando un aumento con respecto al ciclo I productivo 2016 para el menor valor de 0.9 y para el mayor valor de 10. (Cuadro-A28).

4.5.2. Discusión de resultados para pH para las comparaciones T1 – T4 y T2 – T3.

Se puede observar entre la comparación del comportamiento del pH entre los ciclos productivos I 2016 y 2017, un aumento favorable del pH, demostrando que la incorporación del probiotico comercial (EPICIN G2) y las bacterias nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*), ha favorecido a esta constante; podemos concluir que el comportamiento del probiotico y las baterías nativas son similares y generan condiciones que favorecen al desarrollo del camarón; ya que según Grupo Nueva PESCANOVA (2014), indica que el rango óptimo de pH oscila entre 7.5 a 8.5. Demostrando que las bacterias nativas han favorecido las condiciones por estanque. Mientras que lo propuesto por Aragón-Noriega *et al* (2000), se encuentra ligeramente arriba de lo presentado en la investigación con un valor promedio de 8.73 para el pH en los dos muestreos que realizó.

Los datos registrados por la investigación son similares a los resultados obtenidos por Lara-Espinoza *et al* (2015), con un promedio de 7.34 ± 0.15 de pH similar al rango de la investigación que va de 7 a 7.7, exceptuando las semanas de la 10 a la 12 donde el rango oscilo entre 6.9 a 7.1.

4.6. Comparación de los parámetros Nitrógeno Total, Nitratos, Nitritos, Fosforo total y Fosfatos para los T1- T4 y T2 – T3.

Como muestra el cuadro 12, la prueba de T muestra que no existen diferencias significativas para las comparaciones tanto en la compuerta de entrada, como en la compuerta de salida, esto indica que las diferencias que se observan son aleatorias, es decir, que tanto las bacterias ácido lácticas nativas utilizadas en la investigación y el probiotico comercial producen efectos similares en cuanto a las concentraciones de estos parámetros. (Cuadro-A29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 54, 55, 56, 57, 62, 63, 64, 65).

Cuadro 12. Prueba de t de Student para los parámetros de Nitrógeno Total, Nitratos, Nitritos, Fosforo total y Fosfatos para los T1-T4 y T2-T3.

Fosforo total (mg/l)			
Comparación entre estanques	Compuerta	Valor de P	Mayor Promedio
T1 - T4	Entrada	0.563	E13= 7.45
	Salida	0.4336	E10= 5.74
T2 - T3	Entrada	0.2567	E12= 6.53
	Salida	0.7002	E12= 5.76
Nitrógeno Total (mg/l)			
T1 - T4	Entrada	0.8732	E13= 3.40
	Salida	0.2065	E10= 3.01
T2 - T3	Entrada	0.4173	E11= 2.91
	Salida	0.9552	E12= 3.20
Nitratos (mg/l)			
T1 - T4	Entrada	0.7937	E10= 3.41
	Salida	0.1019	E10= 2.39
T2 - T3	Entrada	0.2676	E11= 3.28
	Salida	0.1519	E11= 1.67
Nitritos (mg/l)			
T1 - T4	Entrada	0.1343	E13=0.28
	Salida	0.3473	E10=0.38
T2 - T3	Entrada	0.1583	E12= 0.30
	Salida	0.8616	E12= 0.29
Fosfatos (mg/l)			
T1 - T4	Entrada	0.621	E13= 2.35
	Salida	0.3672	E10= 1.88
T2 - T3	Entrada	0.8543	E12= 2.10
	Salida	0.794	E12= 2.00

Fuente: Laboratorio Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador.

4.6.1. Discusión de resultados comparación de los parámetros Nitrógeno Total, Nitratos, Nitritos, Fosforo total y Fosfatos para los T1- T4 y T2 – T3.

El comportamiento de la concentración de fosforo total para esta investigación discrepan de lo obtenido por Saldías *et al* (2002), ya que las concentraciones son muy superiores a sus

registros; puesto que para el muestreo de entrada el registro fue de 0.23 ± 0.05 mg/l, contra lo presentado por los tratamientos en estudio con valores de T1= 5.67 mg/l, T2= 5.07 mg/l, T3= 6.53 mg/l y T4= 7.45 mg/l. ya para el registro de salida Saldias *et al* (2002) registro 0.42 ± 0.17 mg/l, también siendo este un registro inferior a lo que la investigación presentó con valores para T1= 5.74 mg/l, T2 = 5.37 mg/l, T3= 6.53 mg/l y T4= 5.29 mg/l. Se puede observar que los tratamientos T1 y T2 sigue la tendencia de los obtenidos por Saldias *et al*, ya que, el muestreo de entrada es menor que el muestreo de salida, siendo esta tendencia diferente en los tratamientos con bacterias nativas. Estos resultados también discrepan de los que obtuvo Molleda (2006), siéndolos registrados por la investigación ampliamente superiores, ya que, el promedio en tres años de estudio para tres sitios diferente fueron de Sitio 1= 6.76×10^{-3} mg/l, sitio 2= 0.039 mg/l y sitio 3= 0.0155 mg/l y los registrados por la investigación se encuentran en el rango de 5.22 a 6.60 mg/l.

Los registros de la concentración de nitrógeno total que obtuvieron durante la investigación se encuentran por debajo por lo registros de Saldias *et al* (2002), ya que, para el registro de entrada sus datos arrojaron una concentración de 3.6 a 6.0 mg/l, contra el rango de 2.30 a 3.40 mg/l en el muestreo de entrada para esta investigación; mientras los registros de salida que obtuvo Saldias *et al* (2002), se encuentran en el rango de 4.10 a 7.50 mg/l, rango superior a lo registrado por la investigación ya que su rango en el muestreo de salida es de 2.55 a 3.20 mg/l. Para esta investigación los promedios por tratamientos fueron los siguientes T1= 0.29 mg/l, T2=0.22 mg/l, T3= 0.295 mg/l y T4=0.28 mg/l, siendo estos valores ampliamente inferiores a lo observado por Lara- Espinoza *et al* (2015), con un promedio de 4.75 ± 4.4 mg/l, mostrando una oscilación en un rango de 0.1 a 13.6 mg/l, registrando como mayor valor el 13.6 mg/l, cabe mencionar que los muestreos para esta investigación los realizó Lara- Espinoza en un periodo de 26 días (del 14 al 40 de producción). Los resultados de esta investigación entran en el rango de 0.25 mg/l, que es el límite de toxicidad propuesto por Whetstone *et al* (2002), el cual fue citado por Anaya (2005), según Anaya para la semana 12 de su investigación registro el mayor valor de la concentración de nitritos con un valor de 6.0 mg/l, valor que es ampliamente superior a lo registrado por esta investigación.

Los valores de concentración de nitritos son superiores al 0.03 mg/l registrado por Martínez – Córdova *et al* (1998), el cual fue citado por Hernández (2016), el cual registro un promedio de 0.1 ± 0.06 mg/l como promedio, oscilando sus datos entre 0.001 a 0.28 mg/l, lo cual es concordante con la investigación. Los resultados de la investigación para los tratamientos registran rangos de 1 a 3.6 mg/l para T1; 0.9 a 2.3 mg/l para T2; 0.9 a 3.3 mg/l para T3; 0.8 a

5 para T4, mostrando semejanza a lo observado por Moreno (2017), con un rango de 0.45 a 5.0 mg/l, observando una discrepancia con los resultados observados por Milstein *et al* (2005), con un promedio de 0.13 mg/l, Casillas- Hernández *et al* (2007), con 0.49 mg/l, Burford *et al* (2003), con 0.57 mg/l, estas investigaciones fueron citadas por Moreno (2017), lo que indica que los valores de la concentración de fosfatos son considerablemente altas; al mismo tiempo podemos comparar la referencia de Rodríguez (2013), el cual cita a Clifford (1994), el cual propone un rango óptimo de fosfatos para estanques de camarón con valor de 0.1 a 0.3 mg/l, denotando que los resultados de la investigación presentan un aumento del 900% y un 1, 666.66 %, para los límites inferior y superior propuesto por Clifford.

Ya que la alta concentración de fosfatos que presenta la investigación no se asocia a la toxicidad en los camarones, cabe mencionar que esta puede deberse a la captación de fosfatos por reacciones químicas en los sedimentos de los estanques tradicionales de tierra, al mismo tiempo, ya que los estanque se encuentran ubicados en la zona manglar y aquí se dirigen las aguas residuales de las parcelas agrícolas productivas de la zona, aumenta la concentración de fosfatos por lo fertilizantes utilizados.

Las concentraciones para los nitratos se comportaron en los rangos de 0.48 a 9.74 mg/l para T1; 0.4 a 6.2 mg/l para T2; 0.65 a 3.3 mg/l para T3; 0.3 a 7.2 mg/l para T4 para el muestreo de entrada y para el muestreo de salida con rango 0.89 a 4.3 mg/l para T1; 0.64 a 3.05 mg/l para T2; 0.67 a 2.3 mg/l para T3 y 0.78 a 3.45 mg/l para T4. Estos rangos difieren de lo observado por Anaya (2005), con valor de 0.1 a 1.5 mg/l, Valenzuela – Quiñonez *et al* (2010), con 0.73 a 0.77 mg/l. Mientras los resultados se encuentran en los rangos propuestos por Boyd (s.f.), con valor de 2 a 10 mg/l y Méndez (2010), con valor de 0.25 a 13 mg/l.

4.7. Comparación de sílice para los T1- T4 y T2 – T3.

Cuadro 13. Prueba de t de Student para el parámetro del Sílice para los T1-T4 y T2-T3.

Sílice (mg/l)			
Comparación entre estanques	Compuerta	Valor de P	Mayor Promedio
T1 - T4	Entrada	0.3462	E10= 17.43
	Salida	0.8738	E10= 18.98
T2 - T3	Entrada	0.3051	E11= 18.94
	Salida	0.1181	E11= 21.30

Fuente: Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador 2017.

El cuadro 13, muestra el resultado de la prueba de T para sílice en las comparaciones de los tratamientos, estas resultaron ser no significativas, es decir que las diferencias que se presentan son aleatorias. (Cuadro-A58, 59, 60, 61).

4.7.1. Discusión de Resultados para el parámetro Sílice en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Los promedios de la concentración Sílice en dos muestreos uno de entrada y salida para los tratamientos registran con valores de 17.43 a 18.98 mg/l para T1; 18.94 a 21.3 mg/l para T2; 18.03 a 20.05 mg/l para T3 y 16.93 a 18.79 mg/l para T4, valores que se encuentran dentro del rango que propone Boyd (s.f.) con valor de 2 a 20 mg/l; mostrando concordancia con lo que recomienda PESANOVA (2015) el cual indica que el límite de la concentración de sílice es de 0.5 mg/l, y cualquier valor por debajo de este límite no favorece crecimiento de las diatomeas, y que se pueden encontrar concentraciones de 1000 mg/l para aguas salobres; mientras que lo observado por Silva y Acuña – Gonzales (2006) con valores de 12.7 a 68 mg/l mostrando valores superiores a lo registrado por esta investigación.

4.8. Comparación de la alcalinidad y dureza para los T1- T4 y T2 – T3.

Cuadro 14. Prueba de t para los parámetros de Alcalinidad y Dureza para los T1-T4 y T2-T3.

Alcalinidad (mg/l)			
Comparación entre estanques	Compuerta	Valor de P	Mayor Promedio
T1 - T4	Entrada	0.1885	E10= 174.5
	Salida	0.1237	E10=195.5
T2 - T3	Entrada	0.9329	E12= 177.5
	Salida	0.1715	E11= 184.5
Dureza del Agua (mg/l)			
T1 - T4	Entrada	0.115	E10= 2892.5
	Salida	0.0663	E10= 3162.5
T2 - T3	Entrada	0.4481	E11= 2812.5
	Salida	0.4325	E11= 6537.5

Fuente: Laboratorio Fisicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador 2017.

El Cuadro 14. Muestra el resultado de la prueba de T para las comparaciones entre los tratamientos en estudio, denotando que en ambos muestreo tanto compuerta de entrada como de salida el resultado es no significativo. (Cuadro-A42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50).



Figura 7. Comportamiento de la Dureza y alcalinidad del agua para los distintos tratamientos compuerta de entrada.

Como muestra la figura 7 para el primer muestreo la alcalinidad del agua se mantiene en un rango de 186 a 190 mg/l y la dureza en un rango de 3,350 a 3650 mg/l, para el segundo muestreo al alcalinidad baja a un rango de 168 a 174 mg/l y la dureza del agua para ese mismo muestreo baja a un rango de 3,200 a 3,500 mg/l, ya para el tercer muestreo donde la alcalinidad oscila entre 160 a 170 mg/l para los estanques T1 al T3 y en 8.5 mg/l para el T4. La dureza del agua disminuye con respecto a los anteriores muestreos en un rango de 2,000 a 2,700 mg/l, y se mantiene a la baja para el muestreo cuatro donde se encuentra en un rango de 1,700 a 1,900 mg/l y la alcalinidad oscila entre 168 a 188 mg/l. (Cuadro-A46).

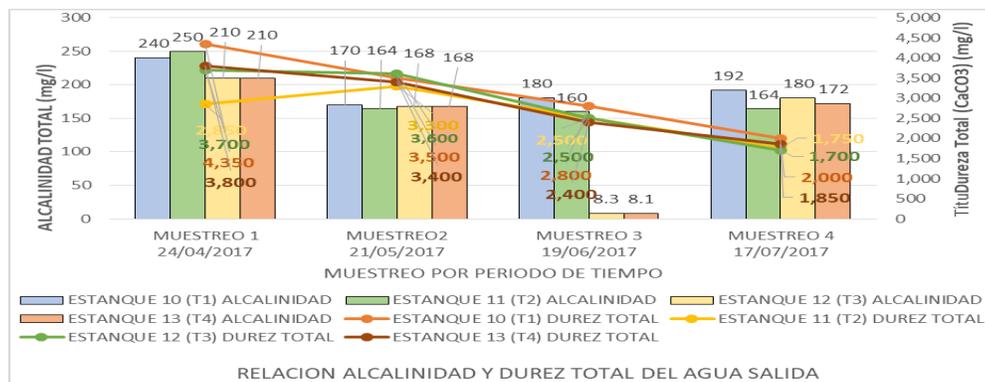


Figura 8. Comportamiento de la Dureza y alcalinidad del agua para los distintos tratamientos compuerta de salida.

Se puede observar que en el primer muestreo los valores de alcalinidad se encuentran entre 210 a 250 mg/l, mientras la dureza el agua oscila entre 2,850 a 4,350 mg/l; desmullendo estas concentraciones para el segundo muestreo, ya que, la alcalinidad registra un rango de 164 a 170 mg/l y la dureza 3,300 a 3,600 mg/l, aumentando solo en el T2, para el muestreo 3 la dureza sigue a la baja con rangos de 2,400 a 2,800 mg/l y mientras la alcalinidad para el T1 y T2 es de 180mg/l y 160 mg/l respectivamente y para el T3 y T4 con valores de 8.3 mg/l y 8.1

mg/l; mientras para el cuarto muestreo la alcalinidad oscila entre 172 a 192 mg/l y la dureza del agua mantiene la tendencia a la baja con un rango de 1,700 a 2,000 mg/l. (Cuadro-A51).

4.8.1. Discusión de Resultados para los parámetros Alcalinidad y Dureza en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Los promedios de la concentración de alcalinidad para la investigación por cada tratamiento fueron para T1=185 mg/l, T2= 178 mg/l, T3= 163.50 mg/l y T4=136.58 mg/l, los cuales están por encima del límite de 80 mg/l el cual lo propuso Limsuwan (2005), ya que para este cualquier valor por debajo de este rango genera problemas en el desarrollo de los camarones. Por otra parte autores como Boyd y Daniels (1994), citados por Hernández (2016), proponen que una concentración de 100 mg/l, favorecen el desarrollo de los camarones. Al mismo tiempo los promedios de la concentración de alcalinidad en esta investigación se encuentran dentro de los rango que observo Hernández (2016), con un promedio de 189 ± 55 mg/l, oscilando en el rango de 180 a 205 mg/l, concordante con los datos de esta investigación. Mientras que lo propuesto por Vinatea *et al* (2010), con promedio de 108.7 mg/l es inferior a los promedios registrados por los tratamientos. Al igual que lo propuesto por Hari *et al* (2004) y Ray *et al* (2011), citados por Hernández (2016), los cuales registraron concentraciones inferiores y superiores a las registradas por la investigación con valores de 0.5 mg/l y 294.30 mg/l.

Los valores promedios de dureza total registrados por los tratamientos son 2,987.5 mg/l para T1; 4, 675 mg/l para T2; 2, 781.25 mg/l para T3 y para T4 de 2,825mg/l, valores superiores a los registrados por Nunes, A y Velásquez (2002), con un rango de 300 a 900 mg/l, mientras que los registros que observo Solano (2003), para sus tratamientos son ligeramente inferiores con rangos de 450 a 1700 mg/l para TA y 500 a 1900 mg/l para TB. Contrastando con lo propuesto por Limsuwan (2005), el cual menciona que el rango óptimo es de 80 a 200 mg/l.

4.9. Comparación de la Salinidad en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

La investigación consideró la concentración de la salinidad, para lo cual se realizaron muestreos semanales, para registrar el comportamiento de esta; oscilando entre 5 a 25 mg/l, registrando un disminución gradual a partir de la semana 7 con valores >20 mg/l llegando hasta 5 mg/l para la semana 15.

Ya que todos los estanques registraron la misma concentración cada semana, no es necesario realizar la prueba de T para muestras apareadas.

4.9.1. Discusión de Resultados para la Salinidad en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Estos resultados difieren de los observados por Aragón – Noriega *et al.* (2000), puesto que la media de salinidad registrada por este autor es de 45.42 mg/l, Mientras que para Lara – Espinoza *et al* (2015), la concentración de salinidad se registró entre el parámetro de 39.90 ±0.88%, valores muy superiores a lo registrado por esta investigación que oscilan en el rango de 5 a 25 mg/l.

Según Limsuwan (2005), la concentración de salinidad mínima requerida es de 4%, para siembras menores de 60 lavas/m², coincidiendo con los datos de esta investigación ya que su menor concentración es de 5% y una densidad de siembra de 55 larvas /m². Al mismo tiempo la investigación también difiere de lo descubierto por Anaya (2005), ya el presente un promedio de la concentración de 28.30 ±0.4%, oscilando entre 28 a 35 mg/l, mientras que la investigación presento una oscilación entre 5 a 25 mg/l, dato inferior a lo observado por Anaya.

4.10. Parámetros Biológicos.

4.10.1. Comparación de la Clorofila a para T1- T4 y T2 – T3.

El cuadro 15, muestra que el resultado de la prueba de T es no significativo para los muestreos de compuerta de entrada y salida den ambos comparativos. (Cuadro-A66, 67, 68, 69).

Cuadro 15. Prueba de t de Student para el parámetro de Clorofila a para T1-T4 y T2-T3.

Clorofila <u>a</u> (mg/ metro cubico)			
T1 – T4	Entrada	P= 0.5151	E10= 14467.78
	Salida	P= 0.6938	E10= 6696.5
T2 – T3	Entrada	P= 0.3411	E12= 3112.11
	Salida	P= 0.6597	E12= 3471.50

Fuente: Laboratorio de Microbiología del MEGATEC- La Unión 2017.

4.10.2. Discusión de Resultados para la Clorofila a en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Los rangos de clorofila a para los tratamientos en estudio oscilaron con valor de 48.10 a 54,710 mg/m³ para T1; 36.72 a 5,270 mg/m³ para T2; 65 a 13,362 mg/m³ para T3 y de 107 a 7,662 mg/m³ para T4, estos valores son inferiores a lo presentado por Hernández (2016) ya que los promedios de sus tratamientos oscilan en el rango de 57000 a 14,7800 mg/m³, mientras que Hernández (2016) cita a Hari *et al* (2004), y Martínez- Córdova *et al* (1998), los cuales

observaron un promedio de 18,900 mg/m³ valor que superior a lo presentado por los tratamientos 2, 3, 4 en los muestreos de entrada y salida, mientras que el T1 para el muestreo de entrada registra un valor similar con 14,467.78 mg/m³. Se puede atribuir a la diferencia entre los estanques a las concentraciones de nitratos, nitritos y fosforo que oscilaron de a lo largo de la investigación, aunque estas no sean de significancia estadística, también la diferencia que presenta el T1 puede atribuirse a que este posee un área aproximada al doble que los demás estanques en estudio.

4.11. Análisis de Fitoplancton

4.11.1. Conteo de fitoplancton primer y segundo muestreo.

Según la Figura 9 se puede distinguir con claridad que según los datos del primer muestreo todos los estanques tuvieron una dominancia en cuanto a la composición florística del taxón diatomeas: 97% para el T1 y T2, y del 100% para el T3 Y T4. La situación cambió significativamente con los datos encontrados en el segundo muestreo: las diatomeas dejaron de ser el taxón dominante y fueron relegadas al tercer lugar con 22.21% en el T1 y T2, y el 18.53% en el T3 y T4. Se presentó dominancia del taxón de clorofitas en primer lugar y de cianofitas en segundo lugar, siendo el 63.82% y 13.95% respectivamente para el T1 y T2. Siempre teniendo en cuenta los valores del segundo muestreo, en el T3 y T4 existió una con dominancia con los taxones de clorofitas y cianofitas, el 40.83% y el 40.60% respectivamente.

Puede tener especial mención, el hecho que ya en los valores del segundo muestreo se encontró presencia de dinoflagelados, aunque no representados de manera significativa: 0.005% para el T1 y T2 y 0.04% en el T3 y T4. Según Clifford (1994), citado por Martínez Córdova *et al.* (2008), el número máximo de células de dinoflagelados aceptables es de 500 células/ml. Las cantidades encontradas en el estudio están muy por debajo de la cifra referida. (Cuadro-A81, 82).

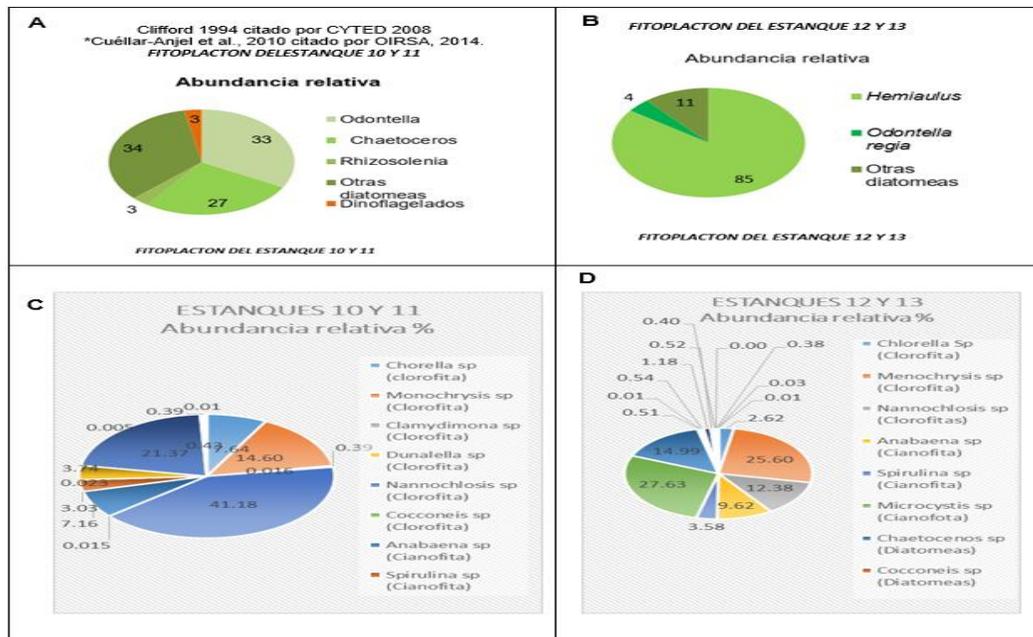


Figura 9. Abundancia relativa del fitoplancton presente en los estanques control (10 y 11) y con tratamiento (12 y 13) encontrada en dos muestreos: el primero hecho en época seca (24/04/2017) y el segundo muestreo en época lluviosa (17/07/2017). Granja Las Ánimas.

El cambio en la composición florística del fitoplancton registrado entre el primer muestreo (época seca) y el segundo muestreo (época lluviosa) puede ser explicado en función de la recepción de agua del sector adyacente a la granja y el régimen de lluvia. Diversos autores (CESASIN, 2004, Boyd 2009) han determinado que un descenso en la salinidad del agua hasta la aproximación a tener aguas dulces favorece el crecimiento de diatomeas y clorofilas; y los mismos autores refieren que un aumento de la salinidad en los estanques puede favorecer al florecimiento de diatomeas y otros taxones propios de aguas salobres y oceánicas.

El agua que entró al sistema de la granja, obtenida con muestras recolectadas en la compuerta de entrada según la fig. 10, el mes de junio tuvo un incremento significativo de precipitación de lluvia pasando de 108.8 a 243.8 mm entre el mes de mayo a junio respectivamente. Coincidentemente, en éste mismo mes de junio se registró los valores mucho más altos de clorofila a encontrados en los 4 estanques, indistintamente. Puede observarse (Anexo 106 al 109) que en la medida que se incrementó la lluvia, la salinidad tuvo una caída abrupta, pasando de 20 ppt (fecha 12/04/2017) a 8 ppt (fecha 28/07/2017).

El descenso del aporte de agua dulce que entra a los estanques y el favorecimiento de aguas con mayor contenido de sal hace que no sean las cianofitas el taxón dominante en los estanques de la granja Las Ánimas. El cambio de época tiene incidencia directa en la

composición del fitoplancton de los estanques de la granja Las Ánimas pues durante los meses con lluvia que comprendió el estudio, el taxón de las cianofitas se volvió co-dominante y se vio reflejado en la prevalencia encontrada en los tractos intestinales de los camarones cultivados analizados. El aporte de agua dulce que ingresa al ecosistema donde se ubica la granja altera la composición florística en favor de cianofitas y clorofitas. La signología alterada de los ciegos hepáticos puede tener relación en la presencia alta de cianofitas y de gregarinas durante los meses con precipitación lluviosa.

Los datos registrados por la investigación comparados con los obtenidos por Quiroz-Castelán (s.f.), muestran una semejanza, ya que en los resultados obtenidos por Quiroz las algas Chlorophytes oscilan en el rango de 55.8 a 86.5% de abundancia del fitoplancton en su investigación lo que guarda concordancia con lo registrado por la investigación, ya que los estanques 11 y 13 presentan un porcentaje de 84.74% y de 67.39% respectivamente, mientras que los estanques 10 y 12 registran menor porcentaje a lo presentado por Quiroz con 34.85% y 23.96% respectivamente, mientras que para las cyanophytes Quiroz-Castelán mostro una oscilación de 10.1 a 20.5%, contra una oscilación de la investigación en el rango de 9.35 a 58.29%, observando que el estanque 10 registro el menor porcentaje con 9.35% y la mayor el porcentaje lo registro el estanque 12 con 58.29%. (Cuadro-A83, 84, 85, 86).

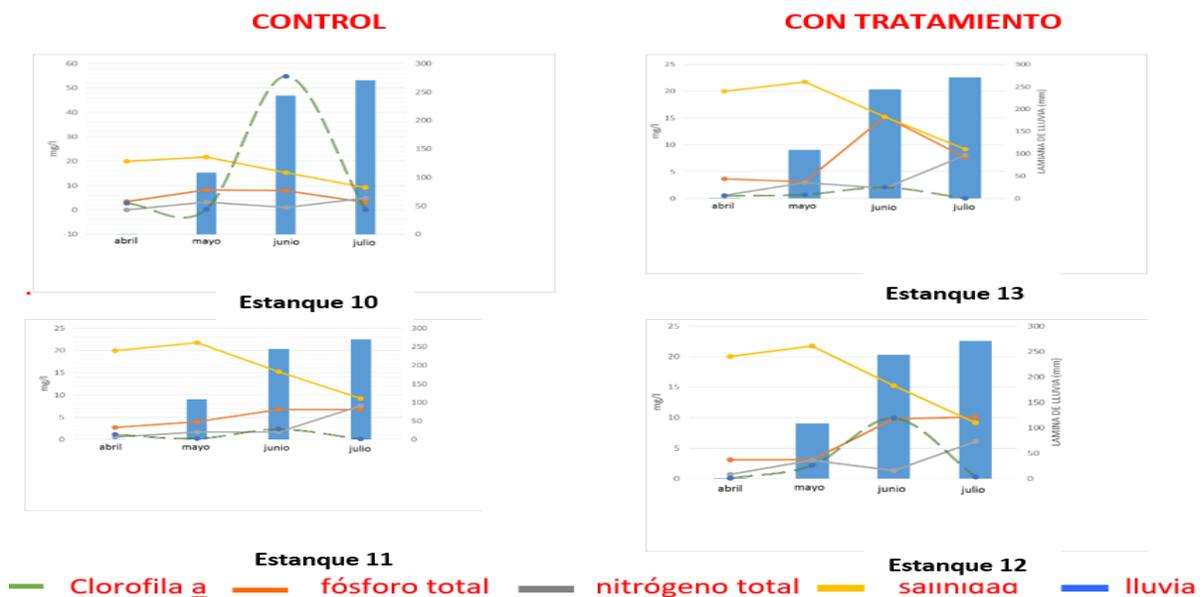


Figura 10. Precipitación promedio mensual de lluvia y concentración de clorofila a y parámetros químicos del agua en las compuertas de entrada de los estanques control (10 y 11) y con tratamiento (12 y 13), durante el período abril a julio de 2017; granja Las Ánimas.

4.11.2. Discusión de Resultados para el parámetro de conteo de Fitoplancton en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Por otra parte Chow (2000), registró que la composición de fitoplancton en su estudio donde los grupos de algas se comportaron de la siguiente manera: Bacillariophytes (Diatomeas) 51%, Chlorophytes 16%, Dinophytes 3%, Cyanophytes 30%. Al comparar estos registros a los de la investigación se observa que solo el T1 guarda concordancia con lo mencionado por Chow para las Bacillariophytes, puesto que este estanque registra 55.8%, mientras que los T2, T3 y T4 registran para las Bacillariophytes porcentajes de 0.35, 17.75 y 19.73% respectivamente; lo registrado por Chow para Chlorophytes es discrepante para la investigación, ya que, todos los estanques presentan porcentajes más altos con valores de 34.85% para el T1; 84.74% para el T2; 23.96% para el T3 y 67.39% para el T4; por otra parte las cyanophytes según lo observado por Chow son el segundo grupo más abundante, al igual que en el T1 y T4 con valores de 14.89% y 12.77% respectivamente, para el T3 es la alga más abundante del fitoplancton con 58.29% y para el T1 es la tercera con 9.35%; mientras que las Dinophytes para Chow registran el 3% de la composición del fitoplancton valor altamente superior a lo registrado por la investigación, ya que, el T1 registra 0%, en el T2 es el 0.01%, en el T3 es el 0% y el T4 es el 0.11%, siendo esta la concentración más alta registrada por los tratamientos.

Mientras que Chow registra concentraciones de células por mililitro muy superiores a lo registrado por la investigación, puesto que sus registros son de 9,348 cel/ml para las Bacillariophytes, 9,703 cel/ml para las Chlorophytes, 472, 532 cel/ml para las cyanophytes y 54.29 cel/ml para las Dinophytes conteo general para su estudio; mientras que la investigación registra para las Bacillariophytes valores de 1,316 cel/ml para el T1, 8 cel/ml para el T2, 2,220 cel/ml para el T3 y 1,512 cel/ml para el T4. Mientras que la Chlorophytes registran 821 cel/ml para el T1; 1,831 cel/ml para el T2; 2998 cel/ml para el T3 y 4,907 cel/ml para el T4. Las cyanophytes registran 220 cel/ml para el T1; 322 cel/ml para el T2; 7,923 cel/ml para el T3 y 930 cel/ml para el T4. Por otra parte las Dinophytes registran en los T2 y T4 un valor de 0.2 cel/ml y 8 cel/ml respectivamente. De la misma manera al comparar los datos observados por Ramírez (2004), en cuanto al comportamiento de la concentración por cel/ml, existe una alta diferencia a lo planteado por la investigación, ya que Ramírez registro valores de 43,106 cel/ml para las diatomeas; 4,733 cel/ml para las Chlorophytes; 147,550 cel/ml para las cyanophytes y 8,556 para las Dinophytes. Denotando para esto que la mayor abundancia en sus registros es para las cyanophytes. (Cuadro-A87, 88).

4.12. Análisis en Fresco y su Bacteriología para los tratamientos.

Los resultados de los cuadros 16, muestran el estado de salud de los camarones durante la fase de campo realizando un disección, para esto se escogió una muestra de 10 camarones por cada estanque. Estos muestreo se realizaron bajo los criterios propuestos por Morales-Covarrubias y Lightner mediante cuadros de interpretación (Cuadros-A3, 7, 8, 9, 10), los números de cero a cuatro representan el grado de afectación que presentan los camarones, teniendo cero como el menor valor que no representa ningún riesgo, mientras que de uno a dos es una afectación leve, tres ya representa una moderada afectación, la cual provoca problemas de salud y el cuatro representa una afectación grave lo cual puede llegar hacer mortal para los individuos además un día anterior a la fecha del primer muestreo todos los estanques del ensayo gozaban de un período de retiro de 15 días (del 11 al 24 de mayo del 2017) después de un tratamiento con el antibiótico Oxitetraciclina de la marca Avimex® cuyo nombre comercial es Oxiblend y que fue aplicado por un período de diez días (del 1 al 10 de mayo/2017) pues previamente al tratamiento se detectó la aparición de camarones muertos en todos los estanques del ensayo y fueron encontrados muertos entre 120 a 500 camarones por día. No se observó la presencia de camarones muertos en ninguno de los estanques seleccionados para el ensayo al momento de inicio del experimento con las bacterias ácido lácticas (iniciado el 25 de mayo/2017) ni durante el lapso del primer muestreo, el cual fue hecho 13 días después (el 7 de junio/2017). Morales –Covarrubias (2013), sugiere acerca de la necesidad de aplicar un tratamiento para evitar pérdidas de población si no se atiende a tiempo. (Cuadro- A5). La aplicación del fármaco antes mencionado es posible que haya surtido algún efecto en detener los episodios de mortalidad de modo que al momento del primer muestreo, si bien es cierto que se encontraron camarones severamente afectados, con morbilidad, no hubo pérdidas.

4.12.1. Tratamiento 1 (T1). Según grado de severidad.

El cuadro 16 se muestra el número de camarones que sobrevivieron el transporte hacia el laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión, fue de siete camarones para el primer muestreo, los cuales oscilaban entre 7 a 14 gramos de peso, ya para el segundo muestreo los camarones que sobrevivieron fueron nueve oscilando entre 16 a 22 gramos. Se observa que en relación al primer muestreo en este tratamiento el estado de salud mejora considerablemente para el segundo denotando que el probiotico comercial crea un ambiente propicio para los individuos en cuanto al combate de las distintas afectaciones.

Cuadro 16. Análisis en fresco según el grado de severidad para T1 de los dos muestreos.

T1 primer muestreo								T1 segundo muestreo								
Características Internas	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9
peso del camarón (g)	13.1	8.9	7.7	9	8.8	10.1	10.7	18.3	19.6	18	20.2	17.7	16.7	19.8	21.1	19.5
HEPATOPANCREAS (HP)																
Deformación de los tubulos (tubulos/campo), incluye la sumatoria de deformes, melanizados y necrosados.	1	1	2	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3
INTESTINO																
Numero de gregarinas (lamelas/intestino)	1	4	0	4	4	3	2	4	4	1	1	1	0	4	2	4
Presencia de Nematodos (N°./campo)	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Presencia de cianofitas (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Presencia de microsporidios(N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRANQUIAS																
Presencia de necrosis en las branquias (organismos/campo)	1	1	1	1	1	0	1	1	3	0	0	1	1	1	0	0
Presencia de nodulos hemociticos en las branquias (nódulos/campo)	3	4	3	0	0	3	3	0	1	2	0	1	1	1	1	1
Presencia de protozoarios en las branquias (organismos/campo)	3	1	2	1	3	1	3	0	2	1	1	0	0	1	1	1
Presencia de bacterias filamentosas en las branquias (filamentos/campo)	2	4	4	4	0	4	3	0	0	0	2	0	2	1	4	1

4.12.2. Tratamiento 2 (T2). Según grado de Seguridad.

El Cuadro 17, se muestra la que para el primer muestreo solo seis camarones sobrevivieron al traslado hacia el Laboratorio de Microbiología del MEGATEC- La Unión, mientras que en el segundo muestreo ocho de los 10 camarones seleccionados sobrevivieron al traslado, el cuadro muestra que el estado de salud mejora considerablemente a medida se realizaban las aplicaciones del probiotico comercial. Los camarones para el primer muestreo oscilaban entre 8 a 10.5 gramos de peso y para el segundo el rango de peso oscilaba entre 17 a 20 gramos.

Cuadro 17. Análisis en fresco según el grado de severidad para T2 de los dos muestreos.

T2 primer muestreo							T2 segundo muestreo							
Características Internas	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8
peso del camarón (g)	10.4	10.4	7.2	9.1	8.1	10	19.1	16.8	18	20.4	17.8	17.3	19.4	19.9
HEPATOPANCREAS (HP)														
Deformación de los tubulos (tubulos/campo)	1	3	2	2	1	0	4	4	3	3	0	4	4	4
INTESTINO														
Numero de gregarinas (organismos/intestino)	1	4	4	0	4	1	1	3	2	0	2	2	3	2
Presencia de Nematodos (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de cianofitas (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de microsporidios(N°./campo).	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRANQUIAS														
Presencia de necrosis en las branquias (lamelas/campo)	1	4	2	4	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de nodulos hemociticos en las branquias (nódulos/campo)	3	4	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
Presencia de protozoarios en las branquias (organismos/campo)	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
Presencia de bacterias filamentosas en las branquias (filamentos/campo)	1	4	0	3	3	4	0	1	1	1	0	3	1	2

4.12.3. Tratamiento 3 (T3). Según el Grado de Severidad.

El cuadro 18 se muestra el número de camarones que sobrevivieron el transporte hacia el laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión, fue de 10 camarones tanto para el primer muestreo como para el segundo muestreo, los cuales oscilaban entre 7 a 11 gramos y 17 a 23 gramos, respectivamente. Se observa que en relación al primer muestreo en este tratamiento el estado de salud mejora considerablemente para el segundo denotando que la bacteria *Lactobacillus paracasei* crea un ambiente propicio para los individuos en cuanto al combate de las distintas afectaciones.

Cuadro 18. Análisis en fresco según el grado de severidad para T3 de los dos muestreos.

Características Internas	T3 primer muestreo										T3 segundo muestreo									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
peso del camarón (g)	7.8	8.4	10.9	8.4	8.5	9.2	9.1	9.7	8.5	8.8	20.5	17.4	21.1	18.2	22.9	19.4	22.5	22.4	19.1	17
HEPATOPANCREAS (HP)																				
Deformación de los tubulos (tubulos/campo)	3	1	2	2	4	2	3	4	2	2	1	3	1	1	3	1	2	0	1	4
INTESTINO																				
Numero de gregarinas (organismos/intestino)	1	4	2	4	4	4	4	4	4	0	1	0	1	2	3	1	3	2	2	4
Presencia de Nematodos (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de cianofitas (N°./campo)	0	3	3	4	0	0	0	0	0	0	4	3	3	4	0	0	0	0	0	0
Presencia de microsporidios(N°./campo).	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRANQUIAS																				
Presencia de necrosis en las branquias (lamelas/campo)	4	1	1	4	4	1	4	1	1	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de nodulos hemocíticos en las branquias (nódulos/campo)	1	4	4	3	1	2	2	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
Presencia de protozoarios en las branquias (organismos/campo)	3	0	1	4	3	0	3	1	3	3	1	0	1	1	1	1	0	0	3	1
Presencia de bacterias filamentosas en las branquias (filamentos/campo)	0	1	0	2	0	0	0	4	4	4	4	0	0	4	1	1	4	4	0	2

4.12.4. Tratamiento 4 (T4). Según el Grado de Severidad.

El cuadro 19 se muestra el número de camarones que sobrevivieron el transporte hacia el laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión, fue de 10 camarones para el primer muestreo, los cuales oscilaban entre 10 a 13 gramos y fue de nueve camarones para el segundo muestreo, los cuales oscilaban entre 15 a 20 gramos. Se observa que en relación al primer muestreo en este tratamiento el estado de salud mejora considerablemente para el segundo denotando que la bacteria *Lactococcus lactis* crea un ambiente propicio para los individuos en cuanto al combate de las distintas afectaciones.

Cuadro 19. Análisis en fresco según el grado de severidad para T4 de los dos muestreos.

T4 primer muestreo											T4 segundo Muestreo								
Características Internas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9
peso del camaron (g)	10.2	10.9	11.4	10.5	13	9.3	11	12	13	9.8	19.5	17.4	16.6	15.7	18.6	16.9	15	17.5	17.2
HEPATOPANCREAS (HP)																			
Deformacion de los tubulos (tubulos/campo)	1	4	2	2	2	2	2	1	2	2	4	3	3	2	1	0	1	1	0
INTESTINO																			
Numero de gregarinas (organismos/intestino)	4	3	1	1	4	4	3	1	4	2	4	2	3	1	3	0	2	1	1
Presencia de Nematodos (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de cianofitas (N°./campo)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Presencia de microsporidios(N°./campo).	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BRANQUIAS																			
Presencia de necrosis en las branquias (lamelas/campo)	2	4	3	3	3	4	4	2	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia de nodulos hemociticos en las branquias (nódulos/campo)	0	4	3	1	1	1	3	4	4	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Presencia de protozoarios en las branquias (organismos/campo)	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Presencia de bacterias filamentosas en las branquias (filamentos/campo)	0	4	3	2	0	0	4	0	0	0	4	1	0	0	0	4	0	4	0

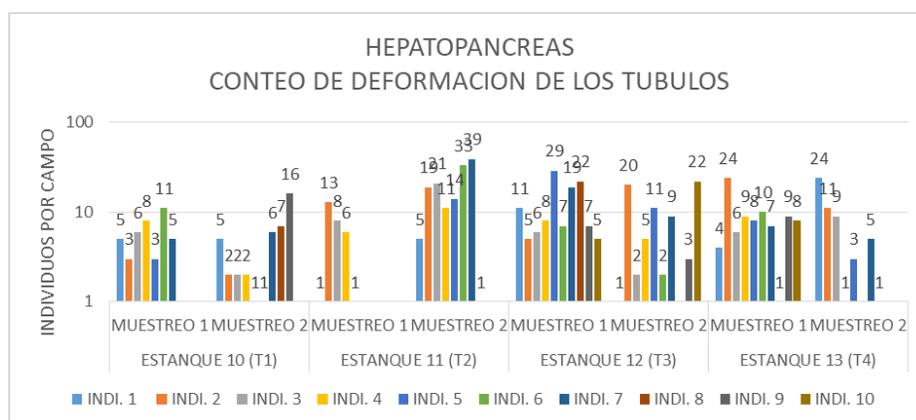


Figura 11. Resultados del análisis en fresco hecho en 2 estanques control (10 y 11) y en 2 estanques con tratamiento de bacterias ácido lácticas (12 y 13) en dos muestreos (muestreo 1 hecho el 7/06/17 y el muestreo 2 el 20/07/17) acerca del número de túbulos hepáticos dañados en camarón de cultivo de la granja Las Ánimas, incluye la suma de casos de melanización, necrosis y deformación tubular.

En cuanto al daño tubular hepático, la figura 11 en el primer muestreo se exponen resultados en los cuales, para los T1 y T2, menor frecuencia numérica y por consiguiente se puede deducir una menor signología favorable a menor posibilidad de Vibriosis en las poblaciones de ambos; la situación para el mismo período fue diferente en los T3 y T4, donde se disponía a iniciar un tratamiento con bacterias ácido-lácticas, pues la frecuencia del daño tubular fue mucho mayor y un cuadro clínico para el diagnóstico de Vibriosis era más representativo. (Cuadro-A89).

Siempre al analizar la figura 11, para el segundo muestreo, cuando ya se disponía de aproximadamente 7 semanas de tratamiento con probióticos, los T3 y T4 mostraron una

tendencia reversible en cuanto a la frecuencia numérica del daño tubular con respecto a sus propios valores encontrados en el primer muestreo. No así en el T2, donde la tendencia se invirtió y la frecuencia numérica aumentó sustancialmente, situación parecida ocurrió en el T1, pero con valores menos significativos, donde el daño tubular hepático también aumentó.

4.12.5. Discusión de Resultados para el conteo de deformación tubular en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Espinosa y Bermúdez (2012), registraron para daño en túbulos en el tratamiento control el 5% de los individuos con grado de severidad de 0; 17% de los individuos con grado de severidad de uno; 56% de los individuos con grado de severidad de dos y el 22% de individuos con grado de severidad de tres; mientras que el tratamiento registro 69% con grado de severidad de 0; 28% de los individuos con grado de severidad de uno y el 3% de los individuos con grado de severidad de dos. Contrastante con los registros de la investigación, ya que en general los tratamientos control registran un 15% de individuos con grado de severidad de 0; mientras que los tratamientos con bacterias ácido lácticas registran un promedio de 25% de individuos con el mismo grado de severidad; por otra parte los el 50% de los individuos registran una oscilación de los grados de severidad de 1 a tres, para los tratamientos control y del 70% de individuos con el mismo rango de grados de severidad para las bacterias ácido lácticas.

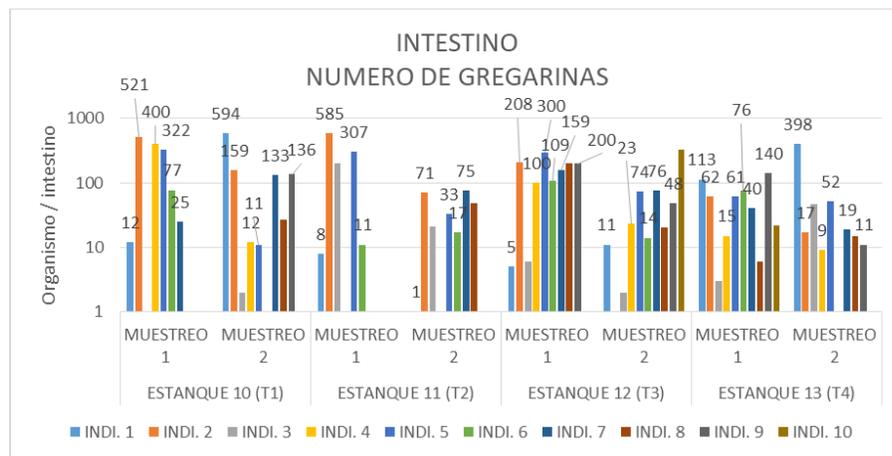


Figura 12. Número de gregarinas, incluyendo la suma de organismos en estado de esporozoito, gametocito y sicigia, presentes en el intestino medio y posterior del camarón de cultivo de 4 estanques (control 10 y 11; tratamiento el 12 y 13) de la granja Las Ánimas encontrados en dos muestreos.

Cuando se analiza la tendencia acerca de la gregariniasis en los camarones de cultivo, en general, según puede apreciarse en la figura 12, la tendencia de la frecuencia numérica encontrada tendió a la baja para los cuatro estanques según lo diagnosticado en el segundo muestreo; pero independientemente de la tendencia, los T3 y T4, presentaron menor carga

parasítica. El efecto de los fármacos aplicados podría ser la explicación de todo lo descrito. (Cuadro-A90).

4.12.6. Discusión de Resultados para el número de gregarinas en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Los registros de Espinosa y Bermúdez (2012), para el conteo de gregarinas en intestino para el tratamiento control el 91% de los individuos con un grado de severidad de 0; un 3% de individuos con grado de severidad de uno, dos y tres; mientras que su tratamiento registro un 95% de los individuos con grado de severidad de 0 y el 5% de estos con un grado de severidad de uno; mientras que los registros de la investigación para los tratamientos control un 11.75% de los individuos se encuentran con un grado de severidad de 0; un 22.75% de los individuos con un grado de severidad de uno; un 30.5% de los individuos con un grado de severidad de 2; 12.5% de los individuos con un grado de severidad de tres y un 22.5% de los individuos con un grado de severidad cuatro; mientras que los estanques con bacterias ácido lácticas registran un 10.5% de los individuos con grado de severidad de 0; 31.5% de los individuos con un grado de severidad de uno; un 26% de individuos con grado de severidad de dos; un 21% de los individuos con grado de severidad de tres y un 11% de los individuos con un grado de severidad de cuatro.



Figura 13. Cuantificación de nematodos intestinales encontrados en camarones de cultivo tomados de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento el 12 y 13) hecho el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de los mismos.

Se observa en la figura 13 que existe diferencia entre los resultados del primer muestreo con respecto al segundo en cuanto a la presencia de nematodos en el tracto intestinal de los camarones: el T1 mostró la mayor cantidad de carga parasitaria al inicio con un 42% de prevalencia, un indicador muy alto para una condición de cultivo; de igual manera, el T3 tuvo

alguna incidencia de nematodos durante el primer muestreo, baja, pues solo tuvo un 10% de prevalencia. Las condiciones cambiaron en el diagnóstico del segundo muestreo: no hubo ninguna incidencia de nematodos en la totalidad de los organismos analizados de los cuatros tratamientos; lo que podría reflejar es la eficacia de los tratamientos hechos con la monensina sódica al 20%. (Cuadro-A91).

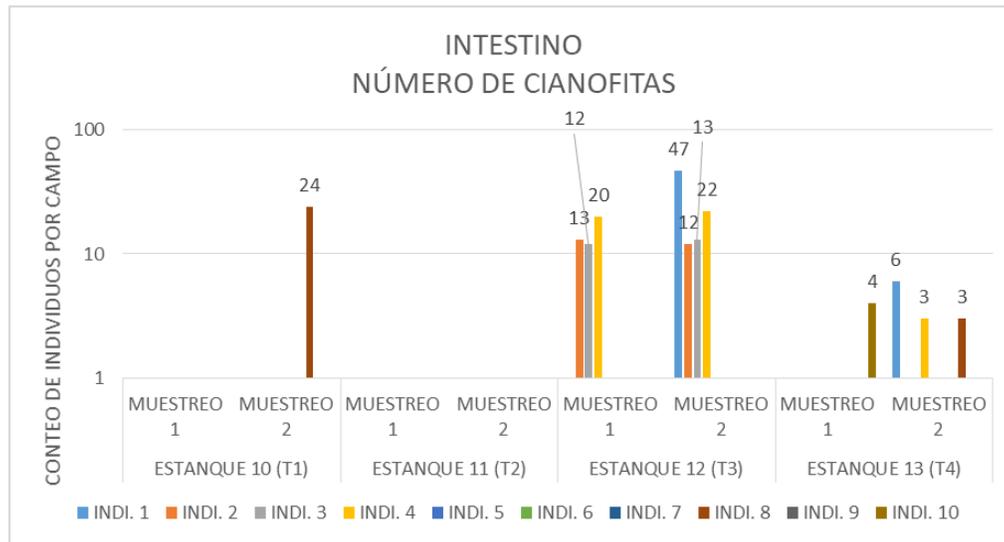


Figura 14. Cuantificación de cianofitas encontrados en camarones de cultivo tomados de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento el 12 y 13) hecho el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de las mismas

La presencia de cianofitas encontradas en el tracto intestinal de los camarones analizados en el primer muestreo (fig. 14) es casi insignificante para cada uno de los tratamientos, tanto para los T1 Y T2 así como en uno de los que se hizo tratamiento con probióticos (el T4 solamente con el 10% de prevalencia); la excepción para éste período fue que el T3 tuvo un 30% de prevalencia en los camarones. (Cuadro-A92).

Cuando se analiza la signología que resultó del primer análisis en fresco (fig. 14) es evidente que la mayor parte de los camarones de todos los estanques, sin excepción, presentaron ciego o bolsa intestinal inflamada y la razón de esto pudo deberse a dos causas: 1) alta carga parasitaria ya sea por gregarinas y presencia nemátodos; y, 2) presencia de cianofitas sin digerir en el tracto intestinal. Teniendo en cuenta lo anterior, esta signología alterada de los camarones analizados puede estar relacionada tanto con la presencia alta de gregarinas. Si se toma en cuenta la Tabla-A93 los T1, T2, T3 Y T4 tuvieron una prevalencia del 57%, 66%, 100% y 90% respectivamente de ciegos o bolsas intestinales inflamadas.

Los datos del segundo análisis en fresco (fig.14) arrojaron los siguientes resultados: 1) aumentó la frecuencia numérica de manera significativa en el T3, con tratamiento, en menor cuantía en el otro estanque con T4 y, existió solamente un registro de camarón (el No. 8) en el T1; 2) las prevalencias de ciegos inflamados para los T1, T2, T3 y T4 fueron de 22%, 75%, 50% y 100% respectivamente. Lo expuesto hace suponer que la causa de mayor alteración en cuanto a ciego o bolsa intestinal inflamada pudo estar relacionada con la carga parasítica de gregarinas encontradas y esto cobra mayor sustento cuando se analiza la situación encontrada en el T2: retomando datos, en el primer muestreo, la signología alterada del ciego hepático fue del 66% y en el segundo muestreo fue del 75% y al relacionarlo con la presencia de cianofitas, en ambos muestreos fue de completa o total ausencia, no así la cantidad de gregarinas encontradas (fig.14). 3) La mayor incidencia de casos tal como lo reflejan los datos de los T3 y T4, puede estar relacionado con el cambio en la composición florística del fitoplancton que sucedió en el segundo período, donde la co-dominancia de cianofitas presentes en el agua fue mucho mayor y la causa última podría deberse al descenso de la salinidad como efecto del aumento de la precipitación de lluvia acaecida en éste período (fig.14).

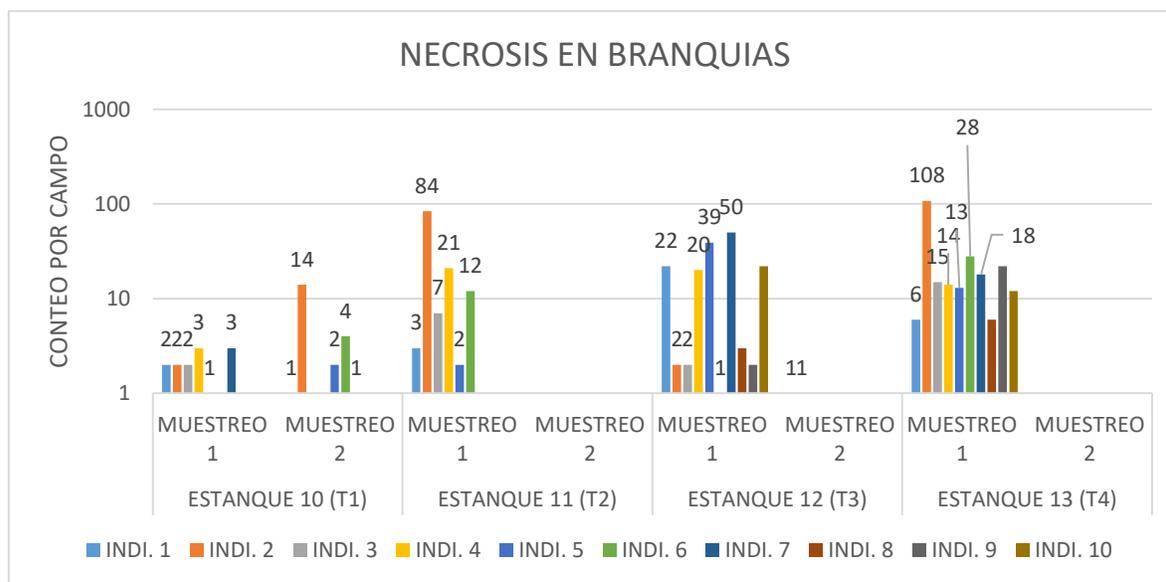


Figura 15. Cuantificación de lesiones con necrosis de tejido encontrado en lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control 10 y 11; con tratamiento el 12 y 13) hechos el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de las mismas. Lugar: granja Las Ánimas, estero de Jaltepeque, El Salvador.

Al analizar los datos del primer muestreo el diagnóstico clínico de lesiones en el tejido branquial fue de una incidencia bastante generalizada en todos los camarones de los cuatro tratamientos

pues la prevalencia fue del 85%, 100%, 100% Y 100% en los T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Sin embargo, solamente para el T1 el grado de severidad de la afectación tuvo un valor de 1; en el resto de los T2, T3 y T4 los valores fueron de 3-4, 4, 3-4, respectivamente. (Cuadro-A93).

En el segundo muestreo realizado bajó drásticamente el número de camarones afectados con daño por necrosis en los estanques pues en el T2 y T4 hubo ausencia completa de lesiones; en el T3 la prevalencia fue del 20% pero con un grado de daño de valor uno. La situación en el T1 la prevalencia se mantuvo más o menos estable pues pasó del 85% al 77% pero el grado de severidad del daño se agravó pues pasó de uno a tres en la mayoría de los casos.

En la Fig. 14 puede observarse una tendencia bastante marcada en la reducción del daño branquial por necrosis comparando los muestreos analizados y se destaca que en los estanques con tratamiento de bacterias benéficas la incidencia estuvo completamente ausente. Los fármacos suministrados, tales como el antibiótico enrofloxacin, pudo haber tenido algún efecto en la reposición o mejoramiento de la salud de los camarones de todos los estanques sometidos a estudio, pero esto perdura por un lapso bastante limitado y actúa positivamente durante los primeros días de tratamiento sumado a semana después de suspender la dosificación. Se debe tener en cuenta que una vez se inició el tratamiento con bacterias ácido lácticas, la aplicación de antibióticos o cualquier fármaco inhibitorio de carga bacteriana fue suspendida por completo tanto en los estanques control como en los que tenían tratamiento de probióticos.

En consecuencia de lo abordado en el párrafo anterior, podría inferirse que la calidad del agua mejoró significativamente, de modo tal que las bacterias oportunistas que causan daño tisular en la lamela branquial estuvieron reducidas a la mínima expresión.

El efecto que pudo ejercer las bacterias benéficas (Epicin PST y Epicin G2) empleadas en los T1 y T2 tuvo un efecto variable y ambiguo, en cuanto a la necrosis bacteriana.

La salud del órgano de la branquia se favorece por un tratamiento exógeno (en el agua) más que por algún tratamiento endógeno (dentro del organismo).

4.12.7. Discusión de Resultados para la necrosis en branquias en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Espinosa y Bermúdez (2012) reporta en sus dos tratamientos para las necrosis en branquias un 97% de los individuos muestreados del tratamiento control con un grado de severidad de 0; y un 100% de los individuos con grado de severidad 0 para el estanque con tratamiento,

mientras que para Ectoparásitos en branquias reportan un 8% de individuos con grado de severidad 0; un 20% de individuos con grado de severidad de uno; un 53% de individuos con grado de severidad dos; un 11% de individuos con grado de severidad de tres y solo un 8% de los individuos con grado de severidad de cuatro para el tratamiento control, mientras que para el tratamiento reportan 11% de los individuos con grado de severidad de 0; 22% de los individuos con grado de severidad de uno; un 50% de los individuos con grado de severidad de dos; un 11% de los individuos con grado de severidad de tres y un 6% de los individuos con grado de severidad de cuatro; para bacterias filamentosas en branquias reportan para el tratamiento control 58% de individuos para un grado de severidad de 0; un 42% de individuos con grado de severidad de uno; mientras que para el tratamiento un 69% de individuos con grado de severidad de 0; un 28% de individuos con grado de severidad de uno y un 3% de individuos con grado de severidad de dos. Datos que contrastantes con la investigación ya que para la necrosis en branques los registros para los estanques se mantienen entre 0 y uno en grado de severidad, para los ectoparásitos aproximadamente el 85% de los datos totales se mantiene en el rango de 0 a uno en grado de severidad, el 10% con un grado de severidad de tres y solo el 5% con grado de severidad de cuatro. Para las bacterias filamentosas en branquias el 70% de los individuos registran un grado de severidad de entre 0 y dos, el 25% de los individuos registran un grado de severidad de tres y el 5% de individuos con grado de severidad de cuatro.

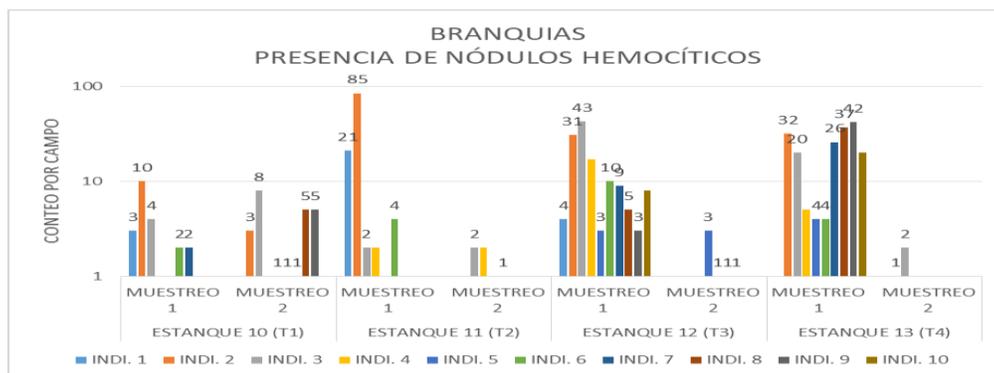


Figura 16. Cuantificación de nódulos hemocíticos encontrados en lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13) hechos el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de los mismos. Lugar: granja Las Ánimas, estero de Jaltepeque, El Salvador.

Los resultados observados acerca de la presencia de nódulos hemocíticos presentes en las lamelas branquiales, al igual que el fenómeno observado con respecto a las lesiones por necrosis muestran una similitud enorme que puede describirse así: 1) en el primer muestreo la mayoría de los camarones analizados estaban afectados y cuya prevalencia fue del 71%,

83%, 100% y 90% para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Así mismo el daño o grado de severidad presente fue de valores altos: en el T1 el 100% de los camarones afectados tuvo un daño entre 3 y 4, al igual que el resto de los T2, T3 y T4; y, 2) en el segundo muestreo todos los valores fueron inferiores, tanto en prevalencia de camarones afectados, así como en lo que se refiere al daño o grado de severidad pues éste último, en todos los casos tuvo un valor de uno. Solamente cabe destacar que en el T1 la prevalencia de animales afectados aumentó del 71% al 77% y en el otro T2 disminuyó sensiblemente al 20% de prevalencia y grado de severidad uno. Nuevamente, los estanques con tratamiento de bacterias ácido lácticas mostraron un cuadro clínico de mejor salud ya que las prevalencias bajaron de 100% a 40% en el T3 y de 90% a 22% en el T4. Las lesiones en las branquias que tienen que ver con la presencia de nódulos hemocíticos tuvieron una relación inversa cuando se aplicó el uso de bacterias ácido lácticas pues los nódulos hemocíticos disminuyeron a menos de la mitad o a la cuarta parte, además que el grado de afectación disminuyó de severidad cuatro a severidad uno en los T3 y T4. El efecto causado por bacterias aplicadas a los T1 y T2 tuvo un resultado variable. (Cuadro-A94).

Los nódulos hemocíticos son lesiones aisladas como producto de la acción del sistema inmunológico del camarón con el propósito de hacer un “cerco” del patógeno para que no pueda seguir afectando los tejidos circundantes y el buen estado inmunológico es determinante. Las bacterias ácido lácticas está bien documentado que contribuyen a mejorar la condición inmunitaria en los camarones.

Las razones pueden ser las mismas que las expuestas en el análisis de daño tisular por necrosis: hubo una mejoría en la calidad del agua y la acción de las bacterias oportunistas que están presentes en la materia orgánica se redujeron o fueron relegadas por un consorcio bacteriano presente en el segundo período.

4.12.8. Discusión de Resultados para la presencia de nódulos hemocíticos en las comparaciones T1 – T4 y T2 –T3.

Según lo reportado por Lara- Espinoza *et al* (2015), existe un alta diferencia entre los registros de la investigación, ya que ellos no reportan daños en los intestinos y las branques, más sin embargo si encontró daño en los túbulos del hepatopáncreas siendo estos valores inferiores a lo reportado por la investigación, observando solo un 22% con daño en túbulos.

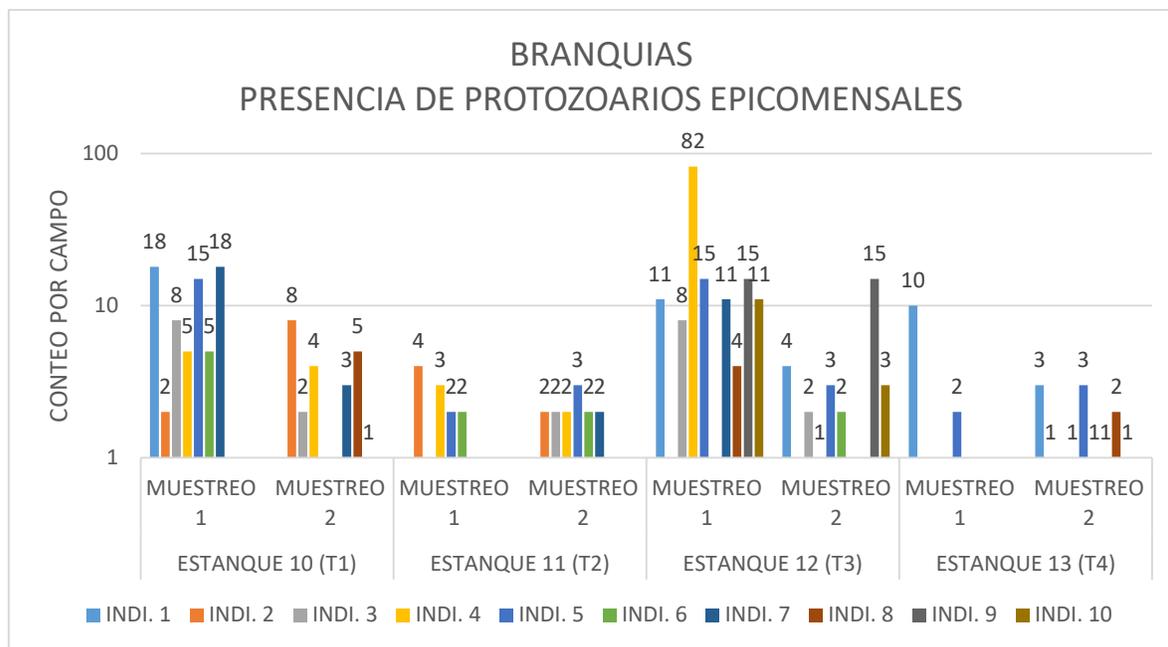


Figura 17. Cuantificación de protozoarios epicomensales colonizando lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13) hechos el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de los mismos. Lugar: granja Las Ánimas, estero de Jaltepeque, El Salvador.

Se cuantificaron (organismos/campo) los protozoarios presentes como epicomensales observados en las lamelas branquiales de los camarones sometidos al análisis en fresco. Para el primer muestreo se obtuvo prevalencias de animales afectados de 100%, 66%, 80% y 20% para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente; a excepción del T4, todos los valores antes descritos pueden considerarse como altos y se deduce entonces que la calidad del agua para ese período no fue buena; los grados de severidad establecidos fueron de 3 para el T1, de 1 para el T2, entre tres a cuatro para el T3 y entre 1-2 para T4. (Cuadro-A95).

En el segundo muestreo, la prevalencia de animales afectados fue del 66%, 75%, 70% y 80% para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente. El grado de afectación estimado es el siguiente: para el T1, el 100% de los animales dañados tuvo severidad de uno a dos; si puede observarse mejoría significativa en éste período para los estanques T2, T3 y T4 pues el 100% de los camarones afectados tuvieron un valor de severidad igual a uno.

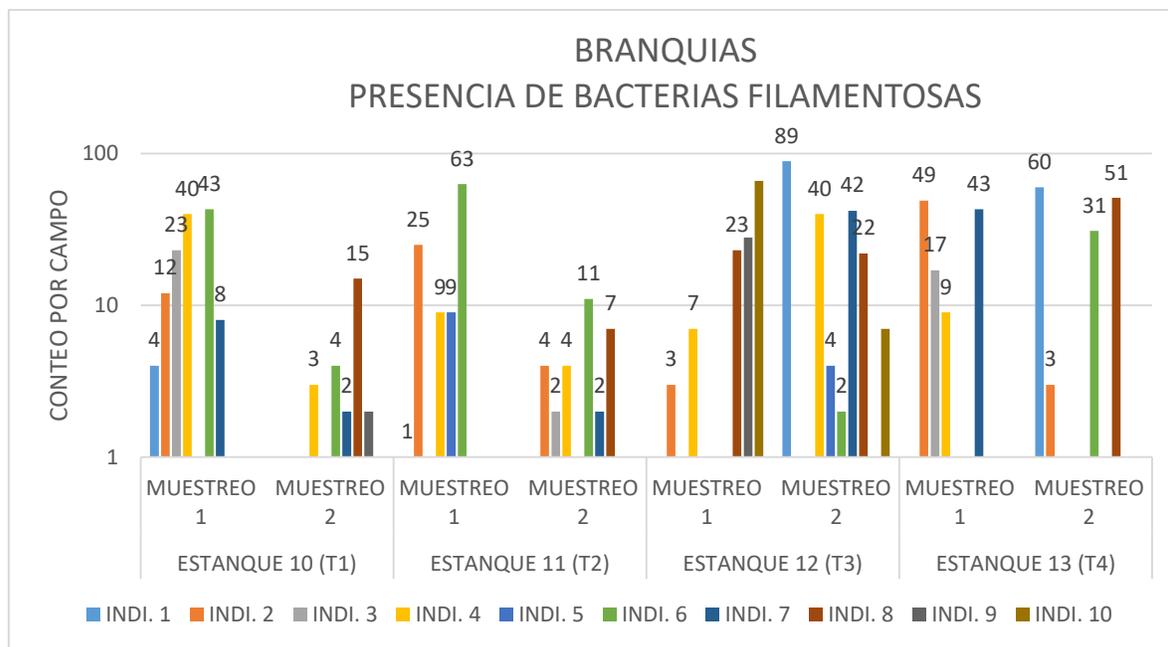


Figura 18. Bacterias filamentosas encontradas en las lamelas branquiales de camarón de cultivo extraídos de 4 estanques (control el 10 y el 11; con tratamiento 12 y 13) hechos el 07/06/17 (muestreo 1) y el 20/07/17 (muestreo 2); valores de cero significa ausencia total de los mismos. Lugar: granja Las Ánimas, estero de Jaltepeque, El Salvador.

Se cuantificaron (filamentos/campo) las bacterias filamentosas presentes colonizando la cámara branquial observadas en las muestras de los camarones sometidos al análisis en fresco. Para el primer muestreo se obtuvo prevalencias de animales afectados de 85%, 83%, 50% y 40% para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente; los grados de severidad establecidos fueron entre tres a cuatro para los T1, T2 y T4; y severidad cuatro para el T3. Todos los valores antes descritos pueden considerarse como altos y se deduce entonces que la calidad del agua para ese período no fue buena. (Cuadro-A96).

En el segundo muestreo, la prevalencia de animales afectados por bacterias filamentosas fue del 55%, 75%, 70% y 44% para los T1, T2, T3 y T4 respectivamente. El grado de afectación estimado es el siguiente: para los T1, T3 y T4 se tuvo daño con severidad cuatro; en el T2 daños con severidad tres.

Si puede observarse mejoría significativa en éste período para los estanques T2, T3 y T4 pues el 100% de los camarones afectados tuvieron un valor de severidad igual a uno. La mejoría que puede ser tomada en cuenta para el segundo período consistió en que hubo un descenso en el porcentaje de animales afectados analizados con grados de afectación severos o muy severos (daño tres a cuatro) pues al comparar los dos períodos, en el T1, descendió de tener un 83% de camarones afectados con daño tres a cuatro en un 20% de animales con daño cuatro; para el T2 el descenso fue del 80% (daño tres a cuatro) al 16% (daño 3); y en el T3,

con tratamiento, de un 60% (daño cuatro) a un 57% (daño cuatro). En el T4, la situación no tuvo un cambio esperado pues pasó de un registro de 75% (daño tres a cuatro) a un 75% (daño cuatro).

Se puede deducir que tanto los biorremediadores contenidos en el Epicin PST y Epicin G2, así como las bacterias ácido lácticas de los tratamientos si disminuyeron el grado de severidad o afectación de las branquias en todos los estanques; muy a pesar que si se tiene en cuenta que a medida que transcurre el cultivo y pasan los días, la cantidad de desperdicio y materia orgánica tiende a irse incrementando y por consiguiente toda esa materia orgánica está siendo degradada por las bacterias, tanto las que naturalmente tiene el estanque como las suministradas.

El incremento progresivo de bacterias heterotróficas encontrado en las muestras de agua así reflejan lo antes expuesto y por un escalonamiento en los niveles tróficos, la carga bacteriana hace que aumente la cantidad de protozoarios pues éstos últimos ingieren a las primeras.

4.13. Relación del estado de salud de las branquias versus el contenido de nitrógeno y fósforo presente en el agua.

Cuadro 20. Relación del estado de salud de las branquias versus el contenido de nitrógeno y fosforo presente en el agua.

Análisis en Fresco	Primer muestreo				Segundo muestreo			
	T1	T4	T2	T3	T1	T4	T2	T3
Branquias								
Protozoarios (Prevalencia %)	100	20	66	80	66	89	75	70
Severidad	3	2	1	4	2	1	1	1
Nódulos hemocíticos (Prevalencia %)	71	90	83	100	89	22	38	40
Severidad	4	4	4	4	1	1	1	1
Necrosis (Prevalencia %)	85	100	100	100	55	0	0	20
Severidad	1	4	4	4	3	0	0	1
Bacterias filamentosas (Prevalencia %)	85	40	83	50	55	44	75	70
Severidad	4	4	4	4	2	4	1	4
Bacterias Heterótrofas								
entrada	10 ³	10 ³	10 ²	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
salida	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
Nitrógeno Total								
entrada	1.07	1.91	1.73	1.30	4.9	8.1	7.6	6.1
salida	2.22	1.56	1.26	1.28	5.0	5.2	6.2	7.1
Relación N:P (16:1)	0.20	0.17	0.18	0.13	1.08	1.0	0.88	1.0
Fosforo Total								
entrada	7.97	15.33	6.75	9.81	3.07	7.67	6.75	10.12
salida	11.0	9.20	7.05	10.12	4.60	5.21	7.05	7.05

Fuente: Navarrete 2017.

Con los datos mostrados en la cuadro 20 se puede relacionar la infestación encontrada en las branquias causada por la presencia de bacterias filamentosas, presuntivamente *Leucothrix mucor*, y el contenido de nitrógeno y fósforo presente en el agua encontrado en el mismo período de tiempo en que se hizo los muestreos: existe alta concentración de nutrientes en el agua que entra así como en el agua que sale de todos los estanques sin distinción alguna. La mayor parte de los valores en de prevalencia de la presencia de bacterias filamentosas fue alto al igual que el grado de severidad de la afectación. La relación N: P es completamente favorable a la concentración de fósforo total encontrado y esto está muy por debajo de una relación óptima que muchos autores establecen (16:1). El aporte de fósforo total puede estar subsidiado por el suministro de alimento balanceado que se aplica a cada uno de los estanques a diario. El volumen de materia orgánica por consiguiente fue alto y de una manera indirecta así lo demuestra los valores del conteo de bacterias heterótrofas mesófitas presentes en el agua; la concentración de éstas mostró resultados similares tanto en el agua que entra como en el agua que sale, razón por la cual se deduce que el entorno de la granja Las Ánimas recibe descargas significativas de otros ramales de la cuenca donde se ubica. Las bacterias filamentosas fueron abundantes en un ambiente con alto contenido de fósforo total y materia orgánica generada por el alimento balanceado. Los datos del T4 merecen especial interés pues el tratamiento con *Lactococcus lactis*, si se analiza en contenido de fósforo, tuvo los valores más bajos comparado con el resto. El contenido de nitrógeno y fósforo fue alto y los valores de la concentración de cada uno indican alta concentración de materia orgánica presente en el agua, un ambiente propicio para la incidencia de bacterias filamentosas que se alojan en las branquias de los camarones.

4.13.1. Relación del Índice de Calidad del Agua (ICA) y el grado de infestación de protozoarios y bacterias filamentosas.

Cuadro 21. Relación del grado de severidad de infestación por protozoarios, el FCA, la cantidad de materia orgánica acumulada y el ICA en los cuatro estanques de la camaronera Las Animas.

TRAT	GRADO DE SEVERIDAD (protozoarios)		FCA		*M.O. acumulada (libras)		ICA
	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	
T1	2.0	0.8	0.96	1.28	1,100	1,925	24.33
T2	0.66	0.75	1.01	1.52	1,100	1,925	29.33
T3	2.1	0.9	0.95	1.20	1,100	1,100	28.72
T4	0.3	0.9	1.01	1.53	1,100	1,925	26.09

Fuente: Navarrete 2017.

En la cuadro 21 se muestra una comparación acerca de la relación que pudiese existir entre el grado de severidad de la infestación por protozoarios en los camarones de los cuatro estanques objeto de estudio; para esto es necesario tener en cuenta que existen otras relaciones complementarias que pueden reforzar el análisis y es el hecho que son muchos los autores que asocian la cantidad de materia orgánica que se puede acumular en un ciclo de cultivo en función del factor de conversión alimenticia (FCA) pues a medida que se emplea mayor cantidad de alimento para producir, para el caso, 2,200 libras de camarón, mayor es el puntaje asignado al FCA y por lo tanto, mayor es la cantidad de alimento que se genera como desperdicio (en conferencia Asian Shrimp Culture Council, 1993); y aún más, lo anterior también puede relacionarse con la calidad del agua pues cabe esperar que a mayor cantidad de desperdicio, el ICA tendrá un puntaje más bajo y a la inversa, a menor desperdicio mayor es el puntaje del ICA.

El grado de severidad por infestación de protozoarios tiene una relación directamente proporcional a los valores del FCA y de ICA pues la degradación de materia orgánica hace que aumente la carga bacteriana que actúa para tal propósito y por una relación trófica, ésta carga hace que aparezcan subsecuentemente los protozoarios. Siguiendo con el análisis de los datos del primer muestreo de la tabla 27 y 30, se puede observar con claridad que el grado de infestación por protozoarios en los T3 y T4 disminuyó en el segundo muestreo cuando cabría esperar que transcurridas 6 semanas de cultivo entre el primer y segundo muestreo, a mayor cantidad de desperdicio acumulado, el grado de severidad de la infestación debería ser mayor pero esto no ocurrió así sino que más bien se revirtió el proceso y todo lo que cabe deducir que no puede ser más que por la acción o efecto de los probióticos de bacterias ácido lácticas dosificadas en ambos estanques.

Cuadro 22.Relacion del grado de severidad de infestación por bacterias filamentosas, el FCA, la cantidad de materia orgánica acumulada y el ICA en los cuatro estanques de la camaronera Las Animas.

TRAT	GRADO DE SEVERIDAD (bacterias filamentosas)		FCA		*M.O. acumulada (libras)		ICA
	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	
T1	3.0	1.11	0.96	1.28	1,100	1,925	24.33
T2	2.5	1.13	1.01	1.52	1,100	1,925	29.33
T3	1.5	2.0	0.95	1.20	1,100	1,100	28.72
T4	1.3	1.4	1.01	1.53	1,100	1,925	26.09

Fuente: Navarrete 2017.

Igual que en el planteamiento hecho con respecto al grado de severidad por infestación de protozoarios, la incidencia de bacterias filamentosas tiene una relación directamente proporcional a los valores del FCA y de ICA pues la degradación de materia orgánica hace que aumente la carga bacteriana que actúa para tal propósito y por una relación trófica, ésta carga hace que aparezcan subsecuentemente los protozoarios. Siguiendo con el análisis de los datos del primer muestreo de la tabla 18 y 21, se puede observar con claridad que el grado de infestación por bacterias filamentosas, tanto en los T1 y T2 así como en uno de los tratamientos (T4) disminuyó en el segundo muestreo cuando cabría esperar que transcurridas 6 semanas de cultivo entre el primer y segundo muestreo, a mayor cantidad de desperdicio acumulado, el grado de severidad de la infestación debería ser mayor pero esto no ocurrió así sino que más bien se revirtió el proceso y todo lo que cabe deducir que no puede ser más que por la acción o efecto de los probióticos de bacterias ácido lácticas y también hay que considerar que los *Bacillus* spp. presente en el Epicin PST como en el G2 pueden ejercer algún efecto de biorremediación en función de mejorar la calidad del agua, pues los valores del ICA y de severidad de la infestación así lo indican.

La bacteria filamentosa puede verse favorecida incluso por el uso de aireadores por la siguiente razón: 1) es propia de ambientes donde los sistemas de acuicultura tienen agua corrediza o agitada, en la naturaleza su hábitat son las zonas inter mareales, 2) es favorecida por materia orgánica en suspensión y los aireadores precisamente al ser activados rompen la estratificación de la columna de agua y por lo tanto hay mezcla, 3) son bacterias aeróbicas estrictas y el ambiente de los estanques manejados con aireadores precisamente logran este medio propicio al inyectar aire al agua, 4) son favorecidas por la presencia alta de nitrógeno en forma de nitrato (NO_3) y el ambiente aeróbico que genera el uso de aireadores favorece el proceso de mineralización del nitrógeno que se inicia con la producción de urea, ésta pasa por convertirse en amonio y luego en nitritos y por último en nitratos.

L. mucor es catalogada como una bacteria heterotrófica que crece en aguas de baja calidad y ricas en materia orgánica con una alta concentración de nutrientes. El agua que entra y sale de todos los estanques objeto de estudio son ricos en nitrógeno y fósforo, sobre todo éste último, a pesar que diversos autores establecen que una relación óptima entre ambos elementos puede ser de 16:1, para nuestro caso, los datos obtenidos del agua de las compuertas de salida no excedieron de una relación C.N igual a 1.08 en el mejor de los casos. Lo anterior deduce que el contenido de fósforo total es muy alto y propicio para el desarrollo de la bacteria. Los niveles de nitrógeno fueron altos.

La frecuencia (seis veces al día) y la gran cantidad de alimento dado en un estanque favorece que siempre exista materia orgánica en suspensión aunado esto último por el uso de los aireadores y la carga microbiana heterotrófica no siempre será de una eficacia tal que haga el proceso de biodegradación 100% efectivo en un lapso de tiempo dado.

4.14. Bacteriología del análisis en Fresco.

4.14.1. Primer Muestreo Hemolinfa y Hepatopáncreas.

La carga microbiana de *Vibrios* presente en la hemolinfa de los camarones arroja una prevalencia de *Vibriosis* sistémica de la siguiente manera: T1 con 30% de los organismos afectados por la enfermedad, en el T4 fue del 10%. Con respecto al otro control la prevalencia de casos fue para el T2 de 20% y el T3 del 10%.

Cuando se analiza la carga microbiana de *Vibrios* presentes en el hepatopáncreas de los camarones del primer muestreo, el T1 tuvo un 50% de prevalencia de organismos afectados con un diagnóstico de *Vibriosis* y el T4 de igual manera tuvo un 50% de prevalencia de la enfermedad; ambos son porcentajes altos y eso hizo necesario un tratamiento con antibiótico aplicado por el personal de la granja. Siguiendo con el otro tratamiento, el T2 tuvo un 20% de prevalencia de camarones con *Vibriosis* y el T3 fue del 40%; éste último dato es particularmente importante pues se considera que es un valor alto. Ambos estanques también tuvieron tratamiento con antibiótico. (Cuadro-A97, 98, 99, 100).

Si bien es cierto que los *Vibrios* son bacterias que pueden comúnmente estar colonizando un órgano como es el hepatopáncreas, se asume que el aumento o predominancia de *Vibrios* que en el agar TCBS tienen fenotipo de colonias verdes puede generar la enfermedad de la *Vibriosis* y para esto Gil-Gómez (2006), y citado por Morales-Covarrubias (2010), establece rangos o límites con distintas categorías que indican el estado de salud del animal. Las dos especies que se reporta tienen cepas patógenas encontradas en el estudio fueron *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*.

4.14.2. Segundo muestreo Hemolinfa y Hepatopáncreas.

Los resultados del segundo muestreo la carga bacteriana de *Vibrios* presentes en la hemolinfa en el ensayo del T1 tuvo una prevalencia del 100% de los camarones muestreados con diagnóstico de *Vibriosis* sistémica y en contraste, el T4 fue de ausencia total de diagnóstico de *Vibriosis* sistémica pues ningún camarón presentó indicios de bacterias en la hemolinfa. En el

otro ensayo, siempre con hemolinfa, el T2 tuvo una prevalencia del 14% de organismos afectados con vibriosis sistémica y el T3 no presentó ningún caso con la enfermedad. El caso del T1 puede considerarse de una situación muy comprometida y delicada debido a que todos los organismos de la muestra resultaron estar afectados y estuvo presente tanto el *V. parahaemolyticus* como el *V. harveyi*, dos especies conocidas por poseer cepas patógenas.

Continuando con el análisis del segundo muestreo, la carga bacteriana de Vibrios presentes en el hepatopáncreas, para el T1 la prevalencia fue del 89% con diagnóstico de vibriosis y para el T4 fue de 20%. En el otro ensayo, el T2 la prevalencia de camarones con vibriosis fue del 88% y en el T3 el 20%. Puede resaltarse el hecho que ambos tratamientos (T3 y T4) sometidos a tratamiento con bacterias ácido lácticas el valor fue el mismo (20%), no así el caso de ambos tratamientos (T1 y T2), con valores parecidos (88% y 89% respectivamente). (Cuadro-A101, 102, 103, 104).

Como se ilustra en el cuadro 23 es notable cambio en el tratamiento de la vibriosis que pudo ejercer el hecho de aplicar bacterias ácido lácticas con respecto a los estanques que tuvieron tratamiento, y más aún las diferencias en los resultados obtenidos en ambos muestreos: existió una mejoría evidente en la mejoría del estado de salud de los camarones después de tener varias semanas de aplicado el tratamiento con probióticos. La tendencia experimentada en los estanques fue que la vibriosis continuó hacia el alza mientras que en estanques con bacterias ácido lácticas la tendencia fue a la baja transcurrido relativamente un corto tiempo sometido bajo el efecto de los probióticos, además en éstos últimos prácticamente desapareció por completo la vibriosis sistémica según el diagnóstico brindado por los datos de hemolinfa.

Cuadro 23. Diagnóstico bacteriológico de prevalencia de Vibriosis en camarones obtenidos en el primer y segundo muestreo, Camaronera Las Animas, El Salvador.

TRAT	Hemolinfa		Hepatopáncreas	
	Prevalencia de vibriosis sistémica (%)		Prevalencia de vibriosis (%)	
	Muestreo		Muestreo	
	primero	segundo	primero	segundo
T1	30	100	50	89
T4	10	0	50	33
T2	20	14	20	88
T3	10	0	40	20

4.14.3. Discusión de resultados del muestreo de Hemolinfa y Hepatopáncreas para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Los datos de la son discrepantes de lo encontrado por Rivera (2017), ya que, en su investigación encontró un promedio de 1×10^3 UFC/ml en hemolinfa, distribuidos en *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, entre otros y para hepatopáncreas registra una concentración media de 1×10^4 UFC/g de los Vibrios ya mencionados. Por otra parte los registros de NICOVITA (1997), al realizar muestreos en cultivos de hemolinfa y machacado de hepatopáncreas los conteos de bacterias de tipo Vibrios se encuentran en los rangos considerando normal, esto difiere de la investigación.

4.15. Resultados del análisis de antibiograma con prueba de Kirby-Bauer para bacterias del género *Vibrio* spp. aisladas de los camarones.

Los resultados del análisis de antibiograma se presentan en la tabla 40, obtenidas de la selección de bacterias del género *Vibrio* spp. que resultaron del crecimiento en agar TCBS descrito en los capítulos anteriores.

Cuadro 24.Antibiograma de bacterias del genero *Vibrio* spp. aisladas de camarones del T1, T2, T3 y T4 de la camaronera Las Animas. 15 de junio de 2017.

N° de muestra	Muestra	Bacteria	Antibiótico – halo de inhibición					
			* 0/129 10 µg (mm)	Cloranfenicol 10 µg (mm)	Oxitetraciclina 30 µg (mm)	Sulfametoxazole 25 µg (mm)	**Enrofloxacin 5 µg (mm)	***Florfenicol 30 µg (mm)
1	Tubo 1 Camarón estanque 10	<i>V.parahaemolyticus</i>	0 Resistente	20 sensible	11 Resistente	21 sensible	11 Resistente	22 sensible
2	Tubo 2 camarón estanque 11	<i>V.parahaemolyticus</i>	0 Resistente	19 sensible	7 Resistente	8 Resistente	6 Resistente	24 sensible
3	Camarón estanque 12	<i>V.alginolyticus</i>	8 Resistente	20 sensible	17 Intermedio	12 Intermedio	10 Resistente	0 Se desprendió
4	Tubo 2 camarón estanque 13	<i>V.parahaemolyticus</i>	0 Resistente	21 sensible	8 Resistente	18 sensible	7 Resistente	26 sensible
5	Tubo 1 camarón estanque 13	<i>V.parahaemolyticus</i>	0 Resistente	20 sensible	13 Resistente	20 sensible	10 Resistente	20 sensible

Fuente: Navarrete 2017.

Todos los Vibrios aislados de los camarones de los T1, T2, T3 y T4 fueron sensibles en un 100% de las muestras a los antibióticos Cloranfenicol y Florfenicol (con 10 µg y 30 µg de concentración respectivamente), demostrando ser los fármacos más efectivos si se busca una alternativa terapéutica de choque para controlar un brote de vibriosis. Le siguió un 60% de eficacia en las muestras analizadas el antibiótico Sulfametoxazole con Trimetoprim con 25 µg de concentración. Todas las bacterias fueron resistentes y alguna con valor intermedio (*V.*

alginoliticus, estanque 12) a los antibióticos Oxitetraciclina (30 µg) y Enrofloxacina (5 µg). Sin embargo, el Cloranfenicol no está autorizado para el uso acuícola y es más, está proscrito por los efectos colaterales que tiene en la salud humana; el Florfenicol está autorizado en muchos de los países con fuerte producción de camarón de cultivo. (Cuadro-A137).

4.15.1. Discusión de resultados del antibiograma para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Lo anterior demuestra que la oxitetraciclina no es una buena alternativa para el combate de la vibriosis en camarón de cultivo y esto coincide con el resultado obtenido por otros autores (Santiago *et al* 2009 y Nicovita 2011), aun cuando es un fármaco que goza de autorización para el empleo en acuicultura, pero sobre todo indicado para el tratamiento de la enfermedad de NHP (necrosis hepatopancreática) causada por riketsias (bacterias intracelulares) y otras formas de bacteriosis múltiple que pueda resultar de un diagnóstico patológico. La enrofloxacina es un antibiótico autorizado para el uso en la acuicultura y con reportes de ser muy efectiva en el tratamiento de vibriosis y otras enfermedades causadas por bacterias en animales acuáticos; sin embargo, con los resultados del presente estudio, se evidencia que éste antibiótico ya presenta problemas de resistencia microbiana posiblemente debido a su uso prolongado que ha tenido en la granja, ciclo tras ciclo de producción y durante algunos años consecutivos. Con respecto a la prueba con el agente *Vibrio* estático 0/129, con 10 µg de concentración, esta constituye una prueba bioquímica que se aprovecha y se ejecuta cuando se tiene la oportunidad de hacer antibiograma para distintos antibióticos de uso terapéutico; en ambos casos, tanto para el *V. alginolyticus* así como para el *V. parahaemolyticus*, el resultado fue “resistente” pues no hubo desarrollo de halo de inhibición. Estos resultados coinciden con los valores establecidos para las pruebas bioquímicas establecidas para la identificación de las bacterias del género *Vibrio* spp. según la OPS/OMS, 1991.

4.15.2. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio.

4.15.2.1. Primer muestreo en los T1-T2.

En el estudio realizado se tomó en consideración toda aquella posibilidad de encontrar en la flora intestinal de los camarones sometidos a estudio una representación del grupo de bacterias ácido lácticas y de esa manera poder comparar si éstas pudiesen estar presentes

de manera natural y fortuita aún en los camarones de los T1 y T2 a los cuales no se les sometió a tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 57 y fue notorio haber encontrado muy pocos camarones de los cuales se pudo aislar alguna colonia de bacterias ácido lácticas: en el T1 solamente en el 20% de los camarones muestreados y en el T2 fue el 10%.

La concentración de bacterias ácido lácticas en ambos estanques, expresada como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por cada 1.0 gramo de intestino estuvo en el rango de entre 10^5 – 10^6 en el T1 y para el T2, el único camarón del que se aisló colonias fue de la magnitud de 10^6 . (Cuadro-A107)

4.15.2.2. Segundo muestreo en los T1-T2.

Siempre con el análisis de los resultados expuestos en la figura 59, en el T1 el número de camarones en los cuales hubo presencia de bacterias ácido lácticas fue del 30%, un leve incremento con respecto a los datos del primer muestreo; y la situación fue parecida en el T2 pues fue del 20%.

La concentración de colonias (UFC/g) en el estanque 10 tuvo un rango de entre 10^6 y 10^7 ; en el T2 todos los camarones positivos (20%) el resultado fue de 10^6 . (Cuadro-A108)

4.15.2.3. Primer muestreo en los estanques T3-T4.

Los datos de los estanques sometidos a tratamiento con bacterias ácido lácticas se muestran en la figura 58 y se pudo observar que la situación fue sustancialmente diferente con respecto a los dos estanques control: en el T3 el 100% de los camarones muestreados tuvo colonización de bacterias ácido lácticas, es decir que en todos los camarones de la muestra se reportó crecimiento microbiano; y en el T4 hubo el 80% de camarones con crecimiento positivo.

La concentración de bacterias encontradas en el análisis microbiológico para el T3 estuvo en un rango de entre 10^9 y 10^{12} y en el T4 el rango fue de entre 10^8 y 10^{12} . (Cuadro-A 109).

4.15.2.4. Segundo muestreo en los estanques T3-T4.

Los resultados también son mostrados en la figura 58, persistió el mismo resultado encontrado para el T3 pues en el 100% de los camarones muestreados hubo crecimiento de bacterias ácido lácticas y aumentó para el T4 pues el resultado fue del 90%.

La concentración bacteriana reportada para el T3 estuvo en un rango de entre 10^8 y 10^{13} y en el T4 fue de entre 10^9 y 10^{12} . (Cuadro-A110).

4.15.2.5. Comparación de ambos tratamientos.

Los resultados del primer muestreo fueron significativamente diferentes entre lo obtenido con los T1 Y T2 con respecto a los T3 y T4 pues si se evalúa la relación del número de camarones con presencia de bacterias ácido lácticas, la diferencia de puntaje entre el T1 y el T4 es de +60% en favor del segundo. La diferencia encontrada entre los T2 y T3 fue de +90% también en favor del segundo.

Para el segundo muestreo, las diferencias favorables a los estanques con tratamiento también fueron significativamente mayores pues en el caso de los T1 y T4 la diferencia fue de +60% y en el otro ensayo, entre los T2 y T3, la diferencia fue de +80%.

En cuanto a la comparación acerca de la concentración de bacterias ácido lácticas del primer muestreo, las diferencias fueron altamente significativas: entre los T1 y T4 la diferencia fue en orden de magnitud de $+10^5$ en favor del segundo, las diferencias entre los T2 y T3 fue de $+10^5$ en favor del segundo.

Los resultados obtenidos en el segundo muestreo fueron similares: la diferencia entre la concentración de los T1 y T4 fue de $+10^5$ en favor del segundo y para los T2 y T3 la diferencia estuvo en un orden de magnitud de $+10^6$. Todo esto se expone en la tabla 31.

Cuadro 25. Comparación del número de camarones colonizados con bacterias ácido lácticas y la concentración en el tracto intestinal de los tratamientos aplicados en la camaronera Las Animas, El Salvador

TRAT	No. de camarones con bacterias ácido lácticas (%)		Concentración de bacterias ácido lácticas (valor promedio 10^n)		Diferencia de concentración ($+10^n$)	
	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo
T1	20	30	10^6	10^6		
T4	80	90	10^{11}	10^{11}	$+10^5$	$+10^5$
T2	10	20	10^6	10^6		
T3	100	100	10^{11}	10^{12}	$+10^5$	$+10^6$

Fuente: Navarrete 2017.

4.15.2.6. Discusión de resultados del número de camarones colonizados con bacterias ácido lácticas y la concentración en el tracto intestinal para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Según Villaseñor (2012), en su investigación el rango de oscilación de bacterias ácido lácticas en el tracto digestivo de los camarones era de 10^7 a 10^8 , esta información es concordante con lo registrado por la investigación, ya que, el rango es de 10^6 hasta 10^{12} .

Por otra parte García *et al* (2015), reporta que un 86% de los camarones muestreados en su investigación que presentan colonización del tracto digestivo de los camarones, este dato se encuentra dentro del rango de lo registrado por la investigación, ya que para los estanques 12 y 13 que fueron tratados con las bacterias nativas se encuentran en un rango de 90 a 100% de colonización.

4.15.3. Comparación de la concentración de Bacterias *Vibrio* spp. presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio.

En el estudio también se hizo la cuantificación de la concentración de Vibrios presentes en el intestino de los camarones utilizados en el análisis de laboratorio con el propósito de evaluar la “carga bacteriana” presente tanto en el inicio del tratamiento con las bacterias benéficas dosificadas en el alimento que a diario se proporcionó a la población de los estanques, así como el haber transcurrido aproximadamente dos meses con los organismos sometidos a tratamiento (20/7/2017)).

Los resultados del primer muestreo (7/6/2017), cuando ya transcurrían 13 días de tratamiento con bacterias ácido lácticas, teniendo en cuenta que la primera aplicación fue el 25/5/2017, mostró que en el T1 había un 60% de prevalencia de camarones con especies reconocidas por tener cepas patógenas para el camarón como son *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, mientras que en el T4 la prevalencia para las mencionadas especies fue del 40%. Las concentraciones máximas alcanzadas de las referidas especies fue de 10^9 UFC/g en el T1 y de 10^{11} UFC/g en el T4. La especie de *V. alginolyticus*, reportada por poseer un efecto menos nocivo para el camarón debido a la poca referencia de cepas patógenas que pudieran reportarse en algunos casos, tuvo la prevalencia del 60% y 20% en los T1 y T4 respectivamente. La concentración máxima fue de 10^8 UFC/g y 10^{13} UFC/g para los T1 y T4 respectivamente. En resumen, la condición de la concentración microbiana por Vibrios presentes en los intestinos fue mucho mayor en el T4. (Cuadro-A105)

Transcurridos 56 días de tratamiento, al realizar el segundo muestreo (20/7/17), la prevalencia de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* fue del 90% y 30% para los T1 y T4 respectivamente. La concentración máxima de ambas especies presentes en los intestinos fue de 10^9 UFC/g y 10^{10} UFC/g para los T1 y T4 respectivamente, en el T1 incluyó la presencia de cepas bioluminiscentes de *V. harveyi*, que son consideradas las más patógenas.

Nuevamente, tomando en cuenta los resultados del primer muestreo (7/6/2017), transcurridos 13 días de tratamiento con bacterias ácido lácticas (primera aplicación fue el 25/5/2017), mostró que en el T2 hubo un 60% de prevalencia de camarones con especies reconocidas por tener cepas patógenas para el camarón como son *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* (incluidas cepas bioluminiscentes, prevalencia 10%), mientras que en el T3 la prevalencia para las mencionadas especies fue del 50%. Las concentraciones máximas alcanzadas de las referidas especies fue de 10^9 UFC/g en el T2 y de 10^{11} UFC/g en el T3. La especie de *V. alginolyticus*, reportada por poseer un efecto menos nocivo para el camarón debido a la poca referencia de cepas patógenas que pudieran reportarse en algunos casos, tuvo la prevalencia del 70% y 50% en los T2 y T3 respectivamente. La concentración máxima fue de 10^{10} UFC/g y 10^{11} UFC/g para los T2 y T3 respectivamente. En resumen, la condición de la concentración microbiana por Vibrios presentes en los intestinos fue mucho mayor en el T3.

Después de 56 días de tratamiento, los resultados del segundo muestreo (20/7/17) fueron: la prevalencia de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* fue del 30% y 60% para el T2 y una prevalencia del 30% de *V. parahaemolyticus* en el T3. La concentración máxima de ambas especies presentes en los intestinos fue de 10^9 UFC/g en el T2 y de 10^{11} UFC/g de *V. parahaemolyticus* en el T3. En el T2 hubo presencia de cepas bioluminiscentes de *V. harveyi* (prevalencia del 10% y concentración de 10^8 UFC/g) que son consideradas las más patógenas. (Cuadro-A106).

La especie de *V. alginolyticus* en el segundo muestreo tuvo una prevalencia del 70% y una concentración máxima de 10^{10} UFC/g en el T2 y en el T3 tuvo prevalencia del 50% con una concentración máxima de 10^{11} UFC/g, estos valores podrían considerarse como riesgo moderado o leve pues se asume que ésta especie de Vibrio tiene poco reporte de cepas patógenas y forma parte de la flora intestinal del camarón.

Cuadro 26. Comparación del número de camarones colonizados con bacterias *Vibrio* spp. y la concentración en el tracto intestinal de los tratamientos aplicados en la camaronera Las Animas, El Salvador.

TRAT	No. de camarones con bacterias <i>Vibrio</i> spp. (%)		Concentración de bacterias <i>Vibrio</i> spp. (valor promedio 10^n)		Diferencia de concentración ($+10^n$)	
	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo	primer muestreo	segundo muestreo
T1	85	100	10^{25}	10^{37}	0	$+10^{16}$
T4	60	100	10^{25}	10^{21}		
T2	100	88	10^{19}	10^{36}		$+10^{14}$
T3	90	50	10^{30}	10^{22}	$+10^{11}$	

Fuente: Navarrete 2017.

Los resultados del primer muestreo fueron diferentes entre lo obtenido con el T1 y el T4 según el cuadro 26, pues si se evalúa la relación del número de camarones con presencia de Vibrios, la diferencia de puntaje entre ambos es de +25 % en favor del primero. La diferencia encontrada entre los T2 y T3 fue de +10 % también en favor del primero.

Para el segundo muestreo, la prevalencia de camarones encontrados con presencia de Vibrios fue igual entre el T1 y el T4 y en el otro ensayo, entre los T2 y T3, la diferencia fue de +38 % en favor del primero, hubo un descenso de animales portadores en el T3.

En cuanto a la comparación acerca de la concentración de Vibrios del primer muestreo, no hubo diferencias entre los T1 y T4 pues en ambos la concentración fue de una magnitud de 10^{25} ; la diferencia entre los T2 y T3 fue de $+10^{11}$ en favor del segundo, es decir que en este caso el estanque con tratamiento tenía mucho mayor concentración de Vibrios a 14 días de haberse iniciado el tratamiento (el 26/05/2017).

Los resultados obtenidos en el segundo muestreo fueron iguales en cuanto al número de animales portadores de Vibrios tanto en el T1 como en el T4 (100%), pero la situación se diferencia entre la concentración de los T1 y T4 fue de $+10^5$ en favor del segundo y para los T2 y T3 la diferencia estuvo en un orden de magnitud de $+10^6$.

4.15.4. Cuantificación de la concentración Bacteriana lograda en los medios de cultivo líquido.

Se hizo un esfuerzo por lograr establecer la cuantificación de la carga microbiana de bacterias benéficas que pudiera contener cada uno de los medios de cultivo dispuesto y transferido en volúmenes crecientes hasta llegar a obtener un cultivo masivo de las mismas. Todos esos

pasos fueron hechos en medio líquido elaborado en las primeras etapas con caldo de RMS, marca Merck® (tubo de ensayo de 10 ml y matraz Erlenmeyer de 1 litro según lo establecido en la tabla 3) y en la etapa de transferencia a garrafón y tinaco fue elaborado con el medio del cultivo. Fue necesario determinar la concentración máxima que alcanza al cabo de cierto período de tiempo según las condiciones creadas tanto en el laboratorio como en el sitio de la granja. A continuación los resultados obtenidos:

4.15.5. Bacterias ácido lácticas nativas

Cuadro 27. Concentración de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus paracasei* en medios de cultivo líquido y en ambiente controlado de laboratorio.

N° de muestra	Bacteria	Muestra	Dilución	UFC/ml
1	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Tubo de ensayo	1/100,000	2.8x10 ⁸
2	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Garrafón	1/1,000	4.1x10 ⁸
		Garrafón	1/10,000	7.0x10 ⁸
		Garrafón	1/100,000	1.4x10 ¹⁰
3	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Garrafón	1/1,000	incontables
		Garrafón	1/10,000	incontables
		Garrafón	1/100,000	1.6x10 ⁹
4	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Garrafón	1/10,000	1.3x10 ⁸
		Garrafón	1/100,000	1.8x10 ⁸
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Tubo de ensayo	1/10,000	1.1x10 ⁸
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Garrafón	1/1,000	incontables
		Garrafón	1/10,000	7.4x10 ⁸
		Garrafón	1/100,000	2.7x10 ⁹
7	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Garrafón	1/1,000	incontables
		Garrafón	1/10,000	incontables
		Garrafón	1/100,000	7.4x10 ⁸

Fuente: Navarrete 2017.

Con los datos mostrados en el cuadro 27, puede observarse que la concentración de bacterias tanto de *Lactococcus lactis* como de *Lactobacillus paracasei* obtenido en tubo de ensayo como en garrafón, el rango estuvo entre 10⁸ y 10¹⁰ en orden de magnitud, aunque el valor promedio fue de 10⁸ UFC. Fue necesario hacer siembra en placa con agar RMS con inóculo proveniente de tres diluciones (1/1,000, 1/10,000 y 1/100,000) para poder asegurarse de cuantificar una muestra que de antemano puede suponerse que contiene una gran cantidad de microorganismos.

Las concentraciones obtenidas en un ambiente controlado dentro del laboratorio estuvieron en los valores adecuados para asegurarse que contenían una buena cantidad de bacterias que

constituirían un buen inóculo al momento de ser transferidos (el garrafón) a un volumen mayor para el cultivo masivo en ambiente externo, poco controlado pues se hizo al aire libre.

Cuadro 28. Concentración de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus paracasei* en medios de cultivo líquido y en ambiente externo, al aire libre.

N° de muestra	Bacteria	Muestra	Tipo de muestra	UFC/ml
1	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Tinaco	1/10,000	2.7x10 ⁹
		Tinaco	1/100,000	5.3x10 ⁹
2	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Tinaco	1/10,000	2.1x10 ⁹
		Tinaco	1/100,000	8.2x10 ⁹
3	<i>Lactococcus lactis</i> Cepa E 33	Tinaco	1/10,000	1.2x10 ⁹
		Tinaco	1/100,000	4.6x10 ⁹
4	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Tinaco	1/10,000	9.7x10 ⁸
		Tinaco	1/100,000	3.9x10 ⁹
5	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Tinaco	1/10,000	6.8x10 ⁹
		Tinaco	1/100,000	3.5x10 ⁹
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> Cepa E 91	Tinaco	1/10,000	1.2x10 ⁹
		Tinaco	1/100,000	2.9x10 ⁹

Fuente: Navarrete 2017.

Las concentraciones de *L. lactis* y *L. paracasei* obtenidas en el medio de cultivo confinado en los tinacos de 750 litros de capacidad estuvieron en un rango entre 10⁸ y 10⁹ en orden de magnitud y el promedio fue de 10⁹ UFC, según los datos expuestos en la tabla 44. Estas concentraciones obtenidas en el masivo externo están dentro de los valores necesarios pues se asume que la mínima necesaria es de al menos 10⁸ UFC para poder asegurarse un tratamiento efectivo a la hora de ser aplicado a los estanques.

Se logró mayor cantidad de bacterias ácido lácticas nativas en el ambiente externo (promedio 10⁹ UFC) si se compara con las obtenidas en el ambiente controlado de laboratorio (promedio 10⁸). Esto puede ser explicado en relación a la variable de la temperatura ambiente que prevalece en el entorno donde se ubican los tubos de ensayo, los garrafones y los tinacos; el ambiente sombreado al interior del laboratorio hizo que los garrafones logren en la máxima hora soleada del día (12:00 – 2:30 pm) temperatura de 29° C, mientras que en ese mismo lapso, el medio de cultivo de los tinacos alcanzó 34° C.

También se determina que la aplicación diaria de un tratamiento con bacterias ácido lácticas vía alimentación es necesaria en esa frecuencia debido a que la mayor parte de la flora intestinal de un camarón se cataloga como de tipo transitoria, que no permanece mucho tiempo alojada en el órgano y la explicación es que la longitud del intestino es demasiado pequeña y

por consiguiente el tránsito intestinal también es por un período corto, a diferencia de algunos animales superiores como los rumiantes. En un camarón el tiempo del tránsito digestivo tiene un máximo de 2 horas cuando la temperatura del agua es mayor a 30° C.

Las condiciones en el ambiente controlado establecidas en el laboratorio de la granja Las Ánimas son satisfactorias para lograr un crecimiento microbiano en volúmenes de tubo de ensayo, recipiente de 1 litro y garrafón de 18 litros de capacidad, pues lo obtenido mínimo necesario fue de 10^8 UFC/ml. Esto permite garantizar una buena cantidad de inóculo al momento de ser transferido al masivo en ambiente externo.

El crecimiento de bacterias ácido lácticas como de bacterias aeróbicas contenidas en el Epicin PST obtenido en el medio de cultivo masivo externo, con toda la técnica empleada y las condiciones recreadas en el ambiente al aire libre, fue suficiente para obtener un valor promedio de 10^9 UFC/ml; un valor adecuado para garantizar la eficacia de la aplicación en los estanques. No hubo diferencia en el crecimiento de ambas especies de bacterias ácido lácticas nativas, pues la concentración lograda fue la misma para ambas. No hubo diferencias en cuanto al rendimiento obtenido utilizando un medio de cultivo certificado y estandarizado como puede ser el de la marca Merck® y un medio de cultivo hecho de manera artesanal pero que previamente ha sido validado mediante ensayos investigativos. Sin embargo, conviene aclarar que para las primeras fases del cultivo de bacterias benéficas siempre será recomendable utilizar un producto certificado y estandarizado en su control de calidad.

4.15.6. Bacterias aeróbicas contenidas en el Epicin PST y Epicin G2

Cuadro 29. Concentración de bacterias aeróbicas contenidas en el EPICIN PST y EPICIN G2 en medios de cultivo líquido tanto en ambiente controlado de laboratorio como externo, al aire libre.

N° de muestra	Bacteria	Muestra	Dilución	UFC/ml
1	Aeróbica PST	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	7.3×10^9
2	Aeróbica PST	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	2.2×10^{10}
3	Aeróbica PST	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	9.5×10^{10}
4	Aeróbica PST	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	4.2×10^{10}
5	Aeróbica PST	Tinaco	1/100,000	9.0×10^9
6	Aeróbica PST	Tinaco	1/100,000	6.0×10^9
7	Aeróbica G2	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	5.5×10^{10}
8	Aeróbica G2	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	2.6×10^{10}
9	Aeróbica G2	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	2.9×10^{10}
10	Aeróbica G2	Matraz Erlenmeyer de 1 litro	1/100,000	8.1×10^{10}

Fuente: Navarrete 2017.

Con respecto a la concentración de bacterias aeróbicas que contiene tanto el Epicin PST como el Epicin G2, según la tabla 38, éstas alcanzaron 10^{10} UFC de magnitud como valor promedio y un rango entre 10^9 y 10^{10} cuando se puso a incubar en matraces tipo Erlenmeyer, en el ambiente controlado del laboratorio. Sin embargo, para el caso del Epicin PST, el medio masivo externo obtuvo un valor de 10^9 UFC.

Nuevamente, las concentraciones logradas tanto con el medio bacteriológico de RMS, marca Merck®, así como con la formulación del medio de cultivo hecho conforme a la tabla 3, tabla 4 y tabla 6 fueron idóneas para lograr concentraciones de crecimiento microbiano de 10^8 UFC como mínimo establecido para obtener un buen prebiótica (Navarrete 2017). El masivo de Epicin PST, al igual que el masivo de bacterias ácido lácticas, obtuvo valores de 10^9 UFC. El fabricante del Epicin PST y Epicin G2 también plasma en su etiquetado que el conteo de bacterias aeróbicas en ambos productos es de 10^9 unidades formadoras de colonias por cada 1.0 gramo de polvo liofilizado contenido en las bolsas de presentación.

El Epicin G2 no fue llevado hasta cultivo masivo, sino que únicamente se aplicó al balanceado tipo pellet con que se alimentó a los camarones de los T1 y T2.

4.15.7. Discusión de resultados de las bacterias aeróbicas contenidas en el Epicin PST y Epicin G2 para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Según Cruz (2013) para que un probiotico pueda ejercer su actividad y mantenerse viable debe mantenerse a una concentración de 1.0×10^6 a 1.0×10^8 UFC/g. Esto es congruente con la investigación, ya que, tanto las bacterias ácido laticas y el probiotico EPICIN G2 mantiene una concentración de 1.0×10^8 a 1.0×10^9 y de 1.0×10^9 a 1.0×10^{10} respectivamente. Prentu (2016) nos indica que la concentración recomendada por los fabricantes para que un probiotico se mantenga viable es de 2.87×10^7 UFC/g, este registro es similar a lo que la investigación registra, ya que, tanto las bacterias ácido lácticas y el probiotico se encuentran por encima de este rango.

La temperatura constituye una variable crucial para lograr una condición óptima de incubación de bacterias benéficas pues ésta favoreció un mayor crecimiento microbiano logrado en el cultivo masivo externo (10^9 UFC) con respecto al ambiente controlado de laboratorio (10^8 UFC). Un ambiente externo que tenga como promedio valores de 34° C y que pueda ser mantenido más o menos de manera constante aún en las horas nocturnas es deseable siempre en las instalaciones donde se confina el cultivo masivo.

Melgar *et al* 2012, propone que para bacterias lácticas como probiótico la concentración en latencia mínima debe ser de 5.0×10^4 UFC/g para mantener su viabilidad; aunque este dato es menor al registrado por la investigación, guarda congruencia con los datos obtenidos ya que en condiciones de laboratorio la bacterias ácido lácticas se encuentran con un concentración mínima de 1.0×10^8 .

4.16. Índice de Estado Trófico (TRIX, por sus siglas en ingles)

4.16.1. Comparación del TRIX entre T1 y T4 entrada.

Estadísticamente se determina que no existen diferencias significativas con $P > 0.3910$, es decir, que el índice de estado trófico se comporta de similar manera con leves diferencias, ya que el promedio más alto de este índice lo registra el T1 con 9.75, con una desviación estándar de 0.83 y un coeficiente de variación de 9.82%, contra un promedio de 9.5 para el T4, una desviación estándar de 0.5 y un coeficiente de variación de 6.08%, mostrando una homogeneidad entre el comportamiento de los incide en los diferentes muestreos. (Cuadro-A72).

4.16.2. Comparación del TRIX entre T1 y T4 salida.

Estadísticamente se determina que no existen diferencias significativas con $P > 0.999$ con respecto al índice trófico, es decir que para este muestreo de salida se comportan de igual manera, ya que para ambos tratamientos se registra un promedio de 9.75 del TRIX, con una desviación estándar de 0.43 y un coeficiente de variación de 5.13%. (Cuadro-A73)

4.16.3. Comparación del TRIX entre T2 y T3 entrada.

Con $P > 0.6376$ se puede determinar que no existen diferencias en cuanto a los valores del estado trófico, es decir, que estos se comportan de manera similar, mostrando el mayor promedio el T3 con 9.75, una desviación estándar de 1.09 y un coeficiente de variación de 12.91%, mostrando una alta confiabilidad entre los valores registrados, esto puede contrastar con los registros del T2 con un promedio de 9.5, desviación estándar de 0.5 y un coeficiente de variación de 6.08%, mostrándose más homogénea que el tratamiento E12. (Cuadro-A74).

4.16.4. Comparación del TRIX entre T2 y T3 salida.

Analizando los datos utilizando la prueba de T se determinó que no existen diferencias significativas con $P > 0.6376$, es decir, que este índice se comporta de manera similar, registrando el mayor promedio el T3 con 9.5, una desviación estándar de 0.5 y un coeficiente de variación con valor de 6.08%, contra el promedio registrado por el T2 con 9.25, una desviación estándar de 0.43 y un coeficiente de variación de 5.41%. (Cuadro-A75).

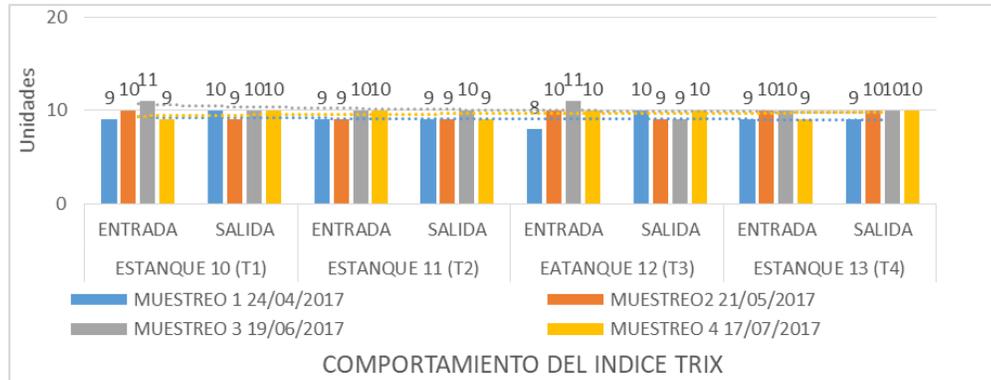


Figura 19. Comportamiento del Índice de Estado Tráfico para los muestreos de entrada y salida en los diferentes estanques.

Como muestra la figura 19, el comportamiento del índice de estado tráfico muestra un comportamiento homogéneo en sus valores oscilado entre los valores de 9 a 10, mostrando algunos registros donde se observan valores de 8 y 11 para el primer y tercer muestreo de entrada para el estanque 12; así como para el estanque 10 en el tercer muestreo con un valor de 11, siendo este su mayor registro. (Cuadro-A76).

4.16.5. Discusión de resultados del Índice de Estado Tráfico (TRIX) para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Los promedios del índice TRIX para los estanques se encuentran con valores de $T1=9.75$, $T2=9.3$, $T3=9.6$ y $T4=9.6$, lo cual nos indica que las aguas son hipertróficas (Cuadro A-1), es decir que el agua es altamente productiva con calidad pobre para el consumo humano. Estos datos altamente superiores a los registrados por Escobedo (2010), para el sistema lagunar de costero (San Ignacio- Navachiste – Macupule) en México con un valor de 5.43, mientras su análisis de los registros del Golfo de California en 2003 indican un valor de 6.2. Por otra parte lo registrado por Murrillo *et al* (2008), presentan un Sistema lagunar costero en Chile con valores < 3.0 para el TRIX, valor ampliamente inferior a lo registrado por la investigación; al igual que lo registrado por Barraza – Guardado *et al* (2014), con promedios en distintas granjas con valor de 4.2, 3.3

y 3.6 de índice TRIX. Al mismo tiempo Castillo (2013) Reporta un rango de oscilación que desde 1 a 2.5 y Niola (2017), con un promedio de 4.2.

La diferencia en cuanto al tipo de agua que el índice TRIX manifiesta con respecto a las investigaciones citadas, puede deberse a que la camaronera que se utilizó en el estudio se encuentra al final de la zona manglar y ahí es donde se dirigen todas las aguas residuales provenientes de las parcelas agrícolas de la zona, manifestando el pobre estado del agua en cuanto al consumo humano.

4.17. Índice de la Calidad de Agua (ICA)

El estero de Jaltepeque posee un área extensa como cuerpo de agua, y puesto que la “Camaronera Las Ánimas” se encuentra ubicada dentro de este se tomó cuatro puntos de muestreo para la calidad del agua, siendo estos los estanques en estudio, para esta cálculo se muestrearon las compuertas de entrada y salida de cada estanque para determinar con que calidad entra y sale el agua. (Cuadro-A78)

Este ICA permitirá reflejar las condiciones reales en que se encuentran las aguas que se utilizan para la crianza de camarones en la zona de dicho lugar.

4.17.1. Comparación del ICA para estanque T1 y T4 entrada.

Cuadro 30. Índice de calidad de agua para los estanques T1 y T4.

Compuerta	TRATAMIENTO	F1	F2	F3	ICA	CATEGORIA
ENTRADA	T1	58.33	37.5	93.88	32.62	POBRE
	T4	83.33	47.91	83.28	28.35	POBRE

Fuente: Laboratorio de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador 2017.

La información anterior refleja que la calidad del agua para ambos estanques en el muestreo de entrada se clasifica como pobre según Canadian Council of the Environment. 2001 (Tabla-A77), se puede observar que existe una diferencia de 4.27 unidades en el ICA entre los estanques, lo indica que existe una variación de la calidad del agua a favor del T1. Se puede asumir que la calidad del agua para la compuerta de entrada es relativamente más alta para dicho estanque.

4.17.2. Comparación del ICA para estanque T1 y T4 salida.

Cuadro 31. Índice de calidad de agua para los estanques T1 y T4.

Compuerta	TRATAMIENTO	F1	F2	F3	ICA	CATEGORIA
SALIDA	T1	83.33	43.75	94.01	23.2	POBRE
	T4	83.33	58.33	83.55	24.01	POBRE

Fuente: Laboratorio de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador 2017.

En el muestreo de salida para ambos estanque según la información del cuadro anterior, las aguas que los estanques desalojan hacia el estero registran un valor del ICA que se clasifican como pobre. Se puede observar que existe una pequeña variación a favor del T4.

Por otra parte al analizar las diferencias que reflejan los valores del ICA para las compuertas de entrada y salida en los T1 y T4, se observa que al utilizar la bacteria *Lactococcus lactis* la calidad del agua es poco variable con respecto al valor de entrada con el de salida, en el T4, con una diferencias de 4.34 unidades en el valor ICA, a diferencia de lo registrado por el T1 que utiliza el probiotico comercial EPICIN G2, el cual, presenta una diferencia de 9.2 unidades del valor ICA. Lo que lleva a determinar que la bacteria nativa provoca que el agua al entran y ser utilizada por el estanque varié mínimamente sus parámetros al ser desalojada hacia el Estero. (Cuadro-A79)

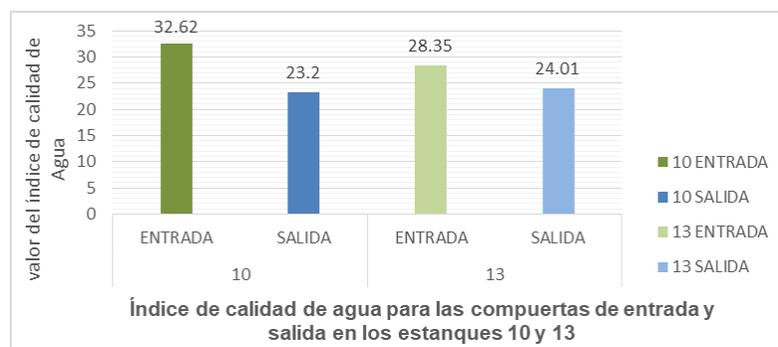


Figura 20. Comparación del valor ICA para entrada y salida en los T1 y T4.

La figura anterior muestra el comportamiento de los valores ICA para los T1 y T4, mostrando que la calidad del agua para el T1 posee mayor variación entre el agua que entra y se desaloja al estero, generando mayor deterioro a las condiciones del agua del estero, mientras que la variación del T4 es mínima con respecto al agua que entra y se desaloja al estero.

4.17.3. Comparación del ICA para los T2 y T3 entrada.

Cuadro 32. Índice de calidad de agua para los estanques 11 y 12.

Compuerta	TRATAMIENTO	F1	F2	F3	ICA	CATEGORIA
ENTRADA	T2	75	52.08	70.82	33.27	POBRE
	T3	75	47.92	83.28	29.62	POBRE

Fuente: Propia 2017.

Con la información del cuadro anterior las aguas para ambos estanques se clasifican como pobres. Observando una diferencia de 3.65 unidades del valor ICA a favor del estanque 11 con respecto a lo registrado por el estanque 12. Se asume que los parámetros del agua para el estanque 11 son ligeramente superiores a los del estanque 12.

4.17.4. Comparación del ICA para los T2 y T3 salida.

Cuadro 33. Índice de calidad de agua para los estanques 11 y 12.

Compuerta	TRATAMIENTO	F1	F2	F3	ICA	CATEGORIA
SALIDA	T2	91.66	54.17	73.47	25.31	POBRE
	T3	75	56.25	84.17	27.26	POBRE

Fuente: Propia 2017.

Según la información anterior para el muestreo de salida se clasifica las aguas de los estanques como pobres. Observado que el T2 registra un índice mayor con respecto al T3.

Al igual que en los T1 y T4, al analizar los valores del ICA para los T2 y T3, se puede afirmar que al utilizar la bacteria *Lactobacillus paracasei* se produce menor variabilidad en la calidad del agua que entra al estanque con respecto al agua desalojada por T3, a comparación del T2 que utiliza el probiótico comercial, ya que este registra una diferencia de 7.96 unidades del índice ICA, contra el 2.36 unidades del valor ICA del T3. Lo que indica que el agua que se desaloja al estero por parte del T3 varía poco sus parámetros. (Cuadro-A80).

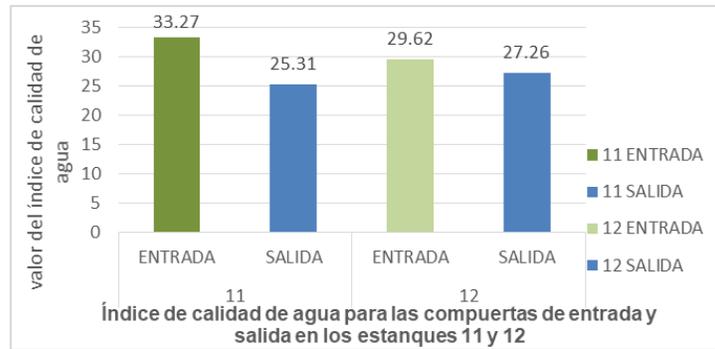


Figura 21. Comparación del valor ICA para entrada y salida en T2 y T3.

La figura 21 muestra la diferencia que se produce en la calidad del agua en los estanques, denotando que existe una mayor diferencia en el ICA de entrada en el T2 con el registro de salida, además se puede observar que el T3 (*Lactobacillus paracasei*) registra una variabilidad baja con respectó a ambos muestreos.

4.17.5. Índice de la calidad del agua general.

4.17.5.1. Comparación del Valor ICA entre T1 y T4.

Cuadro 34. Índice de calidad de agua para los T1 y T4.

Muestreos	ICA estanque 10	ICA estanque 13
16	24.33	26.09

Fuente: Propia 2017.

Según la información del cuadro 34 la clasificación de las agua para los T1 y T4 se clasifican como pobres, ya que no cumplen los estándares normados para el consumo humano y diversas actividades relacionadas, se puede observar que el T4 el cual utiliza la bacteria nativa *Lactococcus lactis* registra un mayor índice de calidad del agua con respecto a lo registrado por el T1 que utiliza el probiotico comercial EPICIN G2, esto nos indica que la bacteria favorece las condiciones de los parámetros utilizados en el cálculo del ICA, generando menor deterioro de la calidad del agua que se desaloja al estero de Jaltepeque.



Figura 22. Comparación del valor ICA para los T1 y T4.

La figura anterior muestra que el valor ICA para el T4 es 1.76 unidades del valor ICA mayor por lo registrado por el T1, aunque ambos estanques clasifican sus aguas como pobres el *Lactococcus lactis* genera mejores condiciones en la calidad del agua.

4.17.6. Comparación del valor ICA para los T2 y T3.

Cuadro 35. Índice de calidad de agua para los T2 y T3.

Muestreo	ICA estanque 11	ICA estanque 12
16	29.33	28.72

Fuente: Propia 2017.

La información del cuadro 35 muestra que la calidad del agua para ambos estanque se clasifican como pobres, denotando que el T2 el cual utiliza la el probiotico comercial EPICIN G2 es ligeramente mayor con 0.61 unidades más que lo registrado por el T3 que utiliza la bacteria nativa *Lactobacillus paracasei*, esto indica que ambos estanques mantiene parámetros similares en el agua.



Figura 23. Comparación del valor ICA para los T2 y T3.

La figura anterior muestra el comportamiento general del valor ICA entre los T2 y T3, mostrando que aunque la aguas se clasifican como pobres, el T3 genera condiciones que

favorecen los parámetros de la calidad del agua, debido a la utilización de la bacteria *Lactobacillus paracasei*. Mostrando una mínima diferencia.

4.18. Discusión de resultados del Índice de Calidad de Aguas (ICA) para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Los valores del ICA obtenidos para los tratamientos testigos (T1 y T2) y los tratamientos con bacteria nativa (T3 y T4) registraron valores de 24.33, 29.33, 26.09 y 28.72 respectivamente, por medio de la formula canadiense ICA CCME y la tabla Canadian Council of the Environment. 2001, las cuales clasifican las aguas de los estanques como “Pobres”, esta clasificación varia con la interpretación propuesta por el SNET y MARN, ya que ellos clasifican las aguas según la interpretación de la tabla propuesta por Lobos (2002) citado en el informe del MARN para la clasificación de las aguas de El Salvador (MARN, s.f). Evaluación de los Contaminantes del Embalse del Cerrón Grande PAES 2002; obteniendo que para esta interpretación los estanque T2, T3 y T4 clasifican sus aguas como Malas, lo cual indica pueden solamente apoyar una diversidad baja de la vida acuática y están experimentando probablemente problemas con la contaminación. (MARN, s.f.), y el T1 se clasifica como Pésima.

Según La información que presenta el MARN (2017), en el puesto de monitoreo del rio San Antonio en el límite de San Vicente y la paz la calidad del agua se encuentra con un valor ICA de 68, la cual clasifica a las agua como “Regular” Contrastando con los registros de cada estanque, por otra parte en el mismo estudio el MARN clasifica en general las aguas de la zona del Estero de Jaltepeque con el rango de agua “Mala”, generando concordancia con la información presentada por esta investigación. Por otra parte según MARN- BID (2006) se clasificaron las aguas del Rio San Antonio, el cual es el punto de monitoreo más cercano a la granja, con un valor general del ICA para aguas superficiales de 33.35, contrastando con los valores de la investigación los cuales muestran un deterioro de la calidad del agua con el tiempo; esto puede afirmarse con el informe presentado por el MARN (2013), el cual clasifica las aguas para el periodo comprendido entre 2012 – 2013 como agua “Regular”.

Se puede agregar que según el informe del MARN (2012), para Zacatecoluca solo el 7% de las localidades de este municipio cuenta con el registro de aguas pésimas, debido a la contaminación de las zonas agrícolas y el mal manejo de los desechos.

4.19. Muestreo microbiológico del Agua.

En la presente investigación se realizaron cuatro muestreos uno por mes, en cuatro tratamientos; dos controles (T1 y T2) y dos cepas nativas (T3 y T4), y se registró la carga bacteriana expresada en UFC/ml y en NMP/100 ml en la muestras recolectadas en la compuerta de entrada y de salida; Es necesario saber que en los T1 y T2 se utilizó el probiótico “EPICIN G2”, y en el T3 *Lactobacillus paracasei* y T4 *Lactococcus lactis*; al mismo tiempo se compararon los resultados obtenidos con los límites máximos establecidos por la Norma Uruguaya UNIT-833 (2008) 500 UFC/ml para bacterias Heterótrofas, 300 UFC/ml para *Pseudomona* spp, y para *Vibrios* 10⁵ NMP/100 ml. (Tablas 15 y 16).

Cuadro 36. Resultados de los parámetros microbiológicos del agua: *Vibrio* spp, *Pseudomona* spp y Bacterias Heterótrofas en la compuerta de entrada.

Estanque	Compuerta	Especies bacterianas	Unidades	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Límite aceptable	Referencia
Estanque 10 (T1)	Entrada	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	9.30E+03	4.60E+04	4.30E+03	1.50E+03	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>V. parahaemolyticus</i>	UFC/ml	9.30E+03	1588	1100	330000	menor a 500 UFC/ml	Norma uruguaya UNIT-833:2008
		Heterótrofas			40	4600		menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>Pseudomonas</i>							
Estanque 11 (T2)	Entrada	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	4.60E+04	1.10E+05	2.30E+03	4.30E+03	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>V. parahaemolyticus</i>	UFC/ml	4.60E+04	1.10E+05			menor a 500 UFC/ml	Norma uruguaya UNIT-833:2008
		Heterótrofas		590	1515	717	26100	menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>Pseudomonas</i>			150	70			
Estanque 12 (T3)	Entrada	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	4.60E+04	2.40E+05	1.10E+05	9.20E+02	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>V. hollisae</i>	UFC/ml		2.40E+05	1.10E+05		menor a 500 UFC/ml	Norma uruguaya UNIT-833:2008
		Heterótrofas		988	2358	9000	59000	menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>Pseudomonas</i>			930	460			
Estanque 13 (T4)	Entrada	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	9.30E+03	2.40E+03	5.00E+04	3.60E+02	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano
		<i>V. parahaemolyticus</i>			2.40E+03				
		<i>V. vulnificus</i>		9.30E+03					
		<i>V. hollisae</i>			2.40E+03				
		<i>V. damsella</i>				3.60E+02			
		Heterótrofas	UFC/ml	893	4100	3100	24000	menor a 500 UFC/ml	Norma uruguaya UNIT-833:2008
		<i>Pseudomonas</i>			40	1500		menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador

Cuadro 37. Resultados de los parámetros microbiológicos del agua: *Vibrio* spp, *Pseudomonas* spp y Bacterias Heterótrofas en la compuerta de salida.

Estanque	Compuerta	Especies bacterianas	Unidades	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	Muestreo 4	Limite aceptable	Referencia	
Estanque 10 (T1)	Salida	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml		2.40E+05	4.30E+03	4.30E+03	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano	
		<i>V. parahaemolyticus</i>					4.30E+03			
		<i>V. vulnificus</i>		2.40E+05	2.40E+05					
		<i>V. cholerae</i>				4.30E+03				
		Heterótrofas	UFC/ml	1900	1575	778	320000	menor a 500 UFC/ml		Norma uruguaya UNIT-833:2008
		<i>Pseudomonas</i>		150	1500		menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano		
Estanque 11 (T2)	Salida	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	2.40E+05	4.60E+04	1.10E+03	9.20E+02	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano	
		<i>V. parahaemolyticus</i>		2.40E+05	4.60E+04					
		<i>V. cholerae</i>		4.60E+04						
		Heterótrofas	UFC/ml	726	1557	2100	20000	menor a 500 UFC/ml		Norma uruguaya UNIT-833:2008
				<i>Pseudomonas</i>		90				menor a 300 UFC/ml
Estanque 12 (T3)	Salida	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml		2.40E+05	2.40E+04	3.60E+02	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano	
		<i>V. parahaemolyticus</i>		2.40E+05			3.60E+02			
		<i>V. cholerae</i>		2.40E+05	2.40E+04					
		<i>V. vulnificus</i>		2.40E+05						
		Heterótrofas	UFC/ml	1500	1210	3100	61500	menor a 500 UFC/ml		Norma uruguaya UNIT-833:2008
		<i>Pseudomonas</i>		150	1500	90	menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano		
Estanque 13 (T4)	Salida	<i>V. alginolyticus</i>	NMP/100ml	1.10E+05	2.40E+05	5.00E+05	3.60E+02	100000 NMP/100ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano	
		<i>V. parahaemolyticus</i>			2.40E+05					
		<i>V. vulnificus</i>		1.10E+05						
		<i>V. cholerae</i>				3.60E+02				
		Heterótrofas	UFC/ml	813	2253	2200	73000	menor a 500 UFC/ml		Norma uruguaya UNIT-833:2008
		<i>Pseudomonas</i>		30			menor a 300 UFC/ml	Reglamento de calidad de agua para consumo humano		

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador
Para determinar la calidad microbiológica del agua las muestras se recolectaron se durante el desarrolló en el ciclo productivo que está comprendido en el periodo de abril a julio 2017, en el cual se realizó un muestreo mensual, en las compuertas de entrada y de salida de cada uno de los estanques en estudio, y se registraron la presencia de cinco especies de Vibrios, *Pseudomonas spp* y bacterias heterótrofas.

4.19.1. Conteo de bacterias Heterótrofas Mesófitas Aerobias.

4.19.1.1. Muestreo de entrada.

En el primer muestreo el T4, registro una disminución del 17.5 % en la carga de bacterias heterótrofas con respecto al T1, aunque sin embargo sobrepasa el valor máximo permitido por la normativa de referencia. En el segundo muestreo el T4 registro un incremento del 57.3 % y en el tercero un 29.4 % con respecto al T1, en ambos estanques, las concentraciones sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa de referencia; En el cuarto muestreo el T4 registro una disminución de 1.93 %, con respecto al T1, observando que para este muestreo los dos estanques posee la mayor concentración de bacterias heterótrofas durante toda la investigación.

En el primer muestreo el T3, registro un aumento de 34.14% en la carga de bacterias heterótrofas con respecto al T2, resaltando que ambos estanques sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa de referencia. Para el segundo la tendencia se mantiene, ya que el T3 presenta 11.8% más carga de bacterias heterótrofas con respecto al T2, en el tercer muestreo el T3 es 64.18% mayor en carga de bacterias heterótrofas que el T2 y en el cuarto el T3 sigue siendo mayor en 1.07% al T2 en cuanto a la carga de bacterias heterótrofas, observando que en este muestreo los estanque poseen la mayor concentración registrada de bacterias heterótrofas durante toda la investigación.

4.19.2. Muestreo de Salida.

En el primer muestreo se observa que el T4, registro una disminución de 35.19% a comparación del T1, en cuanto a la carga de bacterias heterótrofas, se observa que el T4 comparado con el muestreo de la compuerta de entrada a disminuido en 8.95% en la carga de bacterias heterótrofas y que el T1 a aumenta a comparación del muestreo de entrada en 31.58%, destacando que ambos estanque sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa referida. En el segundo muestreo el T4 aumento en 9.55% en la carga de bacterias heterótrofas a comparación del T1, observando que a comparación del muestreo de la compuerta de entrada el T4 disminuye y el T1 aumenta su concentración de bacterias heterótrofas. En el tercer muestreo el T4 sigue presentando la mayor carga de bacterias heterótrofas con 41.54% más que el T1, en están ocasión ambos estanque disminuyeron la concentración a comparación del muestreo de entrada. En el cuarto muestreo el T4 disminuye en 0.524% a comparación de lo que registra el T1, ambos estanque sobrepasan el valor máximo normado referido, y en este muestreo presenta la mayor concentración de la carga de bacterias heterótrofas en el muestreo de salida de toda la investigación.

En el primer muestreo el T3 aumentó la concentración de la carga de bacterias heterótrofas en 51.42% con respecto a lo registrado por el T2, ambos estanque a comparación del muestreo de entrada presenta un aumento en la carga de bacterias heterótrofas. Para el segundo muestreo el T3 presenta una disminución de 9.21% con respecto al T2, comparado con el muestreo de entrada el T2 aumento su concentración y el T3 disminuyo. Para el tercer muestreo el T3 aumenta en 7.68% la carga de bacterias heterótrofas a comparación del T2, observando que ambos estanques disminuyeron la concentración comparado con el muestreo de entrada. Para el cuarto muestreo el T3 es aumentó en 1.69% la carga de bacterias heterótrofas con respecto al T2, ambos estanques sobrepasan el valor máximo normado en

todos los muestreos, registrando en este muestreo el valor más alto de su concentración de toda la investigación en el muestreo de salida.

Los promedios generales del conteo de bacterias heterótrofas por cada tratamientos registran valores en UFC/ml de 8.23×10^4 para el T1; 6.65×10^3 para el T2; 1.73×10^4 para el T3 ; 1.38×10^4 para el T4, valores que son inferiores a lo registrado por Hernández, J (2016), ya que para los tres estanques que el utilizo en sus estudio registran valores de 8.2×10^5 , 6.7×10^5 , 4.9×10^5 UFC/ml, al mismo tiempo lo propuesto por Hernández muestra la particularidad contraria a la investigación que las concentraciones que el registró mostraron en los tres primeros muestreos un oscilación de 2.5×10^5 a 1.0×10^6 valores altamente superiores a la investigación y en el último muestreo las concentraciones disminuyeron, mientras que la investigación para el ultimo muestreo aumento drásticamente con respecto a los muestreos anteriores, cabe mencionar que las concentraciones más altas fueron registradas por el T1 con un valor de 3.25×10^5 UFC/ml. Aunque los registros de las bacterias heterótrofas sobrepasan la escala de normal aceptable de calidad de agua no mostraron efectos negativos en el desarrollo de los camarones.

Por otra parte López- Torres *et al* 2007 registra para uno de sus estanques en estudio un valor de 6.3×10^2 UFC/ml, el cual es inferior a lo que registran los tratamientos en estudio, mientras en el segundo estanque la concentración bacteria registro 2.8×10^3 , valor superior a lo registrado por los tratamientos 1, 2, 4 con valores de 1.37×10^3 , 1.2×10^3 y 2.2×10^3 UFC/ml respectivamente, mientras que es inferior al tratamiento 3 con un valor de 3.03×10^3 UFC/ml, estos datos son el promedio de 3 de cuatro muestreos, López-Torres *et al* 2007, registro para el cuarto muestreo un incremento de la concentración de la carga bacteriana, ya que para ese muestreo registro un valor para el primer estanque de 1.8×10^4 UFC/ml y de 2.9×10^4 para el segundo estanque, esto guarda relación con la investigación, ya que la cantidad de la concentración de bacterias aumento en los cuatros tratamientos en estudio.

4.20. Conteo de *Pseudomonas* spp.

4.20.1. Muestreo de entrada.

En el primer y cuarto muestro el T4 y el T1 no registraron carga de *Pseudomonas spp* en el agua y esto se debe a la baja carga de materia orgánica. En el segundo muestreo los dos tratamientos cumplen con la calidad del agua porque se registraron valores de *Pseudomonas* que están dentro de los límites máximos permitidos por la normativa de referencia; mientras

que en el tercer muestreo el T4 disminuyo en un 13.5% la concentración de *Pseudomona* con respecto al T1, sin embargo en los dos tratamientos los valores registrados sobrepasan los límites máximos permitidos por la normativa de referencia. Es de hacer notar que en el tercer muestreo en los dos tratamientos se registraron los valores más altos en toda la investigación.

En el primer muestreo los T2 y T3, al igual que en los T1 y T4 no registraron carga de *Pseudomona* spp en el agua y esto se debe a la baja carga de materia orgánica. En el segundo muestreo el T2 cumple con la calidad del agua porque se registró un valor de *Pseudomonas* que está dentro del límite máximo permitido por las normativas referenciadas, por otra parte el T3 aumento con respecto a la normativa en 67.74%, para el tercer muestreo se mantiene que el T2 se encuentra por debajo del valor máximo normado, mientras que el T3 disminuye su concentración con respecto al muestreo anterior, pero aun así se encuentra 34.79% más elevado que el valor máximo normado. Cabe mencionar que el segundo muestreo registra las concentraciones más altas de *Pseudomonas* en ambos estanques.

4.20.2. Muestreo de Salida.

Al igual que en la compuerta de entrada los muestreos 1 y 4 no se registra la presencia de *Pseudomonas*, debido a la baja carga de materia orgánica, en el segundo muestreo entre los T1 y T4, la carga de *Pseudomonas* se mantiene por debajo de valor máximo de la normativa referida, observando que la concentración con respecto al muestreo de entrada el T1 aumento en 73.33% y el T4 disminuyo en 25% con respecto al muestreo de entrada. Para el tercer muestreo el T4 no presenta carga de *Pseudomonas*, mientras que el T1 presenta un aumento de 80% con respecto al valor máximo de la normativa referenciada, cabe mencionar que es la concentración más alta registrada por el T1 en el muestreo de salida.

Para el muestreo 1 de los T2 y T3 al igual que en el muestreo de entrada no se registra concentración de *Pseudomona*, por la baja carga de materia orgánica, para el segundo muestreo ambos estanque se encuentran por debajo del valor máximo de la normativa referida, siendo el T3 el que presenta la mayor concentración de *Pseudomonas* con 20% más que el T2, para el tercer muestreo el T2 no reporta presencia de *Pseudomonas*, mientras el T3 registra 80% más concentración de *Pseudomonas* con respecto al valor máximo de la normativa referida, para el curto muestreo la tendencia del muestreo anterior se mantiene, ya que, el T2 no registra *Pseudomonas* y el T3 registra una concentración menor al valor máximo de la normativa referida.

Al comparar los registros de la investigación con lo obtenido por Paredes (2017), se puede observar que existen datos concordantes, ya que, el registro en 3 fases valores de 3×10^2 UFC/ml, 1.8×10^3 UFC/ml y 1.1×10^3 UFC/ml, aunque la investigación registro 60% de las concentraciones por debajo del valor máximo permitido por la normativa. Mientras que la investigación discrepa completamente de lo encontrado por Parrado *et al* 2014, que en su investigación el recuento de *Pseudomonas* en agua se encuentra por debajo de las 10 UFC/ml.

4.21. Conteo de *Vibrios* spp.

4.21.1. Muestreo compuerta de entrada.

En primer muestreo de entre los T1 y T4 registran concentraciones de la carga de total de *Vibrios* con valores que por debajo del valor máximo permitido por la normativa referida, observando que para este primer muestreo la concentración en ambos estanques es igual; para el segundo muestreo la tendencia se mantiene y ambos estanques presentan concentraciones por debajo al valor máximo permitido por la normativa referida, cabe recalcar que el T4 presento una disminución siendo este 84.35% menor al valor presentado por el T1; en el tercer muestreo los estanque se mantiene por debajo del valor máximo permitido por la normativa, observando que el T4 presenta un aumento de 91.4% por lo registrado en el T1; para el cuarto muestreo las concentraciones de la carga total de *Vibrios* se mantiene por debajo del valor máximo permitido por la normativa referida, siendo el T1 el que presenta la mayor concentración de ambos estanques.

El primer muestreo entre los T2 y T3 registraron valores por debajo de del valor máximo permitido por la normativa, siendo el T2, 50% mayor que el T3; para el segundo muestreo ambos estanques sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa, siendo el estanque 12, 24.62% mayor a comparado por lo registrado en el T2; en el tercer muestreo el T2 presenta una disminución en la carga de *Vibrios* totales, registrando un valor por debajo del valor máximo permitido por la normativa, mientras que el T3 registra un 54.54% de la carga de *Vibrios* totales por encima del valor máximo permitido por la normativa; en el cuarto muestreo ambos estanque presentan un disminución de la carga de bacterias tipo *vibrios* siendo estas inferiores al valor máximo permitido por la normativa referida.

4.21.2. Muestreo de la compuerta de salida.

El primer muestreo entre los T1 y T4 presenta valores que sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa referida, siendo el T1 mayor en 3.78% comparado por lo registrado en el T4; para el segundo muestreo ambos estanques registran concentraciones que sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa, siendo las concentraciones de la carga de Vibrios totales en ambos estanque iguales; para el tercer muestreo el T1 presenta una disminución en la concentración de la carga de vibrios totales, siendo están inferior al valor máximo permitido por la normativa referida, mientras que el T4 registra 80% más concentración de la carga de vibrios con respecto al valor máximo permitido por la normativa referida; el cuarto muestreo registra una disminución en ambos estanques siendo estos inferiores al valor máximo permitido por la normativa referida.

El primer muestreo entre los T2 y T3 presenta que ambos estanques sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa referida, siendo el T2 mayor en 24.62% a comparación de lo registrado por el T3; para el segundo muestreo el T2 presenta una disminución de 51.63% con respecto a lo presentado por el T3, cabe recalcar que ambos estanques sobrepasan el valor máximo permitido por la normativa referida; para el tercer muestreo la tendencia del T2 se mantiene, registrando un concentración de vibrios inferior al valor máximo permitido por la normativa referida, mientras que el T3 es 80% mayor con respecto al valor máximo permitido por la normativa referida; en el cuarto muestreo ambos estanque registran concentraciones inferiores al valor máximo permitido por la normativa referida, siendo el T2 mayor que el T3 en 21.74%.

4.22. Discusión de resultados de los muestreos de *Vibrio spp*, *Pseudomonas spp* y bacterias Heterótrofas para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Los datos de la investigación difieren de lo registrado por Suarez *et al* (2015), ya que ellos presentaron concentraciones de la especie *V. parahaemolyticus* de 1.9×10^6 UFC/ml para el muestreo de entrada del agua y de 6.9×10^6 UFC/ml para el muestreo de salida, concentraciones superiores a lo registrado.

Mientras que Viteri (2015) registro concentraciones de Vibrios indistintas la especie en el rango de 1×10^4 a 3.89×10^5 UFC/ml, la investigación presento concentraciones dentro de este rango con un promedio de 3.47×10^4 NMP/100ml para los T1 y T4 y de 2.45×10^5 NMP/100ml para los T2 y T3.

Por otra parte los aportes de Miranda – Baeza *et al* (2015), registran concentraciones de 5.15×10^3 UFC/ml para Vibrios amarillos (*V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* 10%), la cual es inferior a lo registrado por la investigación; mientras q para Vibrios verdes (*V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*) la concentración es de 5.0×10^1 UFC/ml, cuyo valores es muy inferior a lo registrado por la investigación. Mientras los datos de la cooperativa Carranza en Jiquilisco los cuales fueron registró por Orellana y Ayala 2017, registran concentraciones muy inferiores, que los valores son de 100 y 200 UFC/ml respectivamente.

4.23. Parámetros Productivos.

El cuadro 38, muestra que para el parámetro de porcentaje de sobrevivencia de los camarones la comparación entre T1 – T4 el resultado de la prueba de T Student es significativo, es decir que los que el tratamiento con probiotico comercial está ejerciendo mayor grado en cuanto a la sobrevivencia de los camarones, aunque se puede asumir que tal efecto se debe al área con el que cuenta el estanque donde se aplicó este tratamiento, ya que este es casi el doble que el estanque donde se aplicó las bacterias ácido lácticas nativas, ´por otra parte en la comparación entre T2 – T3 el resultado de la prueba es no significativo, es decir que tanto el probiotico comercial y el probiotico a base de bacterias acido lácticas están produciendo el mismo efecto, este resultado es resaltante ya que los estanque son casi de las mismas dimensiones, aunque el estanque donde se aplicó el probiotico comercial posee más área que el estanque con T3. Para la comparación del parámetro de población en número de individuos podemos observar que en ambos comparativos la prueba de T Student es significativa, es decir que existen diferencias entre los tratamientos, cabe resaltar que este parámetro posee la característica que es afectado por el área de cada uno de los estanque, y puesto que los tratamientos con probiotico comercial son los que presentan los mejores promedios, se asume que es debido a que estos estanques donde se aplicó el tratamiento de probiotico comercial poseen mayor área que los tratamientos con bacterias acido lácticas nativas. Para el parámetro de Biomasa medido en kilogramos la prueba de T Student para la comparación de T1 – T4 el resultado es significativo, observando que el T1 posee mejor promedio, esto se debe a que posee mayor número de individuos en el estanque, mientras que el comparativo de T2 – T3 la prueba de T mostro un resultado no significativo lo que indica que no existen diferencias entre los tratamientos. Para el peso en gramos de los camarones en el comparativo T1 – T4 la prueba de T, mostro un resultado no significativo, es decir que las diferencias en este parámetro son oscilantes aleatorias, mientras que en el comparativo de T2 – T3, la prueba

es significativa mostrando que el mejor promedio lo presenta el T3. (Cuadro-A111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133).

Cuadro 38. Resultados de la prueba t de Student para los parámetros productivos para las combinaciones T1-T4 y T2-T3.

Porcentaje de Supervivencia (%) durante 15 semanas de Estudio.		
Comparación entre estanques	Valor de P	Mayor Promedio
T1 - T4	0.0082	T1= 72.49
T2 - T3	0.7739	T2= 65.66
Población en número de Individuos		
T1 - T4	<0.0001	T1= 1293570.00
T2 - T3	0.0014	T2= 936064.00
Biomasa en kilogramos		
T1 - T4	0.0002	T1= 13636.95
T2 - T3	0.4459	T2= 9646.36
Peso en gramos por individuo		
T1 - T4	0.2058	T4= 11.83
T2 - T3	0.0044	T3= 12.88
Incremento de peso en gramos		
T1 - T4	0.9756	T1= 1.67
T2 - T3	0.7964	T2= 1.77
Factor de Conversión Alimenticia		
T1 - T4	0.0067	T4= 1.20
T2 - T3	0.1218	T2= 1.17

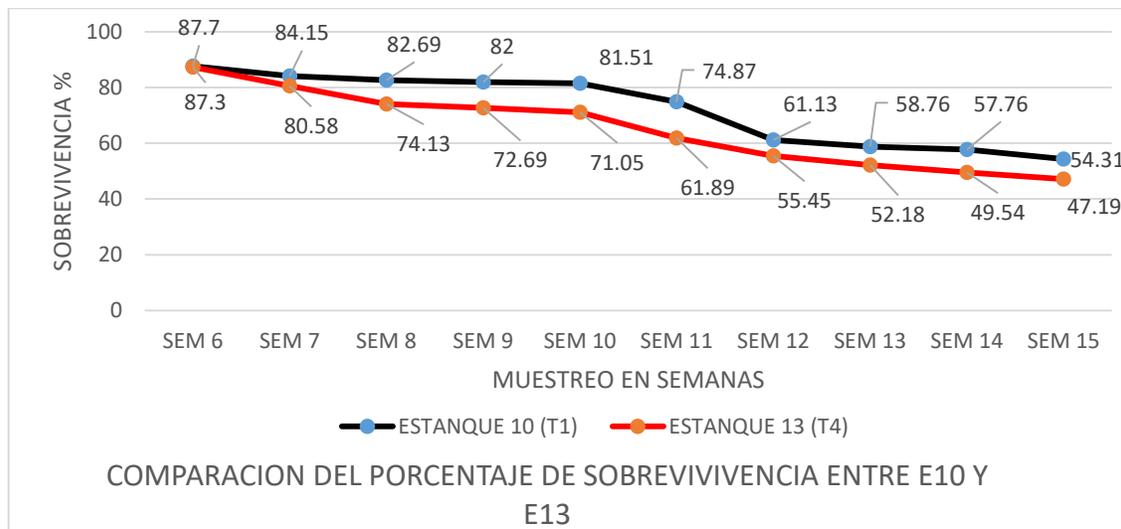


Figura 24. Comparación del Porcentaje de Supervivencia entre T1 y T4.

Como muestra la figura 24 el comportamiento de la supervivencia al inicio del registro es similar entre los tratamientos con una diferencia de 0.4%, pero a partir de la semana 7 se observa que el porcentaje de supervivencia del T1, es mayor oscilando entre un 4 a 10%, a comparación del T4. (Cuadro-A112).

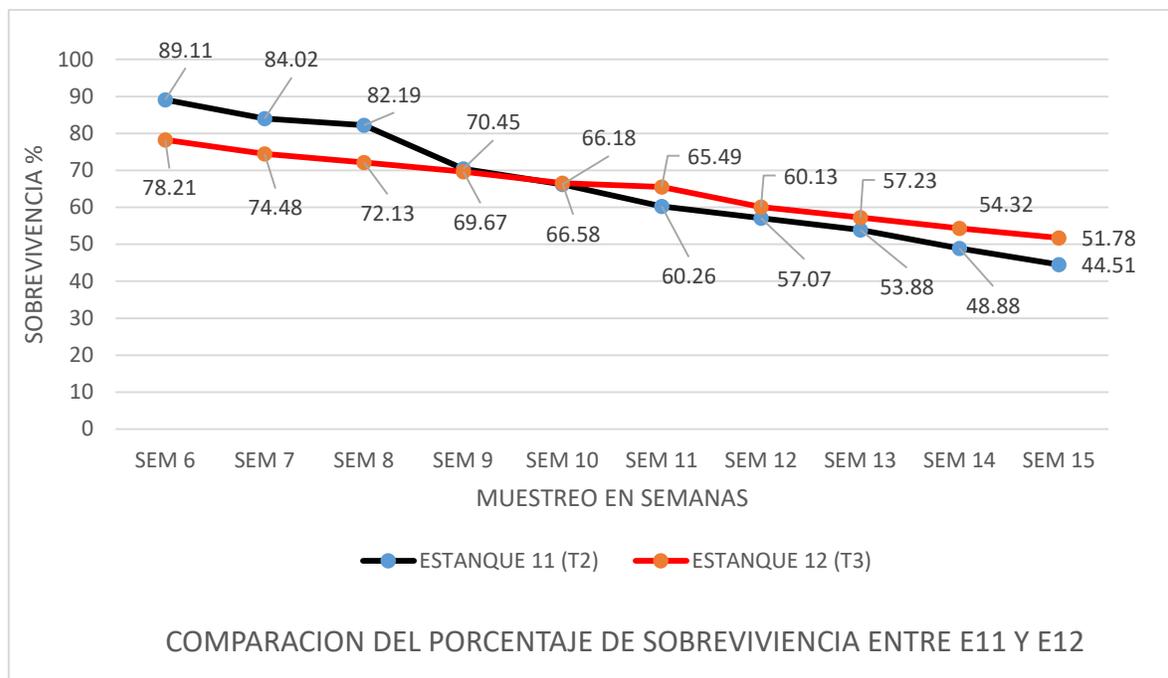


Figura 25. Comparación del porcentaje de Sobrevivencia para los T2 y T3.

Como muestra la figura 25 el comportamiento de la sobrevivencia entre los T2 y T3 desde la semana 6 hasta la semana 8, mostraba una amplia diferencia a favor del T2, con un valor promedio de 10%, ya para la semanas 9 y 10 los registros del porcentaje de sobrevivencia se comportaron de similar manera con valores oscilando entre 0.4 a 0.8 %, mostrando un aumento del porcentaje de sobrevivencia para el T3 siendo este ligeramente superior al presentado por el T2 desde la semana 11 a la semana 15. (Cuadro-A114).

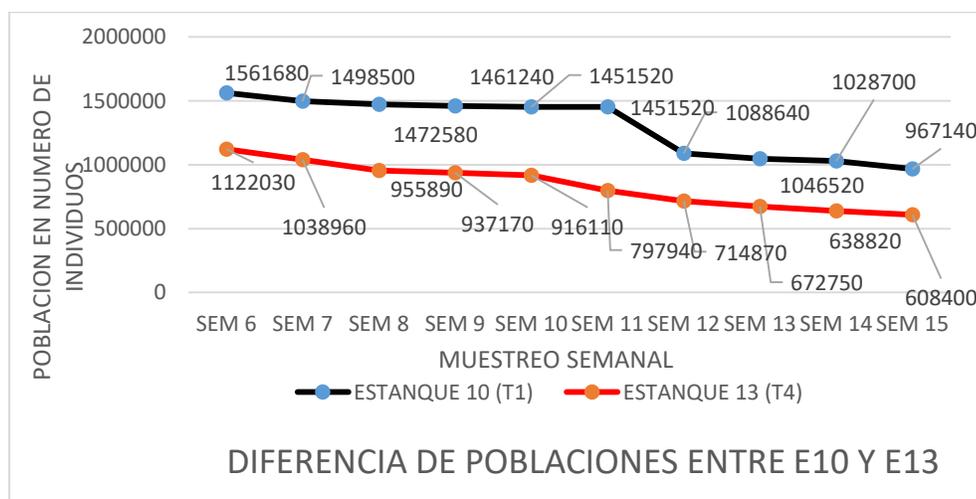


Figura 26. Comparación de la densidad poblacional (número de individuos) para los T1 y T4.

Como muestra la figura 26 la densidad poblacional se comenzó a medir a partir de la semana 6, y ya se presentaban diferencias, se puede observar que el T1, se mantuvo constante con leves diferencias hasta la semana 11, para la T4 se presenta una disminución de 362,880.0 individuos, a partir de esa semana se registró un promedio de disminución de 40,500 individuos hasta la semana 15. Para el T4 se una relación inversamente proporcional al tiempo más constante disminuyendo en rango de 20,000 a 100,000 individuos. (Cuadro-A116).

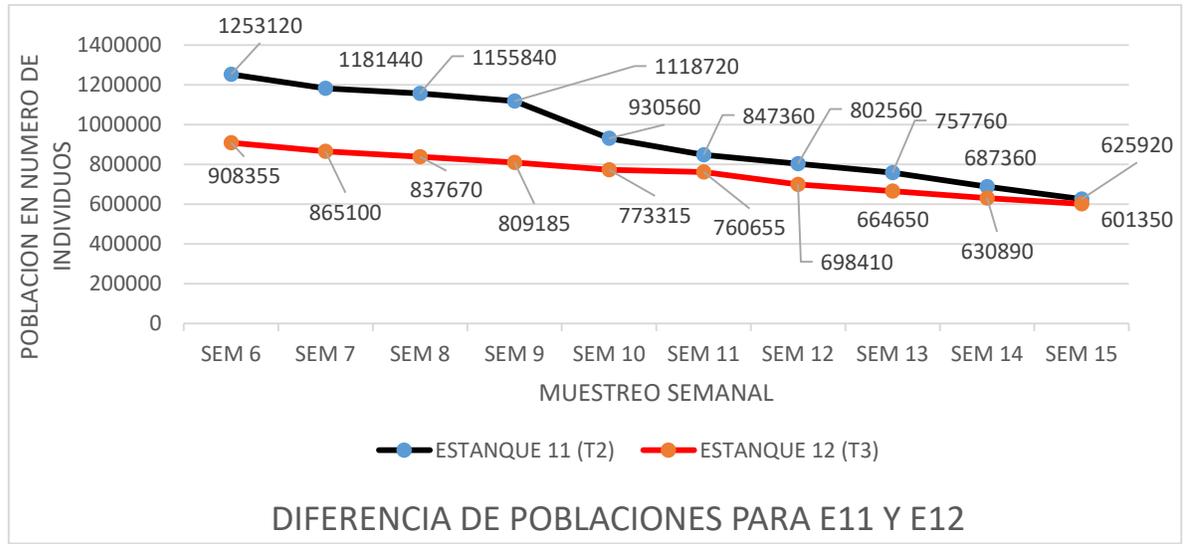


Figura 27. Comparación de la densidad poblacional (número de individuos) para los T2 y T3.

Como muestra la figura 27, el comportamiento de las densidades poblacionales para el T2 y T3 muestran diferencias al inicio del registro, es decir la semana 6, manteniéndose de esa manera hasta la semana 9, indicando que a partir de la semana 10 hasta la semana 14 las densidades presentaban ligeras diferencias, y a la semana 15 los dos tratamientos presentan un similar comportamiento. (Cuadro-A118).

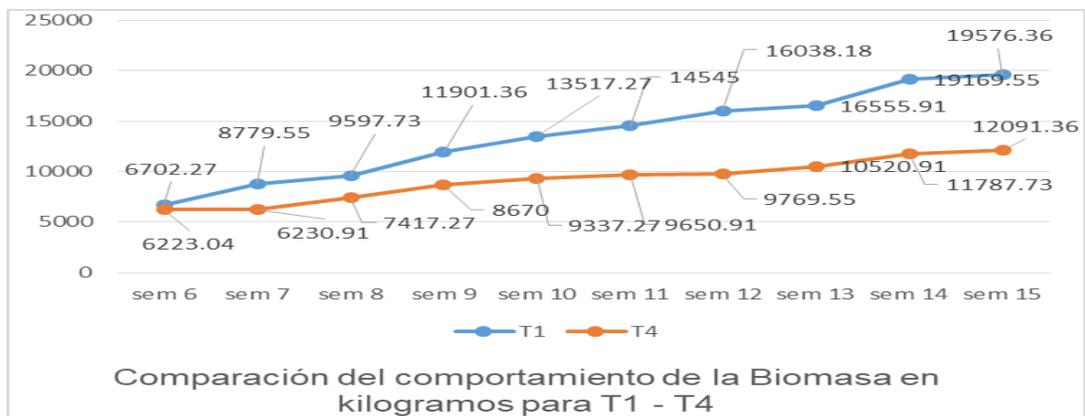


Figura 28. Comportamiento de la Biomasa en Kilogramos para los T1 y T4.

Como muestra la figura 28 los tratamientos solo al inicio del registro se comportan de manera similar, y a partir de la semana 7, se registra una amplia diferencia entre la biomasa manteniéndose de esa manera hasta el final, observando que para la semana 15 el T1 registra un valor de 19,576.36 kg contra los 12,091.36kg del T4, una diferencia de 7,485 kg, esta diferencia puede deberse a que el T1 posee mayor área que el T4. (Cuadro-A120).

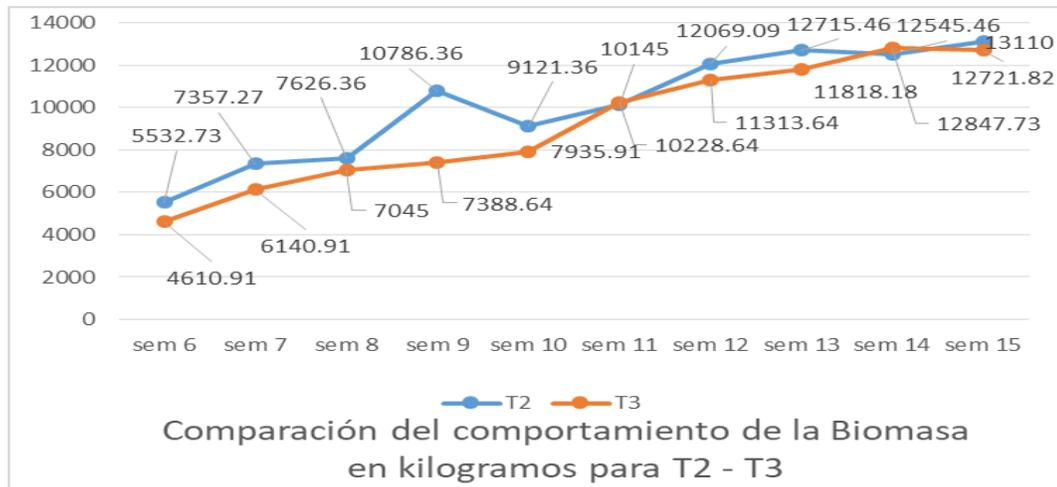


Figura 29. Comportamiento de la Biomasa en kilogramos para los T2 y T3.

Como muestra la figura 29. El comportamiento de la biomasa para el T2, siempre se mantuvo arriba del registro del T3, no obstante en la semana 11 el T2 y T3 poseen similares registros en kg, y la semana 14 el T3 posee mayor rendimiento con 12,847.72 kg. (Cuadro-A122).

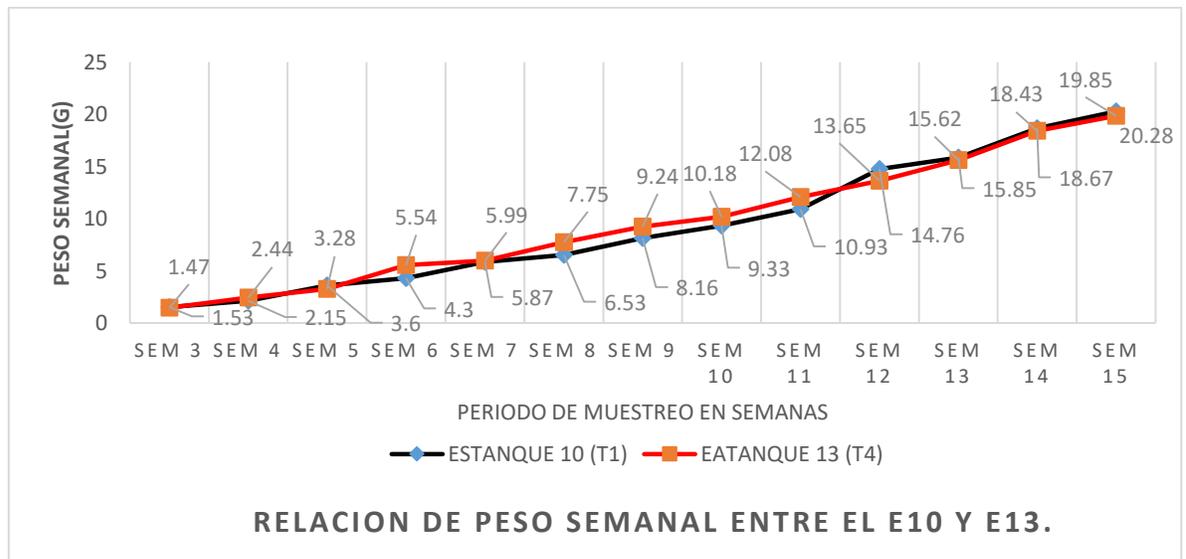


Figura 30. Comparación del peso en gramos entre los T1 y T4.

Como muestra la figura 30, el comportamiento de los pesos de los camarones es similar, en la mayor parte del experimento ubicando algunas pequeñas diferencias a favor del T4, ya que, para la semana 6 presenta 1.24 gr más que el T1, manteniendo un aumento desde la semana 8 a la semana 11, mientras que la en la semana 12 el T1 posee el mayor peso con 1.11 gr más que el T4, y de la semana 13 a la semana 15 se observa que los pesos son relativamente iguales. (Cuadro-A124).

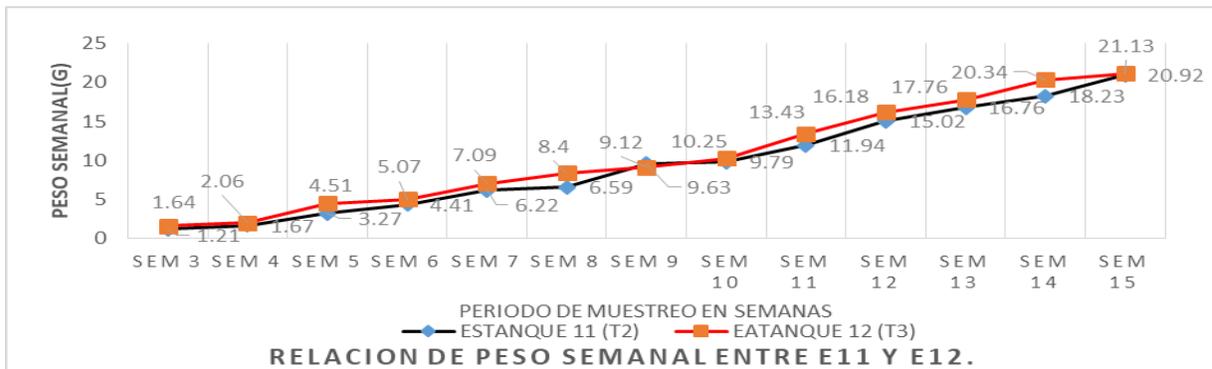


Figura 31. Comportamiento del peso en gramos para los T2 y T3.

Como muestra la figura 31 se observa que el T3 desde el inicio de la medición de en la semana 3 estuvo ligeramente arriba del T2, presentando una ligera disminución en la semana 9 donde el T2 registro mayor peso con 0.51 grs más que el T3, pero a partir de la semana 11 se registra una diferencia promedio de 1.194 grs más para el T3 a comparación del T2. (Cuadro-A126).

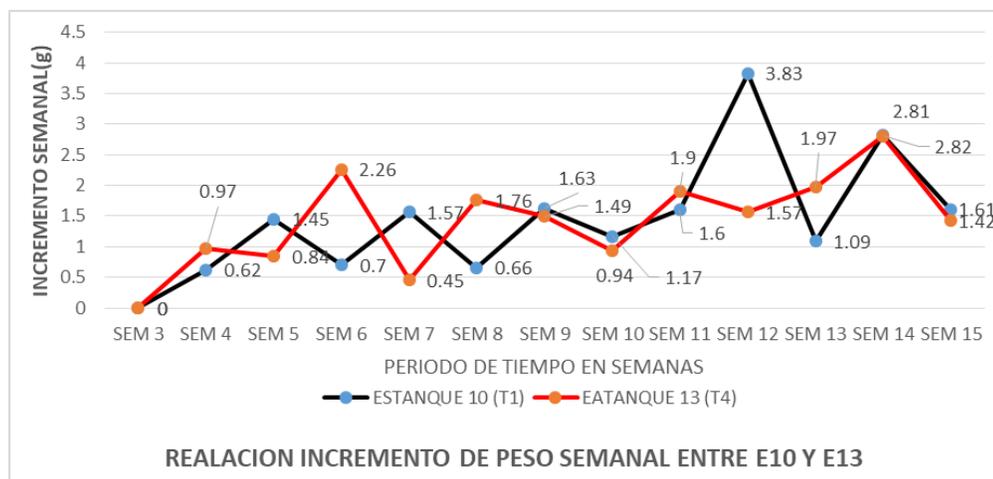


Figura 32. Incremento de peso (grs) semanal para los T1 y T4.

Como muestra la figura 32 el comportamiento de los incrementos de peso en gramos para los T1 y T4 es de manera fluctuante, observándose que el T4 se oscilo arriba del T4 durante las

semanas 4, 6, 8, 11, 13 y 14 con un rango de 0.01 a 1.56 grs , aunque se observa que para las semanas 5, 7, 8, 9, 10 y 15 el T1 poseen un ligero aumento del incremento de pesos que oscila entre 0.19 a 1.12 grs; alcanzando el máximo incremento en la semana 12 con un valor de 3.83 grs, contra el máximo valor del T4 en la semana 6 de 2.26 grs. (Cuadro-A128).

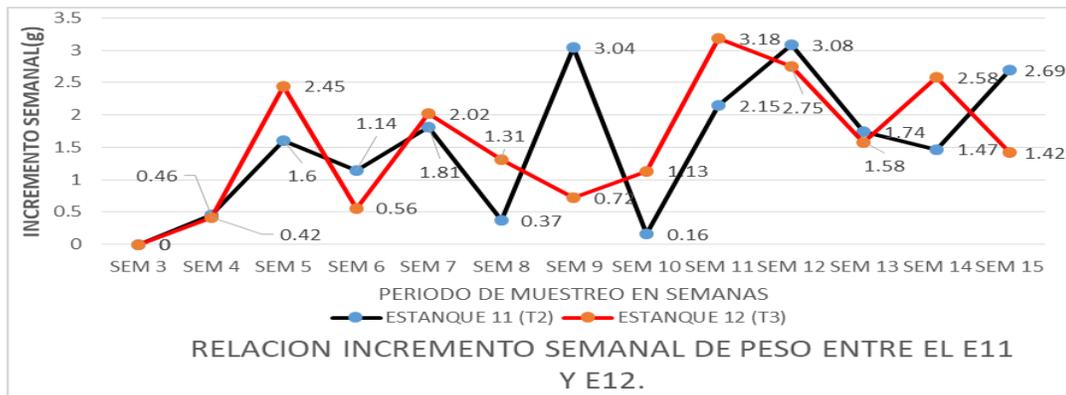


Figura 33. Incremento de peso (grs) semanal para los tratamientos 2 y 3.

Como muestra la figura 33 los incrementos de los pesos se comportan de manera fluctuante, con un comportamiento heterogéneo para los T2 y T3; registrando los mayores incrementos para el T3 en la semana 11 con 3.18 grs y la semana 5 con 2.45 grs, registrando el menor incremento en la semana 4 con 0.42 grs, seguida de la semana 6 con un valor de 0.56 grs, mostrando una disminución parabólica entre las semanas 7 a la 10 con un rango de 1.30 grs; mientras que el T2 muestra su mayor incremento en la semana 12 con un valor de 3.08 grs, seguido de la semana 9 con un valor de 3.04 grs, registrando el menor incremento en la semana 10 con un valor de 0.16 grs, seguida de la semana 8 con un valor de 0.37 grs. (Cuadro-A138).

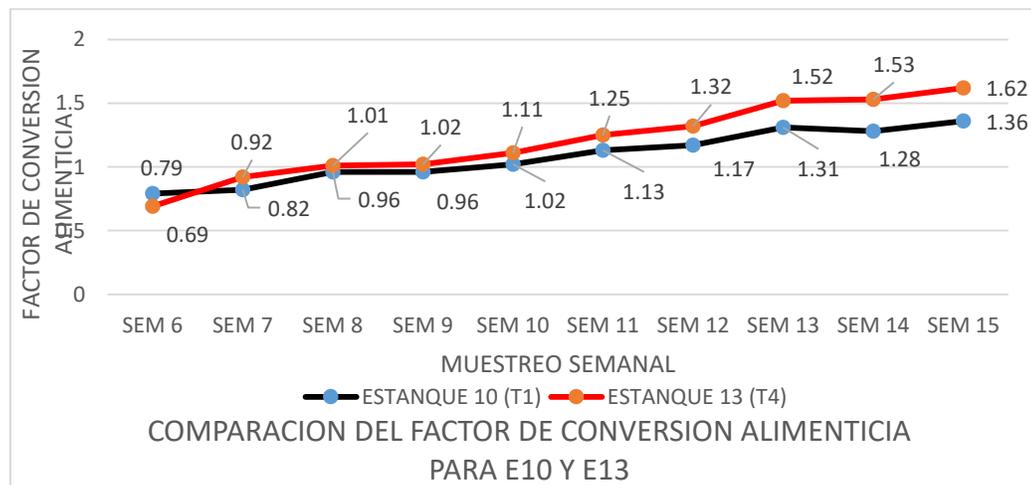


Figura 34. Comportamiento del factor de conversión alimenticia para los T1 y T4.

Como muestra la figura 34 el factor de conversión alimenticia al inicio del registro en la semana 6 el T1 era superior en 0.1, aumentando el T4 desde la semana 7 hasta el final de la investigación, registrando similares valores del factor de conversión alimenticia desde la semana 6 a la semana 10, a partir de la semana 11 los valores van tomando diferencias de 0.12 a 0.29 unidades a favor del T4. (Cuadro-A132).

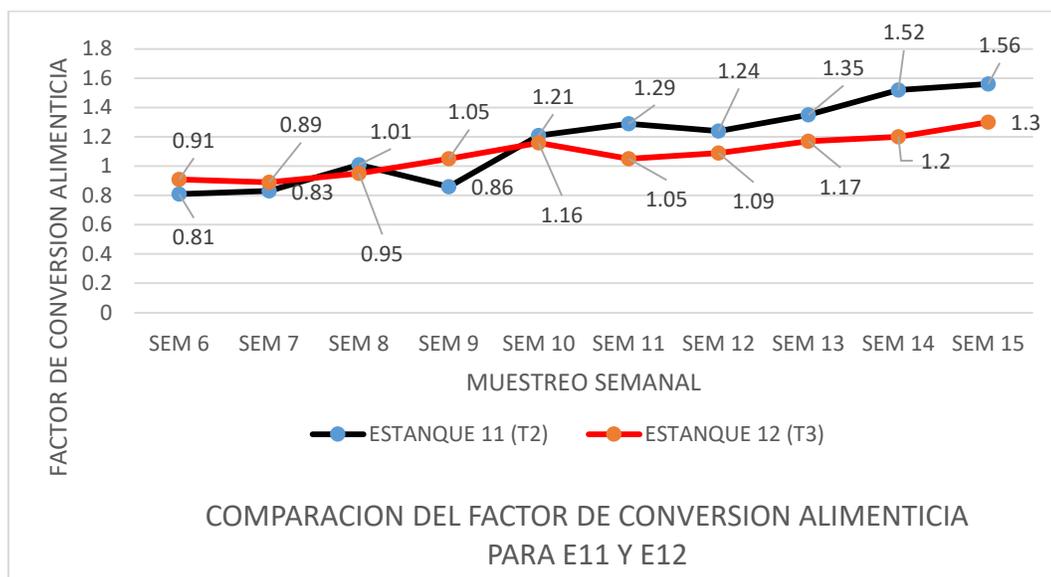


Figura 35. Comparación del factor de conversión alimenticia para los T2 y T3.

La figura 35 muestra el comportamiento del factor de conversión alimenticia, observando un comportamiento homogéneo para el T3 durante el periodo de la semana 6 a la semana 10, manteniendo registros ligeramente superiores al T2, pero a partir de la semana 11 se registra un aumento de 0.35 unidades del factor de conversión para el T2, registrando valores ligeramente superiores al T3 hasta el final de la investigación en la semana 15 oscilando entre 1.21 a 1.56, contra lo registrado por el T3 con valores de 1.05 a 1.3. (Cuadro-A134).

4.24. Comparación final de parámetros productivos.

El cuadro 39 muestra datos de parámetros productivos comparativos de cada uno de los estanques sometidos a estudio. Para el caso de los T1 y T4 los días de cultivo fueron 122 en total y en rendimiento por hectárea fue mayor para el T1 con una diferencia de +129.55 kilogramos más por hectárea producida así como un peso promedio ligeramente mayor (+1.12

gramo/camarón) y un factor de conversión alimenticio (FCA) menor (-0.14 kg); el único parámetro en que resultó el T4 fue con una mejor sobrevivencia (+1.11%).

Al retomar los datos, cuando se inició el tratamiento con bacterias benéficas (25 de mayo) que correspondió a la semana 8 de cultivo, el T1 tuvo aparentemente una condición más favorable pues la sobrevivencia estimada en ese período fue de 82.69% si se compara con la sobrevivencia de 74.13% del T4; es decir, la situación era mucho más favorable para el estanque control pero en la medida que fue transcurriendo el tiempo y las sucesivas aplicaciones de bacterias ácido lácticas hasta llegar al final del cultivo, la situación pudo revertirse y la sobrevivencia final fue favorable al T4.

El panorama fue diferente en el estudio comparativo del T2 y el T3, haciendo un especial comentario que tuvo 25 días más de cultivo debido a la estrategia de venta que determinó la gerencia de la granja. La diferencia de rendimiento fue mayor en el T3 (+1418.18 kg/ha), una diferencia relevante sumado a una talla promedio mayor (+0.83 g/camarón); la sobrevivencia también fue significativamente favorable para el E 12 (+8.59%) y un FCA menos (-0.18 kg).

De igual forma, retomando los datos, la sobrevivencia aparente que resultó de los muestreos, para la semana 8, que fue cuando se inició el tratamiento con probióticos, el T2 mostraba una mayor sobrevivencia (82.19%) con respecto al T3 (72.13%); la situación se revirtió hasta llegar al final de la cosecha con una sobrevivencia favorable para el T3.

Cuadro 39. Parámetros productivos al final de la cosecha del ciclo I productivo 2017 de los tratamientos realizados en la investigación en la camaronera Las Animas, El Salvador.

TRAT	Área (m ²)	Días de cultivo	Diferencia en días	Camarón producido (Kg)	Rendimiento por hectárea (Kg)	Peso promedio final (g)	Sobrevivencia final (%)	Cantidad total de concentrado Proporcionado en Kg	FCA
T1	32,377	122	0	17,962.72	5,544.09	22.63	44.57	32,356.82	1.8
T4	23,442	122	0	12,670.00	5,414.55	21.51	45.68	26,659.09	2.1
T2	25,567	118		13,794.09	5,388.18	25.17	38.97	32,363.64	2.4
T3	21,116	143	+25	14,361.36	6,806.36	26.00	47.56	28,722.73	2.0

4.25. Discusión de resultados para los parámetros productivos.

Los promedios de sobrevivencia registrados por la investigación son 72.49% para T1; 65.66% para T2; 65% para T3 y 61.99% para T4, los cuales concuerdan para los T2, T3, T4 por lo

registrado por Anaya (2005), con valores de 64.92%, 65.19% y 67.18% para los estanques que utilizo en su estudio, Mientras que los autores que fueron citados por Anaya como Bratvold y Browdy (2001), registran 81.7%, Davis y Arnold (1998) registran 78.8%, Raid y Arnold (1992), registran 82%, estos autores utilizaron un promedio de 40 lavar/m² y Barón *et al* (2004), registran 4.9%, con un sistema semi-intensivo, mientras que Arzola *et al* (2013), registro en dos estanques valores de 94.4% y 99.8%, estos autores coinciden que a mayor densidad de siembra pueden encontrarse diferencias en la sobrevivencia. Al mismo tiempo Manzo, H. (2000), registra una 95% de sobrevivencia. El T1 posee el mayor porcentaje de sobrevivencia ya que posee la mayor área entre los estanques de estudio, ya que la densidad de siembra para los cuatros estanques es de 55 postlarva/m².

Los registros de población promedio por estanque indican que se encuentran en una cantidad por estanque de 1, 293, 570 individuos para el T1; 936, 064 individuos para el T2; 754, 958 individuos para el T3 y 840, 294 individuos para T4; obteniendo al final de muestreo valores de 967,140 individuos para T1; 625,920 individuos para T2; 601, 350 individuos para T3 y 608, 840 individuos para T4, ya que, los diversos autores relacionan el número de individuos por estanque con el porcentaje de sobrevivencia se puede afirmar que la investigación se encuentra dentro de los parámetros, puesto que INAPESCA (2007), menciona en su artículo la población se comportó de 300, 000 individuos al inicio de la investigación y disminuyo a 144, 000 representando esto el 48% de sobrevivencia, generando una comparación similar con los T2 y T4 con 44.51% y 47.19% respectivamente, mientras que Juárez *et al* (2013), reporta un valor de 287, 239 individuos al final de 90 días de estudio reportando un 87% de sobrevivencia, cabe mencionar que este parámetro depende del porcentaje de sobrevivencia de los camarones, se puede asumir que el T1 presentó el mayor valor de individuos/ estanque puesto que posee la mayor área.

La investigación considera la biomasa medida en quintales totales por estanque a razón de realizar comparaciones otros autores se realiza el proceso conversión de esta unidad a kg/ha, para lo cual se obtuvieron los siguientes datos: 6, 046 kg/ha para T1; 5, 129.35 kg/ha para T2; 6, 015.43 kg/ha para T3 y 5, 245.02 kg/ha para T4; con una densidad de siembra de 55 larvas/m² para todos los estanques; este dato contrasta por lo presentado por Muñoz (2009), con valores de 1, 600 kg/ha para una densidad de siembra de 30 larvas/m² y de 1, 163.63 kg/m² para una densidad de siembra de 15 larvas/m², estos valores se encuentran abajo por lo registrado por la investigación; mientras que Membreño *et al* (2014), bajo un sistema de 25 larvas/m², registro para sus tratamientos en estudio que consistían en una probiotico comercial

y la adición de un concentrado comercial con (18 y 25% de proteína cruda) una biomasa de 2, 608.39 kg/ha y 2, 371.26 kg/ha respectivamente, al mismo tiempo Aragón – Noriega, *et al* (2000) reporta para los estanques en estudio en ciclo de verano un rango de 1, 246 a 2, 497 kg/ha y para ciclo de otoño un rango de 1, 453 a 2, 122 kg/ha. Mientras que INNAPESCA (2007), menciona un promedio de 647.5 kg/ha para todos sus estanque, por otra parte Anaya (2005), registro para los estanques en estudio valores de 300, 154 y 150 kg/ha en el cual utilizo un sistema de 120 larvas por metro cuadrado. Estos resultados están por debajo de lo registrado por la investigación.

Los promedios registrados para el peso de los camarones (grs) por tratamiento es de 11.47 g para el T1; 11.95 g para T2; 12.88 g para T3 y de 11.83 g para T4, obteniendo el valor de 20.28 g para T1; 20.92 g para T2; 21.13 g para T3 y de 19.85 g para E13, siendo este el valor real al final del muestreo. Estos datos contrastan con los propuesto por Anaya (2005), con promedios de 8.91, 9.10 y 8.44 gramos para sus tratamientos, valores que se encuentran por debajo de los registrados por la investigación, mientras que Lara-Espinoza *et al* (2015), registro un promedio de 27.56 gr, oscilando los pesos finales por individuo entre 24.5 a 30 grs, registros superiores a lo que registra la investigación. Por otra parte los registros que observó Muñoz (2009), en cuanto a sus tratamientos que consistían en dos densidades de siembra por metro cuadrado son 8.0 y 7.8 grs para una densidad de 30 larvas por metro cuadrado y de 11.26 y 11.32 grs para densidad de 15 larvas por metro cuadrado, siendo este último el que se comporta de manera similar con lo registrado por la investigación. Mientras que Aragón-Noriega *et al* (2000), observó en el periodo de verano una oscilación de 16.05 a 20.79 grs, por individuo.

Los tratamientos registraron promedios de incremento de peso por semana de 1.67 gr con oscilación de 0 a 3.83 gr para el T1; 1.77 gr con oscilación de 0 a 3.08 gr para T2; 1.66 gr con oscilación de 0 a 3.18 para T3 y 1.66 gr con oscilación de 0 a 2.81 para T4; registros superiores a lo observado por Aragón-Noriega *et al* (2000), con una oscilación de 0.72 a 1.21 grs de incremento de peso y por lo observado por INAPESCA (2007), con un rango de 0.004 a 2.6 gr. Mientras que Muñoz (2009), para sus tratamientos registro rangos de 0.54 a 1.32 grs para siembra de 30 larvas por metro cuadrado y de 0.66 a 2.19 grs.

Los promedios del factor de conversión alimenticia por tratamiento son 1.08 para T1; 1.17 para T2; 1.08 para T3 y de 1.2 para T4; datos similares a lo observado por Membreño *et al* (2014), con un valor de 1.27 de FCA, mientras que Manzo (2000), para sus tratamientos registro 1.75 para 8 larvas/m², 1.70 para 20 larvas/m², 1.4 para 30 larvas/m² y de 1.2 para 40 larvas/m², este

último valor es el que más se asemeja a los datos de la investigación tanto en el valor de FCA como a la densidad de siembra. Mientras que Aragón – Noriega *et al* (2000), registra para el ciclo productivo de verano un oscilación de 1.9 a 2.4 del FCA; mientras NICOVITA (1997), propone que para camarones con talla mayor a 10 gramos el rango óptimo de 1 a 1.3 de FCA; mientras Jiménez y Guerra (2011), un rango para los 23 estanques de su estudio de 1.29 a 1.89 FCA.

4.26. Análisis Económico.

El cuadro 40 muestra el costo y los beneficios de campo que se consideraron para la investigación por tratamiento, generando los datos siguientes.

Cuadro 40. Costos por tratamientos en los estanques evaluados en la investigación.

Presupuesto	Estanque 10 (T1)	Estanque 11 (T2)	Estanque 12 (T3)	Estanque 13 (T4)
Camarón producido(Kg)	17,962.72	13,794.09	14,361.36	12,670.00
BENEFICIO BRUTO DE CAMPO	\$103,537.16	\$85,275.07	\$86,886.25	\$69,127.52
COSTOS QUE VARIAN				
EPICIN G2	\$27,240.00	\$21,720.00		
EPICIN PST	\$769.11	\$769.11	\$769.11	\$769.11
NUPRO®	\$36.53	\$36.53	\$456.92	\$456.92
FOSFATO DI BASICO	\$1.65	\$1.65	\$55.00	\$46.09
AZÚCAR	\$23.21	\$23.21	\$284.99	\$284.99
TINACOS	\$384.00	\$384.00	\$528.00	\$528.00
AGUA DESTILADA			\$18.65	\$18.65
CALDO RMS			\$197.75	\$197.75
SAL DE ACUARIO			\$68.75	\$68.75
PEPTONA BUFERADA			\$13.50	\$13.50
SULFATO DE MAGNECIO			\$3.28	\$3.28
CLORO			\$3.05	\$3.05
TIOSULFATO DE SODIO			\$11.91	\$11.91
HARINA DE SOYA			\$158.90	\$158.90
GARRAFONES			\$46.80	\$45.80
GUACALES GRANDES			\$39.00	\$39.00
OLLA DE PRESIÓN			\$37.20	\$37.20
KIT PROBADOR DE AGUA			\$3.90	\$3.90
ALCOHOL			\$88.14	\$88.14
AGITADOR DE VIDRIO			\$6.00	\$6.00
CRITALERIA			\$512.24	\$512.24
ESPATULAS, COLADORES EMBUDOS Y OTROS			\$265.30	\$265.30
BOLSAS, CUCHARAS Y GUANTES			\$53.06	\$53.06
BOMBA DE OXIGENO COMPLETA			\$39.24	\$39.24
CILINDRO DE OXIGENO Y RECARGA			\$114.30	\$114.30
SET CAJAS PETRI (500 UNIDADES)			\$93.85	\$93.85
TARJETAS TOMA DE MUESTRA			\$45.20	\$45.20
HIELERA Y BOTELLAS DE HIELO			\$107.60	\$107.60
OBTENICION DE BACTERIAS NATIVAS (LABORATORIO)			\$50.00	\$50.00
Preparación de los estanques	\$ 601.28	\$ 434.26	\$ 475.08	\$ 391.57
Costo de la Larva	\$ 8,048.92	\$ 5,827.68	\$ 6,355.96	\$ 5,249.44
Alimentación (Quintales de concentrado)	\$32,901.71	\$27,108.03	\$32,908.64	\$29,206.42
Antibiótico (OxiBlen®)	\$ 1,563.56	\$ 1,129.24	\$ 1,235.40	\$ 1,018.24
Combustible utilizado	\$ 9,023.82	\$ 6,517.20	\$ 7,129.93	\$ 5,876.62
Mantenimientos de maquinarias, equipos y vehículos	\$ 4,699.40	\$ 3,394.00	\$ 3,713.11	\$ 2,960.42
Mantenimiento de la infraestructura	\$ 2,459.19	\$ 1,776.09	\$ 1,943.06	\$ 1,701.51
Equipos de laboratorio y oficina	\$ 472.26	\$ 341.08	\$ 373.15	\$ 307.55
Salarios, comisiones, vacaciones y Aguinaldos	\$ 4,220.69	\$ 3,334.87	\$ 2,748.66	\$ 3,048.28
TOTAL DE LOS COSTOS QUE VARIAN	\$92,445.33	\$72,796.95	\$60,954.63	\$53,821.78
RELACIÓN BENEFICIO COSTO				
GANANCIA O INGRESOS ADICIONALES	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00

DISMINUCIÓN DE COSTOS	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
TOTAL DE INGRESOS ADICIONALES	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
COSTOS ADICIONALES				
COSTOS ADICIONALES (PRUEBAS DE LABORATORIO PARA CALIDAD DE AGUA)	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00
DISMINUCIÓN DE LOS INGRESOS	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
TOTAL DE LOS COSTOS ADICIONALES	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00
TOTAL DE BENEFICIO DE CAMPO - INGRESOS ADICIONALES	\$103,537.16	\$85,275.07	\$86,886.25	\$69,127.52
TOTAL COSTOS QUE VARIAN - COSTOS ADICIONALES	\$94,105.33	\$74,456.95	\$62,614.63	\$55,481.78
BENEFICIO NETO	\$9,431.83	\$10,818.12	\$24,271.62	\$13,645.74

De acuerdo a la información del cuadro anterior los costos que generan los tratamientos, se denota que el T1 genera \$94, 105.33 de gasto, siendo este el mayor valor, y un valor de venta por kilogramo de \$5.764, generando \$103, 537.16; para el T2 el valor de gasto de \$74, 456.95 y un valor de venta kilogramo de \$6.182, generando \$85, 275.07; el T3 genera un costo de \$62, 614.63, con un valor de venta por kilogramo de \$6.05, generando \$86, 886.25 y el T4 mostro un gasto de \$55, 481.78, un valor de venta por kilogramo de \$5.456, generando \$69, 127.52.

4.26.1.1. Análisis de Dominancia.

T1= \$9, 431.83
T4= \$13, 645.74 } \$4, 213.91 a favor de T4

T2= \$10, 818.12
T3= \$24, 271.62 } \$13, 453.50 a favor de T3

Como muestra el análisis de dominancia entre T1 y T4 la mejor rentabilidad se muestra a favor de T4 con \$4, 213.91 más que el T1; mientras para los T2 y T3 muestra una rentabilidad a favor del T3 con \$13, 453.50 más que el T2.

4.26.2. Relación Beneficio – Costo.

Cuadro 41. Relación Beneficio-Costo.

TRATAMIENTOS	Costo de los tratamientos	Beneficio de campo	Beneficio costo
Estanque 10 (T1)	\$94,105.33	\$103,537.16	1.10
Estanque 11 (T2)	\$74,456.95	\$85,275.07	1.15
Estanque 12 (T3)	\$62,614.63	\$86,886.28	1.39
Estanque 13 (T4)	\$55,481.78	\$69,127.52	1.25

Fuente Propia 2017.

El cuadro 41 muestra que la relación de retorno con respecto al costo y precio de venta, denotando que por cada dólar invertido para el T1 se retorna \$1.10, para el T2 por cada dólar invertido habrá un retorno \$1.1, para el T3 por cada dólar invertido habrá un retorno de \$1.39 y para el T4 al invertir un dólar retornara \$1.25; mostrando que los tratamientos de *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*, muestran el mayor retorno con respecto a los tratamientos con EPICIN G2.

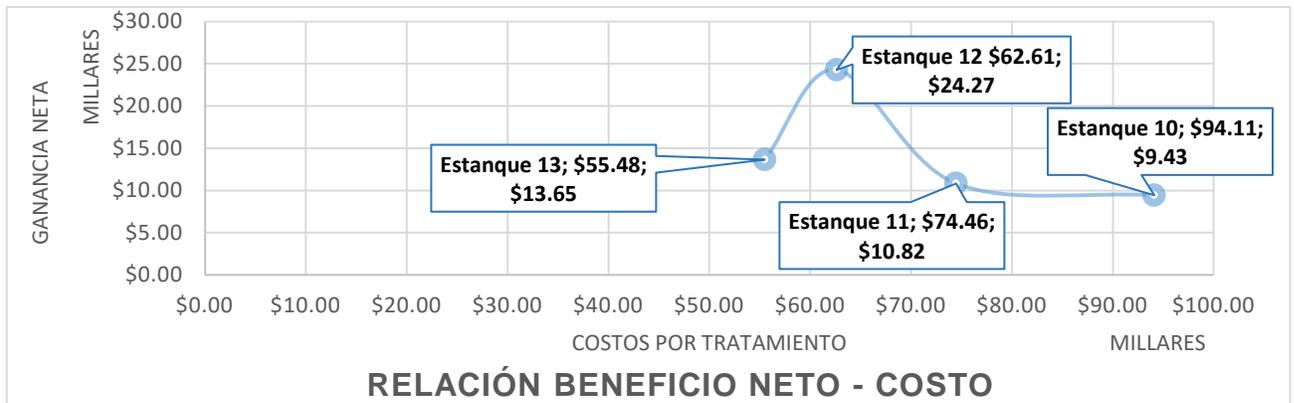


Figura 36. Relación beneficio – costo entre tratamientos.

La figura muestra al T3 con el mayor margen de ganancia y costo medio a comparación de los T1 y T2, se puede observar que el T4 es el segundo mejor tratamiento generando \$13,645.78 de ganancia neta, mientras que el T1 generó un margen de ganancia de \$9,431.83, mostrando un gasto de \$94,105.33 en su elaboración.

5. CONCLUSIONES

El *Lactococcus lactis* y el *Lactobacillus paracasei* aisladas del tubo digestivo de los camarones cultivados en el estanque 3 y estanque 9 están dentro de la lista de bacterias que se pueden utilizar como probióticas en el cultivo de camarones en estanques.

El *Lactococcus lactis* y el *Lactobacillus paracasei* aisladas y caracterizadas con fines probióticas y que fueron incorporadas en la dieta alimenticia de los camarones y en el agua junto con el biorremediador EPICIN PST®, se comportaron como organismos inocuos ya que no colonizaron en forma permanente a la concentración de 10^8 UFC/ml que fue administrada, sino que solamente se mantuvieron vivos a lo largo del tubo digestivo realizando una actividad benéfica, mejorando el sistema inmune, nutricional, metabólico o protector del camarón. Además es importante que su aplicación en el alimento no altero el sabor de este, y no se dio una interacción con las bacterias utilizadas como biorremediador en el agua, y por ende aumento la productividad y mejoro la calidad del agua en donde se cultivan.

El estudio comprendió el análisis del TRIX hecho con muestras tomadas en los meses (abril y mayo) de nula o escasa presencia de lluvias comprendidos en la época seca, así como 2 meses que abarcan parte del período de la época lluviosa (junio y julio). En ambos períodos no existió diferencia significativa de los valores del TRIX, por lo que puede concluirse que no existe variante según la estacionalidad y que el cuerpo de agua del estero de Jaltepeque adyacente a la camaronera Las ánimas está en estado permanente de eutrofización, muy alto en productividad primaria y agua de calidad pobre.

Siendo el ICA un indicador de la calidad del agua en función de los usos básicos que ésta pueda tener; y que mide los cambios de la calidad del agua en tramos particulares de los ríos, o en nuestro caso, a canales dentro del estero a través del tiempo, entonces se puede deducir según los valores del ICA encontrados en las compuertas de entrada, que el agua que recibe la granja proveniente de sus aguas adyacentes es de calidad pobre. Teniendo en cuenta los valores del ICA obtenidos en el agua de la compuerta de salida de los estanques comprendidos en el estudio, las aguas de los efluentes que la granja vierte a los canales adyacentes del estero también se categorizan como aguas pobres, que no tienen alguna diferencia significativa con respecto a la calidad del agua que entra a la misma.

La sobrevivencia de los estanques control y los estanques con tratamiento de bacterias ácido lácticas son similares, aunque el T1 posee 8,935m² más que el T4 la diferencia al final del estudio es de 7.12% de sobrevivencia a favor del T1.

La sobrevivencia de los estanques control y los estanques con tratamiento de bacterias ácido lácticas son similares, aunque el T2 posee 4,451m² más que el T3 la diferencia al final del estudio es de 0.66% a favor del T3.

Los tratamientos control y los tratamientos con bacterias ácido lácticas no difieren en el incremento de peso en gramos semanal, esto indica que al utilizar probióticos comerciales y bacterias nativas con potencial probiotico se obtendrán resultados similares.

Al realizar la sustitución de tratamientos con probióticos comerciales (EPICIN G2) por tratamientos con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*) se produce un ahorro de \$50,465.87 en gastos de producción. Al utilizar bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*) se obtiene una ganancia de \$17,667.41, sobre lo generado por los tratamientos control (EPICIN G2).

6. RECOMENDACIONES

A la camaronera “Las Ánimas” que continúe con la aplicación de los probióticos derivados de las bacterias ácido lácticas nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*) y que analice los beneficios que estas constituyen a largo plazo en cuanto a la mejora de la calidad de la producción y medio ambiente.

A los productores hacer el uso de probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas, que incluyan *Lactobacillus paracasei*.

A las Facultades de Química y Farmacia, Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (UES) y el MEGATEC La Unión que continúen con los diferentes tipos de investigación con respecto al uso de microorganismos con potencial probióticos y biorremediadores en los diferentes animales de producción e implementen las técnicas, protocolos y marchas de laboratorio para el uso de las bacterias ácido lácticas nativas en otras zonas productivas de camarón en El Salvador.

Al MEGATEC La Unión y a la camaronera “Las Ánimas” que investigue otras fuentes de proteínas para la replicación de bacterias ácido lácticas nativas para mejorar la eficiencia así como reducir los costos.

A la camaronera “Las Animas” hacer uso del muestreo transepto para la determinación de la población en los estanques, ya que es un método más confiable con respecto a la utilización de una formula y al mismo tiempo llevar registros más detallados para los parámetros físico, químicos, microbiológicos y biológicos de la granja previo a la aplicación de productos probióticos nativos para realizar comparaciones de los factores que afectan al cultivo de camarón.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguillón, C; Tsang, H. 2008. Manual sobre "Reproducción y cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)". Santa Tecla, SV. CENDEPESCA.41.p.
- Anaya, R. 2005. Cultivo del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, (BOONE, 1931), en sistema cerrado a alta densidad. Maestro en Ciencias. Baja California. México. Centro de Investigación Científica y de educación Superior de Ensenada (CICESE). 26-46p.
- APHA (American Public Health Association, US); AWWA (American Water Works Association, US); WPCF (Water Pollution Control Federation, US). 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Conteo de bacterias heterótrofas, Identificación y cuantificación de *Vibrio* sp y *Pseudomonas* sp, fósforo total, nitrógeno total, amonio, nitrato, nitrito, alcalinidad, dureza y sílice. 17 ed. Diorki, Madrid, ES. p. 9-63, 9-64,9-167, 4-187, 4-162,4-140,4-149,4-145,2-38,2-57, 4-204.
- Aquafeed. 2013. El papel de la biorremediación en el manejo de la calidad del agua. La biorremediación en la acuicultura. (En línea).AT. Consultado 6 oct 2014. Disponible en: <http://aquafeed.co/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua/>
- Aragon-Noriega, E; Cordova-Murieta, J; Hernandez, H; Garcia-Juarez, A. 2000. Efecto de la densidad de siembra y la estacionalidad en la producción de camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. Sonora. Revista Ciencias Pecuarias INP. SAGARPA #14. 39-44p.
- Aranda Cirerol, N. 2004. Eutrofización y calidad del agua en una zona costera tropical, tesis Dr. en ciencias del mar. Barcelona. España. Universitat de Barcelona. p. 140-141.
- Araujo Delgado, N. 1999. Uso de Cloramina T para el control de bacterias filamentosas (*Leucothrix mucor*) en post larva de camarón (*Penaeus vannamei*). Ingeniero Agrónomo. Francisco Morazán, Tegucigalpa. Honduras. El Zamorano. iip.
- Ayala Rodríguez, GA. 2008. Grupos funcionales de fitoplancton y estado trófico del sistema lagunar Topolombo- Ohuira- Santa María. Estado trófico. Mag. Sc. en manejo de recursos marinos. La Paz, Baja California, MX. CICIMAR – IPN. p. 18 – 19.
- BALNOVA. 2014. pH en estanques de camarón (En línea). Grupo Nueva Pescanova. Guayaquil. Ecuador. Consultado: 30 de noviembre de 2017. Disponible: <https://www.balnova.com/ph-en-estanques-de-camaron/>
- Barraza-Guardado, R.H; Martínez-Córdova, L.R; Enríquez-Ocaña, L.F; Martínez-Porchas, M; Miranda-Baeza, A; Porchas-Cornejo, M.A. 2014. Effect of shrimp farm effluent on water and sediment quality parameters off the coast of Sonora, Mexico. Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California Ensenada, México. vol. 40, núm. 4, 2014, pp. 221-235
- Bonilla, G. 1986. Estadística. Elementos de estadística descriptiva y probabilidades. UCA editores. Antiguo Cuscatlán, SV. 375 p.
- Boyd, CE. 2001. Métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Managua, NI. UCA. p. 8 -29.
- Boyd, C. sf. Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. Alabama. USA. Department of Fisheries an Allied Aquacultores.
- Boyd, C. 2009. Fitoplancton en estanques acuícolas. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 2009-12; 2-5p.
- Boyd, C. SF. Practicas de manejo para reducir el impacto ambiental del cultivo de camarón. Auburn, Alabama. Estados Unidos. Department of Fisheries and Allied Aquaculture. 270-289p.

- Casal, J; Mateu, E. 2003. Tipos de muestreo. Rev. Epidem. Med. Prev.1:3-7.
- Castex, M; Chim, L; Pham, D; Lemaire, P; Wabete, N; Nicolas, JL; Schmidely, P; Mariojouis, C. 2008. Probiotic *P.acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to Vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*. 275:182-193.
- Castillo Duran, J. 2013. Aspectos Biológicos y Ecológicos de Almeja Negra *Chione fluctifraga* (Sowerby, 1853). Doctor en Ciencias. Baja California. México. Centro de Investigación Biológicas del Noroeste (CIB). 42-47p.
- CENDEPESCA (Dirección General de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura, SV). 2015. Datos de producción de camarón en El Salvador. Santa Tecla, SV.s.p.
- Chávez Rigal, J. 2008. Manual probióticos de tilapia y camarones. 1(1): 32 – 3.
- Ching, C. Portal, V. SF. Control de Bacterias vibrios spp en larvas del camarón Marino mediante el uso de agua con Baja Salinidad. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 1-5p.
- Chow Wong, N. 2000. Fitoplancton y productividad primaria en sistema de cultivo extensivo, Tecnificado de camarón del genero *Litopaneus*. Maestro en Ciencias del Ambiente. Nicaragua. Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). 34-60p.
- Contreras, F. 1994. Manual de técnicas hidro-biológicas. Clorofila A. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México D.F., MX. Trillas. p.107 – 108.
- Cuellar-Ángel, Lara, C; Morales, V; De Gracia, A; García Suarez, O. 2010. Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades de camarones. Panamá, PA. OIRSA-OPESCA. p.64.
- Cuellar-Anjel, J. 2013. Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP). Iowa. Estados Unidos. The Center for Food Security & Public Health. 1-4p.
- Cruz Serna, Z. 2013. Aplicación de Probióticos en el sector de acuicultura desafío y perspectiva (En línea). Revista Industrial Pesquera # 2063-2064; 2013. Consultado: 20 de noviembre 2017. Disponible: <http://www.alimentatec.com/aplicacion-de-probioticos-en-el-sector-de-la-acuicultura-desafios-y-perspectivas/>
- Dávalos Mecalco, S. 2005. Patógeno Oportunista vibrio *Vulnificus*. Revista Digital Universitaria ISSN 1067-6079. Vol 6 #4.
- De Andrés, JBV. 2003. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marino (aguas, sedimentos y organismo). Determinación de nitrógeno y fósforo total. Santa Fe, CO. INVEMAR. p. 62 – 66.
- De La Lanza Espino, G. 2013. Protocolo para el muestreo de calidad del Agua en humedales y ríos endorreicos y exorreicos. Índices del estado trófico. México D.F., MX. UNAM. p.7.
- Durán, G. 2016. Evaluación patológica de *Litopenaeus vannamei* cultivados en granjas ubicadas en el Estuario del Río Chone (Ecuador). Manabí. Ecuador. AquaTic. 30-42p.
- Escobedo Urías, D; Méndez Lozano, J. 2009. Impacto de los efluentes Acuícolas sobre la calidad ambiental de una laguna costera del Norte de Sinaloa. Sinaloa. México. Instituto Politécnico Nacional (IPN). 10-19p.

Espinosa Plascencia, A; Bermúdez Almada, M. 2011. La Acuicultura y su impacto al medio ambiente. Hermosillo, México. Coordinación de ciencias de los Alimentos Laboratorio de Análisis Biológicos (CIAD). 226-229p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Litopenaeus vannamei*. (En línea). Consultado 6 oct 2014. Disponible en: http://www.fao.org/fishey/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es

Franco-Monreal, J; Lara-Zaragoza, E; Villa-Ruano, N; Mota-Magaña, L; Serralta-Peraza, L; Cuevas-Albarrán, V; Sosa-Castillo, F. 2013. Especies de importancia clínica del genero vibrio en alimentos marinos de origen animal de establecimiento de Puerto Ángel, Oaxaca, México. Rev. SUENO ISSN-4665-0808; Vol XX.

Garcias, R; Gutiérrez, L. 2015. El uso de los probióticos en la industria acuícola. Caldas. Colombia. Asociación Colombiana de Ciencias y Tecnología de Alimentos.

García Rodes, P. 2017. Acción y control del vibrio en el ciclo de engorde de los camarones *Litopenaeus vannamei*. Ingeniero Acuícola. Machala. Ecuador. Universidad Técnica de Machala (UTMACH). 7-11p.

Gómez Gil, B. 2014. Enfermedades bacterianas de camarones. Antibióticos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. Mazatlán, Sinaloa, MX. Lab. Bacteriología y Genómica Microbiana. 74 - 81.

Guillan, M; Thompson, F y Rodríguez, J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture.233.p. 1 – 14.

Hernández Gurrola, J. 2016. Caracterización de la calidad del agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de alta salinidad con recambio de agua limitado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California, Mexico.48-71p.

Hinestroza, F; Maderira, R; Bourbeau, P. 2007. Severe Gastroenteritis and Hypovolemic Shock caused by *Grimentia (Vibrio) hollisae* infection (En línea). Journal of Clinical Microbiology DOI: 10.1128/JCM01205077. Consultado 27 de noviembre de 2017. Disponible: <https://jcm.asm.org/content/45/10/3462.full>

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura, CR). 2013. Análisis económico de tecnologías promovidas por el programa de agricultura familiar – cadenas productivas. Acuicultura- Camarón Blanco. Santa Tecla, SV.p.31-34.

INAPESCA (Instituto Nacional de Pesca y acuicultura. 2007. Producción de Camarón. Jalisco. México. INAPESCA. 99-217p.

Jiménez, R y Guerra, M. 2001. Optimización del Procedimiento de cálculo del alimento en estanques de engorde para la eficiencia del cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en cuba. La Habana. Cuba. RevVet.

Lara-Espinoza, C; Espinosa-Plascencia, A; Rivera-Domínguez, M; Astorga-Cienfuegos, K; Acedo-Felix, E; Bermudez-Almada, M. 2015. Desarrollo del camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con Biofloc y nulo recambio de agua. mexicana. AquaTic. 1-13p.

Lightner, DV. 1993. Enfermedades del camarón. Enfermedades producidas por vibrios. Martínez Córdova, LR. Sonora, MX.AGT editor.p.170.

López-Torres, M; Chomina-Huerigo, B; Haros- Méndez, M; Barraza Guardado, H; Valdez-Holguín, E. 2016. Determinación de la carga bacteriana en zona de efluentes camaronicolas (En línea). Revista de Ciencias Biológicas y salud DOI: 10.18633/bt.v 15i1.133. Consultado: 30 de noviembre de 2017. Disponible:

https://www.researchgate.net/publication/289824515_DETERMINACION_DE_LA_CARGA_DE_BACTERIAS_EN_ZONA_DE_EFLUENTE_CAMARONICOLA

Manzo Delgado, H. 2000. Efecto de cuatro densidades de siembra sobre el crecimiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), cultivado en estanques rústicos, en Mancillo Colima. Maestrías en ciencias, Acuicultura. Mancillo, Colima. México. Universidad de Colima. 39-47p.

Martínez Córdova, LR.1993.camaronicultura.bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. *Litopenaeus vannamei*. Sonora, MX.AGT editor p. 27 – 28.

Martínez Córdova, L; Porchas Cornejo, M; Villareal Colmenares, H. 2008. Efecto de tres diferentes estrategias de alimentación sobre el fitoplancton, zooplancton y bentos en estanques de cultivo de camarón café. Sonora. México. Universidad Autónoma de Baja California. Ciencias Marinas. Vol 4 #3. 268-279p.

Martínez Córdova, L; Quadros, W; Molina Poveda, C; Villareal Cavazas, D. 2008. Estrategia de alimentación en la etapa de engorde del camarón. CYTED (Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo). La Paz. México. 15-27p.

Martínez Ibarra, S. 2004. Estudio de la respiración de Fondo en estanques de cultivo de camarón en las condiciones de Medio Ambiente y manejo. Biólogo Marino. Bogotá. Colombia. Universidad de bogota Jorge Tadeo Lozano. 38-48p.

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador).2012.Clasificación de suelos por división política de El Salvador, C.A. Clasificación de suelos por división política del departamento de La Paz, El Salvador. Dirección General de Ordenamiento Forestal, Cuencas y Riego. Santa Tecla, El Salvador. Pág. 37.

MARN (Ministerio de medio ambiente y Recursos Naturales, SV). 2011. Sitio Ramsar Complejo Jaltepeque. (En Línea). Santa Tecla, SV. Consultado 6 oct 2014.Disponible en:<http://www.marn.sv/temas/biodiversidad/humedales/complejo-jaltepeque.html>

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). SF. Índice de calidad de Agua ICA. SNET (Sistema Nacional de estudios Territoriales). San Salvador. El Salvador. 1-4p.

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2017. Informe de Calidad del agua de los ríos de El Salvador. Katan, C; Mena, Z; Amaya Grande, L; Aguirre, J; Péñate, Y. San Salvador. El Salvador. MAR. 36-79p.

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. Informe de labores. San Salvador. El Salvador. MAR. 58-65p.

MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2013. Informe de labores. San Salvador. El Salvador. MAR. 23-76p.

MARN (Ministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente), BID (Banco Interamericano de Desarrollo). 2006. Informe Final Diagnóstico Nacional de la Calidad Sanitaria de las Aguas

Superficiales de El Salvador. San Salvador. El Salvador. Ministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente. 78 – 88p.

Melgar Valdés, C; Barba Macías, E; Álvarez - Gonzalez, C; Tovilla Hernández, C; Sánchez, A. 2012. Efectos de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Panaeidea) en cultivo intensivo. Rev. Biol. Trop. ISSN 0034-7744, Vol 6(3): 1225-1228p.

Membreño, L; Morales, S; Martínez, E. 2014. Crecimiento de camarones blancos *Litopenaeus vannamei* en juveniles con dos tipos de alimentos: uno comercial con 25% de proteína vs experimentales con 18% de proteína a densidad de siembra de 12 ind/m² (Sistema Semi-intensivo). León, Nicaragua. Universidad nacional Autónoma de Nicaragua. 103-115 p.

Miranda, I; Valles, J; Sánchez, R; Alvares, Z. 2018. Cultivo de camarón Marino *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) en agua. (En línea). Revista Científica SCIELO ISSN 0798-2259. Consultado: 30 de noviembre de 2017. [Disponible: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400002](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000400002)

Molleda, M. 2006. Manejo sostenible del cultivo de camarón en Cuba, Estudio de caso: Camaronera CALISUR provincia Granma. Maestro en Manejo Integrado de la zona Costera, La Habana, Cuba. Universidad de La Habana. 30-75p.

Morales Covarrubias, MS. 2010. Enfermedades del camarón. Camarón: Análisis en fresco, Herramienta de diagnóstico. Muestreo Aleatorio. México D.F, MX. Trillas. p. 15 – 22; 85.

Morales, R. 2013. Características técnicas de los sistemas de producción del camarón del cultivo en El Salvador. Santa Tecla, SV. p. 3.

Moreno Figueroa, L. 2017. Cultivo intensivo Fotoheterotrofico del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), en alta salinidad con reposición mínima de agua. Doctor en Ciencias. La Paz, Baja California. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 32.41p.

Mundo del camaron. 2011. Tallas. (En línea). Consultado 30 ene 2016. Disponible en: http://mundodelcamaron.es.tl/Tallas_Selecci%F2n.htm

Muñoz, J. 2009. Cultivo de Camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en dos densidades de siembra en estanques de concreto, utilizando sistema intensivo sin aireación en la Peña, León, Nicaragua. Ingeniero Acuicola. León. Nicaragua. Universidad Autónoma de Nicaragua. 20-35p.

Muñoz, D; Graü de María, C; Marval, H; Martínez, C. 2012. Identificación de bacterias del genero vibrio asociadas a zonas productoras de moluscos Bilvalvos, Estado Sucre, Venezuela. Revista Científica RC FCW ISSN07098-2259.

Murillo, Haro, V. M; Fabregas, L. F; Paredes Iturrieta, N; Gonzalez Maier, R; Oyarzún Vera, M. 2008. Programa y análisis de información biológica y oceánica, obtenida a través del Programa de Sanidad de Moluscos bivalvos. Chile. Instituto de Formación Pesquera. 76 – 100 p.

Navarrete Soriano, A. 2015. Protocolo de levantamiento de masivo y reporte de análisis de antibióticos. La Unión, SV. MEGATEC. s.p.

Navarrete Soriano, A. 2017. Manual para el uso de EPICIN PST y EPICIN G2 de la marca EPICORE® con el propósito de Biorremediación validado en el cultivo de camarón marino en El Salvador. La Union. El Salvador. ITCA- FEPADE, MINED (Ministerio de Educación), MEGATEC, La Union.

- Navarrete Soriano, A. 14 de Octubre. 2017. Elaboración y análisis de tablas para tesis de probióticos. (Mesa Redonda). Santa Tecla. La Libertad. MEGATEC, La Union.
- Nicovita. 1998. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 1998-3: 1-2p.
- Nicovita. 1997. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 1997-8: 1-6p.
- Nicovita. 2007. La calidad en el agua de cultivo de camarón de mar. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 2007-1; 1-3p.
- Nicovita. 1997. Tasa o factor de conversión alimenticia en cultivos de camarón. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 1997-3: 1-2p.
- Nicovita. 2005. Cultivo Intensivo del Camarón blanco. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 2005-1: 1-6p.
- Nicovita. 2011. V Simposio Nicovita. Boletín Nicovita. Tegucigalpa, Honduras. 2011-2
- Niola Morocho, A. 2017. Revisión de sistemas combinados de micro y macro organismos como alternativa tecnológica para el tratamiento de efluentes de granjas camaroneras. Ingeniero Acicala. Machala. Ecuador. Universidad Técnica de Machala (UTMACH). 5-8p.
- Nunez, A; Vásquez López, C. 2002. Baja Salinidad, Cultivo tierra adentro en Brasil y Ecuador. Boletín Nicovita. Lima. Perú. 2002-4: 1-5p.
- Oddone, N. 2013. Diagnostico de la cadena de camarón de cultivo en El Salvador. Sector camaronero. Santa Tecla, SV. p.16 -24.
- Orellana, L. 2012. Análisis de la situación de la pesca de camarón, La camaronicultura y las especies relacionadas a las mismas en El Salvador. (En línea). Consultado 6 oct 2014. Disponible en: <http://ipsnoticias.net/fotos/ANALISIS.pdf?944f1e>
- OMS (Organización Mundial de la salud). 1991. Riesgos de Transmisión del Cólera por los Alimentos (En línea). Washington, D.C. Estados Unidos. Oficina Regional para las Américas. 38p
Consultada: 22 de marzo de 2015. Disponible: <http://bvs.per.paho.org/bvsair/e/repindex/rep41/riesgos/riesgos.html>
- Paredes Mendieta, J. 2017. Patología Asociadas al cultivo intensivo de camarón *Litopenaeus vannamei* en sistemas cerrados de recirculación. Biólogo. Guayaquil. Ecuador. Universidad de Guayaquil. 24-29p.
- Parrado, M; Clemencia Sales, M; Hernández - Arévalo, G; Ortega, J; Yossa, M. 2014. Variedad bacteriana en cultivo piscícola y su resistencia a antibacteriana. Villavicencio. Colombia Universidad de Llanes. Vol 8 #2. 239-244p.
- Peña, M. 5 de junio 2017. Información sobre los procedimientos realizados en la granja previos a los análisis y muestreos. (Entrevista). Zacatecoluca, El Salvador. Granja "Las Ánimas".
- Pérez, L. 2009. Formulación y evaluación de proyectos productivos de inversión. Relación Beneficio Costo (R B/C). (En línea). Consultado 5 sept 2015. Disponible en: <http://www.agroproyectos.org/2013/08/relacion-beneficio-costo.html>
- Prento, B. 2016. Aplicación de un probiotico compuesto de *Bacillus amyloliquefaciens* para mejorar el sistema inmunológico del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en sistema de bioflocules. Ciencias Ambientales. Gandía. España. Universidad Politécnica de Valencia. 3-4p.; 11-13p.

Puelles, L; López, J; Molina, C. 2010. *Biología medica. Células heterótrofas*. Universidad San Martín de Porres. Chiclayo, PE. s.p.

Quiroz-Castelán, A; Molina-Astudilo, F; Ortega-Salas, A. SF. Abundancia y diversidad del fitoplancton en estanques con policultivos de peces, Utilizando fertilizantes Orgánicos, inorgánicos y combinados. Morelos. México.

Ramírez Ruiz, M. 2009. Variación de la composición Específica y abundancia de cianofitas en estanques de camarón. Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. La paz, Baja California. México. Instituto Politécnico Nacional (IPN). 39-43p.

Ramos Plaza, ER.1999. *Psicología para estudiantes. Prueba t de Student*. México D.F., MX.s.p.

Rico, MA.1974. *Las nuevas clasificaciones y los suelos de El Salvador. Suelos Grumosoles (Vertisoles)*. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. San Salvador, El Salvador. Editorial Universitaria. Pág. 19-20.

Rivas, A; Lemos, M; Osorio, C. 2013. *Photobacterium damsele* subsp. *Dansela*, a bacterium pathogenic for marine animal and humans (En línea). Us National Library of medicine National Institute of Health. Consultado 30 de noviembre de 2017. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3782699/>

Ronsón Paulin, JA; Medina Reyna, CE.2004. *Probióticos en la acuicultura*. Santiago de Compostela, ES Laboratorio Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela.49 p.

Rodríguez, SA.2010. *La dureza del agua. Concepto de la dureza del agua*. Buenos Aires, AR.UTN.p.6.

Rodríguez Villa, A. 2013. *Cultivo de camarón blanco Penaeus vannamei en México*. Ingeniero Agrónomo Zootecnista. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. Universidad Autónoma Antonio Narro. 24-35p.

Rugamas, J y Martínez, E. 2015. *Comparación del crecimiento de camarón Litopenaeus vannamei bajo dos condiciones de cultivo: uno siembra directa y el otro por fase (invierno – sequia)*. León. Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 95-102p.

Salazar Fiallo, J.2013. *Microorganismos para Bioremediacion*.1 (10): 29- 33.

Saldias, C; Sonnen Holzner, S; Massaut, L. 2001. *Balance del nitrógeno y fosforo en estanques de producción de camarón en Ecuador (En línea)*. Consultado: 27 de noviembre de 2017. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/41020130_Balance_de_nitrogeno_y_fosforo_en_estanques_de_produccion_de_camaron_en_Ecuador

Santiago, M; Espinosa, A; Bermúdez, M. 2009. *Uso de Antibióticos en camaronicultura*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 40(3). 187-0195. 22-32p.

Silva, A y Acuña-González, J. 2006. *Caracterización Fisicoquímica de dos estuarios en la Bahía de Golfito Dulce, Pacífico de Costa Rica*. Biol. Trop. 241-256p.

Solano Motoche, G. 2003. *Efecto del hidróxido de calcio sobre la calidad del agua y la producción del cultivo de Litopenaeus vannamei; en aguas salobres*. Magister en Ciencias. Guayaquil. Ecuador. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). 36-41p.

- Sotomayor, MA; Balcázar, JL. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Revista AguaTIC.1* (19):9 – 15.
- Suarez, M; Medina, Z; Montiel, M; Ibarra, J; Salcido, A. 2015. Distribución de vibrio spp en agua y sedimento de estanques productores de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cultivados con agua del lago Maracaibo (Venezuela). *Revista Científica RC FCW*. Maracaibo. Venezuela. 293-297p.
- Surette, M; Miller, M; Bassler, B. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *salmonella typhimurium* and *vibrio harveyi*: A new family of genes responsable for autoinducer production (En línea). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of American* PMID: PMC15544.
- Talavera, Zapata, LM; Sánchez, D.1997.Tasa o factor de conversión alimenticia en el cultivo de camarón.*Nicovita.2* (3):1.
- Talavera, V; Zapata, LM; Sánchez, D.1999. Ocurrencia de la bacteria *Pseudomonas* en el cultivo de camarón.*Nicovita.4* (5): 1.
- The MERCK group.s.f.Microbiology Manual. MRS Agar (*Lactobacillus* Agar acc. To De MAN, ROGOSA and SHARE), Darmstadt, Alemania.pag 354-355.
- Trece, GD. 2001. métodos para mejorar la camaronicultura en Centroamérica. Managua, NI.UCA.p.114.
- Tsang, SH; Aguilón, CG; Méndez, MR. 2013. Manual de reproducción y cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Enfermedades que afectan el cultivo de camarones. *Vibrios spp*. Los Cobanos, Sonsonate, SV. p. 21.
- UCA (Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas”, SV). 2010. Manual para el buen manejo en camaronicultura. Principios de calidad de agua y suelos en acuicultura. San Salvador, SV. p. 9 – 22.
- Valenzuela-Quiñonez, W; Rodríguez-Quiroz, G; Esperanza-Leal, H.2010. Cultivo intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*; (BOONE, 1931), en agua de pozo de baja salinidad como alternativa acuícola para zonas de alta marginación. Sinaloa. México. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenibel RaXimbai*. 1-5p.
- Vides Padilla, JC;De Paz Martínez, CM. 2008.Distribucion y abundancia de postlarvas y juveniles de camarones blancos en la bahía de Jiquilisco, Usulután, El Salvador. Factores abióticos (Factores físico- químicos).Licenciado en biología. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. p. 17 – 19.
- Villamil Díaz, L; Martínez-Silva, MA. 2009. Probióticos como herramienta biotecnológica en el Cultivo de camarón: reseña. ¿Cuáles son los mecanismos de acción de los Probióticos? Grupo de Investigación en Cultivo y Manejo de Organismos Acuáticos. Santa Marta, CO. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. p. 165- 187.
- Villaseñor, I. E. L. 2012. Efecto de probióticos en la modulación de la microbiota intestinal y respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Doctor en Ciencias. La Paz, Baja California. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 38-79p.

Wang, YB. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* Aquaculture.269.p. 259 – 264. 1.

Yang, X; Wu, X; Hao, HL; He; ZL. 2008. Mechanisms and assessment of water eutrophication. Journal of Zhejiang University SCIENCE B.p. 197 – 198.

Zelaya Cruz, RS. 2003.Efecto de la tasa de alimentación sobre el crecimiento del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en cultivo intensivo. Calidad de agua. Licencia en biología. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. p. 12 – 2.

8. ANEXOS

Cuadro- A 1. Formato de toma de peso de la Camaronera Las Animas

Estanque #					
Fecha de siembra:					
Fecha de Muestreo:					
Días de cultivo:					
		EN GRAMOS			
# de muestreos	# de camarones	Peso Bruto (PB)	Tara (T)	Peso Neto (PN)	Peso por camarón (P/C)
1					
2					
3					
4					
TOTAL					

Fuente: Camaronera "Las Ánimas".

Cuadro- A2. Índice del Estado Trófico, TRIX, y calidad de agua.

ESCALA TRIX	Estado de la calidad del agua	Características del agua	Nivel Trófico
2- 4	Alta	Agua pobremente productiva (nivel trófico bajo)	Oligotrófico
4 – 5	Buena	Agua moderadamente productiva (nivel trófico media)	Mesotrófico
5- 6	Mala	Agua entre moderada y altamente productiva (nivel trófico alta)	Eutrófico
6 – 8	pobre	Agua altamente productiva (nivel trófico más alta)	Hipertrofico

Fuente: Ayala ,2008.

Cuadro- A 3. Selección del tamaño de la muestra y cálculo del porcentaje de prevalencia de un patógeno en una población determinada (Tomada de Lightner, 1996, y modificada de Amos, 1985, citado por Morales - Covarrubias (2010)).

Tamaño de la población	Tamaño de la muestra necesaria para una prevalencia estimada de:						
	2 %	5 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %
50	50	35	20	10	7	5	2
100	75	45	23	11	9	7	6
250	110	50	25	10	9	8	7
500	130	55	26	10	9	8	7
1000	140	55	27	10	9	9	8
1500	140	55	27	10	9	9	8
2000	145	60	27	10	9	9	8
4000	145	60	27	10	9	9	8
10000	145	60	27	10	9	9	8
>100000	150	60	30	10	9	9	8

Cuadro- A 4. Cantidad de postlarva a utilizar por cada estanque en estudio.

ESTANQUES	POBLACION
ESTANQUE # 10	32,377 m ² x 55 Camarones/ m ² : 1,780,735 postlarva.
ESTANQUE # 11	25,567 m ² x 55 Camarones/ m ² : 1,406,185 postlarva.
ESTANQUE # 12	21,116 m ² x 55 Camarones/ m ² : 1,161,380 postlarva.
ESTANQUE #13	23,442 m ² x 55 Camarones/ m ² : 1,289,310 postlarva.
TOTAL	5,637,610 postlarva

Fuente: Camaronera "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 5. Hoja de reporte de análisis en fresco.



1

Escuela Especializada en Ingeniería ITCA FEPADE MEGATEC- La Unión
Laboratorio de Bacteriología
Hoja de Reporte del Análisis en Fresco de Muestras de Camarón

Número: _____ Fecha: _____ Hora de inicio _____ Hora finalización _____

Procedencia: _____
 Especie: _____
 Estanque Número: _____ Tamaño de la Muestra: _____
 Fecha de inicio de cultivo: _____ Numero de Examinados: _____
 Estado de vida: _____

Características Externas	Observaciones en camarón vivo					
	1	2	3	4	5	6
Peso promedio (gramo)						
Actividad del camarón						
Coloración del organismo						
Coloración blanca translucido						
Coloración rojiza						
Coloración amarillenta						
Opacidad muscular						
Textura de al cutícula normal						
Extracción de hemolinf (ml)						
Textura de al Cutícula delgada (o suave)						

Melanización (color café claro) en los periópodos						
Melanización (color café claro) en los urópodos						
Ciego Intestinal Normal						
Ciego Intestinal Inflamado						
Deformidad en el abdomen						
Deformidad en el rostrum						
Color de la antena						
Antena completa						
Antena incompleta						
Color blanco translucido de los urópodos						
Coloración rojiza de los urópodos						
Ampulas en los urópodos						
Síndrome de acalabramiento						
Color del Hepatopáncreas						
Tamaño normal del Hepatopáncreas						
Atrofia (reducción del tamaño)						
Hipertrofia (aumento de tamaño)						
Características Internas	Observaciones					
	1	2	3	4	5	6
Hepatopáncreas						
Color del fluido del hepatopáncreas						
Melanización Tubular (túbulos/campo)						

Necrosis tubular (túbulos/campo)						
Túbulos vacíos (túbulos/campo)						
Nódulos hemocíticos (No./campo)						
Deformación de los túbulos (túbulos/campo)						
Cantidad de lípidos (gotas de grasa)						
Características Internas	Observaciones					
	1	2	3	4	5	6
Intestino						
Número Gregarinas en su estadio esporozoíto (organismos/intestino)						
Número Gregarinas en su estadio Gametocisto (organismos/intestino)						
Número Gregarinas en su estadio sicigias de una a siete divisiones(organismos/intestino)						
Presencia de nematodos (No./intestino)						
Presencia de cianofitas (No./intestino)						
Microsporidios (No./intestino)						
Estadio de muda						
Estadio de inter muda						
Estadio de pre muda						

Estadio de muda						
Estadio de post muda						
Branquias						
Presencia de necrosis en la branquias (número/lamela/organismo)						
Presencia de nódulos hemocíticos en las branquias (número/lamela/organismo)						
Presencia de protozoarios en la branquias (número/lamela/organismo)						
Presencia de bacterias filamentosas en la branquias (organismos/campo)						

Firma responsable

Fuente: Laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión 2017.

Cuadro- A 6. . Toma de datos de análisis físicos in situ

Análisis	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	Estanque # 10 Compuerta de entrada	Estanque # 10 Compuerta de salida	Estanque #11 Compuerta de entrada	Estanque #11 Compuerta de salida	Estanque # 12 Compuerta de entrada	Estanque # 12 Compuerta de salida	Estanque # 13 Compuerta de entrada	Estanque # 13 Compuerta de salida
Temperatura del agua		6:00 am								
		5: 00 pm								
Turbidez		6:00 am								
Oxígeno Disuelto		6: 00 am								
		5:00 pm								

Fuente: Granja “Las Ánimas” 2017.

Cuadro- A 7. Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infección, infestación y síndrome (Tomado: Lightner, 1996).

Grado de Severidad	Signos Clínicos
0	No presentan signos de infección por el agente patógeno, parásito o epicomensal. No presentan lesiones características de la enfermedad.
1	Presencia muy baja del patógeno, parásito o epicomensal. En aquellos en los que se tiene un número estándar permitido, éste se encuentra justo arriba del límite normal. Se observan muy pocas lesiones características de la enfermedad.
2	Se observa la presencia baja y moderada del patógeno, parásito o epicomensal. Se observan lesiones ligeras o moderadas, características de la enfermedad. Incremento en la mortalidad si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento).
3	Se observa la presencia moderada del patógeno, parásito o epicomensal. Se observan lesiones de moderadas a severas, características de la enfermedad. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento (cuando existe tratamiento).
4	Se observa gran cantidad del patógeno, parásito o epicomensal. Se observan severas lesiones características de la enfermedad. Muy letal con altas mortalidades.

Cuadro- A 8. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la deformación tubular en hepatopáncreas con análisis en fresco (tomado de Morales-Covarrubias et al., 2010)

Grado de Severidad	Signos Clínicos
0	No presentan signos de infección. No presentan deformación tubular ni rugosidad. Organismo sano
1	Presencia muy baja de deformación tubular (1-5/campo/organismo). Se observa muy poco desprendimiento celular. Fase (0), infección
2	Se observa la presencia moderada de deformación tubular (6-10 / campo /organismo), atrofia, melanización y necrosis tubular. Se presenta mortalidad si no se aplica tratamiento. Fase (1), inicial.
3	Se observa presencia alta de deformación tubular (11-20 / campo / organismo), con lesiones de moderadas a severas, con melanización, necrosis, desprendimiento celular y atrofia tubular. Presencia de hemocitos y fibroblastos alrededor de túbulos atrofiados. Letal si no se aplica tratamiento.
4	Se observa gran cantidad de túbulos deformes (más de 20 / campo / organismo), con severas lesiones con melanización, necrosis, atrofia tubular y túbulos vacíos. Presencia de hemocitos y fibroblastos alrededor de túbulos atrofiados, melanizados y necróticos. Con mortalidades. Fase (III), crónica.

Cuadro- A 9. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por gregarinas utilizando análisis en fresco. (Tomado de Morales-Covarrubias 2010).

Grado de Severidad	Signos Clínicos
0	No presentan signos de infección por el parásito. No presentan lesiones causadas por el parasitismo.
1	Presencia muy baja del parásito (1-15/intestino/organismo), con muy poca inflamación.
2	Se observa la presencia moderada del parásito (16-50 / intestino / organismo). Incremento en las lesiones causadas por el parasitismo como reducción de la mucosa, deformación del intestino, inflamación, melanización y formación de nódulos hemocíticos. Se observa mortalidad si no se aplica tratamiento.
3	Se observa alta presencia del parásito (51-100 / intestino / organismo). Se observan lesiones moderadas a severas causadas por el parasitismo, como reducción de la mucosa, deformación del intestino, inflamación, melanización y formación de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal si no se aplica tratamiento.
4	Se observa gran cantidad del parásito (más de 100 / intestino / organismo). Se observan severas lesiones causadas por el parasitismo, como reducción de la mucosa, deformación del intestino, inflamación, melanización y formación de nódulos hemocíticos. Muy letal, con altas mortalidades.

Cuadro- A 10. Guía para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad a la infestación por epicomensales en lámelas branquiales.

Grado de Severidad	Signos Clínicos
0	No presentan signos de infección por protozoario. No presentan lesiones causadas por epicomensales.
1	Presencia muy baja de protozoarios (1-5 / lámela / organismo), muy pocas lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación.
2	Se observa la presencia moderada de protozoarios (6-10 / lámela / organismo), incremento en las lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación, melanización y formación de nódulos hemocíticos. Se observa mortalidad si no se aplican medidas de corrección.
3	Se observa alta presencia de protozoarios (10-20 / lámela / organismo), lesiones moderadas a severas causadas por los epicomensales, como inflamación, áreas multifocales melanizadas y formación de nódulos hemocíticos. Potencialmente letal si no se toman medidas de corrección.
4	Se observa gran cantidad de parásitos (más de 20). Severas lesiones causadas por los epicomensales, como inflamación, formación de nódulos hemocíticos, áreas multifocales melanizadas y necróticas. Muy letal, con altas mortalidades.

Cuadro- A 11. T Student para oxígeno disuelto entre T1 y T4 6:00am

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	OXIGENO DISUELTO 1 (mg/l)	OXIGENO DISUELTO 4 6:00(mg..	15	-0.07	3.43	3.50	0.63	-0.42	0.28	-0.45	0.6605

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	OXIGENO DISUELTO 1 (mg/l)	OXIGENO DISUELTO 4 6:00(mg..
T1	T4	n	15.00	15.00
T1	T4	Media	3.43	3.50
T1	T4	D.E.	0.85	0.73
T1	T4	Var (n-1)	0.72	0.53
T1	T4	Var (n)	0.67	0.50
T1	T4	CV	24.77	20.86
T1	T4	Mín	2.50	2.00
T1	T4	Máx	5.70	5.40

Cuadro- A 12. Comportamiento del Oxígeno disuelto entre T1 y T4 6:00am

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	4.3	2.6	3.8	3.6	3.5	3.7	2.9	2.5	2.7	4.1	2.8	5.7	2.6	3.3	3.3
ESTANQUE 13 (T4)	3	2.8	3.7	3.7	3.2	3.7	2	3	3.6	4	3.7	5.4	3.5	3.8	3.4

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 13. T Student para oxígeno disuelto entre T1 y T4 5:00 pm

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	OXIGENO DISUELTO 1.1 (ml/l..	OXIGENO DISUELTO 4 5:00	15	-0.60	8.26	8.86	2.58	-2.03	0.83	-0.90	0.3827

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	OXIGENO DISUELTO 1.1 (ml/l..	OXIGENO DISUELTO 4 5:00
T1	T4	n	15.00	15.00
T1	T4	Media	8.26	8.86
T1	T4	D.E.	1.98	2.83
T1	T4	Var (n-1)	3.94	8.03
T1	T4	Var (n)	3.67	7.50
T1	T4	CV	24.02	31.99
T1	T4	Mín	4.90	4.20
T1	T4	Máx	10.90	13.00

Cuadro- A 14. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T1 y T4 5:00 pm

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	9	8.7	9.2	5	10	4.9	9.6	10.1	8.8	9.2	5.3	10.9	8.6	5.8	8.8
ESTANQUE 13 (T4)	8.3	10.2	8.6	7.7	10.9	4.2	5.7	12.6	12.8	9.8	4.3	7.2	7.8	9.8	13

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 15. T Student para oxígeno disuelto entre T2 y T3 6:00 am

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	OXIGENO DISUELTO 2 6:00(mg..	OXIGENO DISUELTO 3 6:00 (m..	15	-0.19	3.62	3.81	0.62	-0.53	0.16	-1.17	0.2629

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	OXIGENO DISUELTO 2 6:00(mg..	OXIGENO DISUELTO 3 6:00 (m..
T2	T3	n	15.00	15.00
T2	T3	Media	3.62	3.81
T2	T3	D.E.	0.92	1.08
T2	T3	Var (n-1)	0.84	1.17
T2	T3	Var (n)	0.78	1.10
T2	T3	CV	25.28	28.48
T2	T3	Mín	2.60	2.60
T2	T3	Máx	6.30	7.10

Cuadro- A 16. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T2 y T3 6:00am

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	3.7	2.6	4	3.6	3.7	2.9	2.9	2.6	3	3.5	3.9	6.3	3.3	4.4	3.9
ESTANQUE 12 (T3)	2.9	3.4	4	4	4.3	3.5	3.3	3	2.8	4.5	3.9	7.1	3.5	4.3	2.6

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 17. T Student para oxígeno disuelto entre T2 y T3 5:00pm

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	OXIGENO DISUELTO 2 5:00 (m..	OXIGENO DISUELTO 3 5:00 (m..	15	-0.57	7.17	7.74	3.46	-2.49	1.34	-0.64	0.5314

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	OXIGENO DISUELTO 2 5:00 (m..	OXIGENO DISUELTO 3 5:00 (m..
T2	T3	n	15.00	15.00
T2	T3	Media	7.17	7.74
T2	T3	D.E.	2.18	2.52
T2	T3	Var (n-1)	4.77	6.34
T2	T3	Var (n)	4.45	5.92
T2	T3	CV	30.47	32.54
T2	T3	Mín	3.30	3.20
T2	T3	Máx	10.60	12.10

Cuadro- A 18. Comportamiento del oxígeno disuelto entre T2 y T3 5:00 pm

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	8	8.8	7.1	7.2	8.4	6.7	4.9	10.6	9.7	8.7	7	8.8	12.3	6.8	12.9
ESTANQUE 12 (T3)	8.1	3.2	5.9	7.1	12.1	5.3	5.8	5	7.7	9.9	8.1	11.7	9.8	9.4	7

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 19. T Student para Temperatura °C entre T1 y T4 6:00 am

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	TEMPERATURA DEL AGUA 1 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 4 (°C..	15	0.07	30.84	30.77	0.67	-0.31	0.44	0.38	0.7077

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	TEMPERATURA DEL AGUA 1 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 4 (°C..
T1	T4	n	15.00	15.00
T1	T4	Media	30.84	30.77
T1	T4	D.E.	0.56	0.82
T1	T4	Var (n-1)	0.31	0.66
T1	T4	Var (n)	0.29	0.62
T1	T4	CV	1.81	2.65
T1	T4	Mín	29.70	29.30
T1	T4	Máx	31.60	31.90

Cuadro- A 20. Comportamiento de la Temperatura entre T1 y T4 6:00 am

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	30.7	30.8	30.5	30.5	31.6	31	31.2	30.8	29.9	31.6	31.1	31.1	29.7	30.6	31.5
ESTANQUE 13 (T4)	31.7	31	30.3	30.3	31.6	31	31.1	30.9	29.7	29.5	31.3	31.9	29.3	30.5	31.5

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 21. T Student para Temperatura °C entre T1 y T4 5:00 pm

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	TEMPERATURA DEL AGUA 1 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 4 (°C..	15	-0.28	32.32	32.60	0.64	-0.64	0.08	-1.69	0.1137

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	TEMPERATURA DEL AGUA 1 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 4 (°C..
T1	T4	n	15.00	15.00
T1	T4	Media	32.32	32.60
T1	T4	D.E.	0.75	1.14
T1	T4	Var (n-1)	0.56	1.29
T1	T4	Var (n)	0.52	1.21
T1	T4	CV	2.32	3.49
T1	T4	Min	30.90	31.30
T1	T4	Máx	33.60	35.50

Cuadro- A 22. Comportamiento de la Temperatura entre T1 y T3 5:00 pm

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	33.1	32.5	32.1	30.9	33.6	32	32.9	32.1	31.5	32.5	32.6	32.7	31.3	31.8	33.2
ESTANQUE 13 (T4)	33.7	33.5	32.9	31.3	35.5	31.5	32.7	32.6	31.7	31.9	32.6	32.4	31.3	31.8	33.6

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 23. T Student para Temperatura °C entre T2 y T3 6:00 am

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	TEMPERATURA DEL AGUA 2 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 3 (°C..	15	-0.23	30.71	30.93	0.40	-0.45	-3.7E-03	-2.18	0.0468

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	TEMPERATURA DEL AGUA 2 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 3 (°C..
T2	T3	n	15.00	15.00
T2	T3	Media	30.71	30.93
T2	T3	D.E.	0.55	0.65
T2	T3	Var (n-1)	0.30	0.42
T2	T3	Var (n)	0.28	0.39
T2	T3	CV	1.80	2.10
T2	T3	Min	29.70	29.70
T2	T3	Máx	31.60	32.00

Cuadro- A 24. Comportamiento de la temperatura entre T2 y T3 6:00 am

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	31	30.9	30.5	30.5	31.5	31.2	30.1	30.6	29.8	30.7	31.1	30.8	29.7	30.6	31.6
ESTANQUE 12 (T3)	31.3	31.2	30.7	30.5	31.7	31.1	31.2	30.9	29.8	30.6	31	32	29.7	30.6	31.7

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 25. T Student para Temperatura °C entre T2 y T3 5:00 pm

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	TEMPERATURA DEL AGUA 2 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 3 (°C..	15	0.01	32.31	32.31	0.69	-0.38	0.39	0.04	0.9708

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	TEMPERATURA DEL AGUA 2 (°C..	TEMPERATURA DEL AGUA 3 (°C..
T2	T3	n	15.00	15.00
T2	T3	Media	32.31	32.31
T2	T3	D.E.	1.02	0.93
T2	T3	Var (n-1)	1.03	0.86
T2	T3	Var (n)	0.97	0.80
T2	T3	CV	3.15	2.87
T2	T3	Min	31.10	31.20
T2	T3	Máx	34.50	34.50

Cuadro- A 26. . Comportamiento de la temperatura entre T2 y T3 5:00 pm

ESTANQUE	SEM 1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	33.2	33.3	31.1	31.1	34.5	31.8	31.3	32.6	31.7	31.5	32.9	32.5	31.7	31.9	33.6
ESTANQUE 12 (T3)	33.9	32.2	31.5	31.8	34.5	31.5	31.9	32	31.4	32.5	32	33	31.2	32.5	32.7

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 27. Comportamiento del pH en el Ciclo Productivo 2016.

ESTANQ UE	SEM1	SEM 2	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQ UE 10 (T1)	6.7	6.6	6.5	6	6.2	6.5	6.6	6.9	7	6.5	6.8	6.3	6.5	6.6	6.6
ESTANQ UE 11 (T2)	6.5	6.3	6.5	6.5	6.4	6	6.4	6.6	6.9	6	6.7	6	6.1	6.4	6.4
ESTANQ UE 12 (T3)	6.6	6.4	6.8	6.6	6.6	6.5	6.5	6.4	6.4	6.8	6.8	6	6	6.3	6.5
ESTANQ UE 13 (T4)	6.5	6.5	6.4	6.5	6.3	6.3	6.4	6.4	6.6	6.6	6.5	6	6.4	6.3	6.5

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 28. Comportamiento del pH en el Ciclo productivo 2017

ESTANQUE	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM5	SEM6	SEM7	SEM8	SEM9	SEM10	SEM11	SEM12	SEM13	SEM14	SEM15
ESTANQUE 10 (T1)	7.7	7.7	7.5	7.4	7.6	7.5	7.4	7.4	7.3	7.2	7	6.9	7	7.2	7.3
ESTANQUE 11 (T2)	7.5	7.5	7.1	7.1	7.4	7.5	7.5	7.1	7.1	6.9	6.9	7	7.4	7.3	7.3
ESTANQUE 12 (T3)	7.4	7.4	7.5	7	7.3	7.1	7.3	7.4	7.2	6.9	6.9	6.9	7	7.3	7.4
ESTANQUE 13 (T4)	7.6	7.6	7.4	7.5	7.4	7.5	7.5	7.3	7.4	7	7.1	6.9	7	7.1	7.4

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 29. T Student para Fosforo Total entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	FOSFORO TOTAL 1 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 4 (mg/l)	4	-1.77	5.67	7.45	5.47	-10.47	6.93	-0.65	0.5630

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	FOSFORO TOTAL 1 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	5.67	7.45
T1	T4	D.E.	2.84	5.64
T1	T4	Var(n-1)	8.05	31.76
T1	T4	Var(n)	6.04	23.82
T1	T4	CV	50.02	75.70
T1	T4	Mín	3.07	3.10
T1	T4	Máx	8.28	15.33

Cuadro- A 30. T Student para Fosforo Total entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	FOSFORO TOTAL 1 (mg/l)	FOSFORO 4 (mg/l)	4	0.45	5.74	5.29	1.00	-1.14	2.04	0.90	0.4336

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	FOSFORO TOTAL 1 (mg/l)	FOSFORO 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	5.74	5.29
T1	T4	D.E.	3.57	2.79
T1	T4	Var(n-1)	12.72	7.79
T1	T4	Var(n)	9.54	5.84
T1	T4	CV	62.12	52.72
T1	T4	Mín	3.07	2.76
T1	T4	Máx	11.00	9.20

Cuadro- A 31. T Student para Fosforo Total entre T2 y T3 entrada.

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	FOSFORO TOTAL 2 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 3 (mg/l)	4	-1.46	5.07	6.53	2.09	-4.79	1.87	-1.40	0.2567

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	FOSFORO TOTAL 2 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	5.07	6.53
T2	T3	D.E.	2.01	3.97
T2	T3	Var (n-1)	4.04	15.79
T2	T3	Var (n)	3.03	11.85
T2	T3	CV	39.69	60.91
T2	T3	Mín	2.76	3.07
T2	T3	Máx	6.75	10.12

Cuadro- A 32. T Student para Fosforo Total entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	FOSFORO TOTAL 2 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 3 (mg/l)	4	-0.39	5.37	5.76	1.83	-3.30	2.52	-0.42	0.7002

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	FOSFORO TOTAL 2 (mg/l)	FOSFORO TOTAL 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	5.37	5.76
T2	T3	D.E.	1.94	3.50
T2	T3	Var (n-1)	3.76	12.25
T2	T3	Var (n)	2.82	9.19
T2	T3	CV	36.13	60.79
T2	T3	Mín	3.68	2.76
T2	T3	Máx	7.05	10.12

Cuadro- A 33. T Student para Nitrógeno total entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T1	T4	NITROGENO TOTAL 1 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 4	4	-1.06	2.34	3.40	1.50	-2.83	sd -1.41		0.8732

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITROGENO TOTAL 1 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 4
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	2.34	3.40
T1	T4	D.E.	2.17	3.28
T1	T4	Var (n-1)	4.70	10.77
T1	T4	Var (n)	3.53	8.08
T1	T4	CV	92.57	96.45
T1	T4	Mín	0.10	0.60
T1	T4	Máx	4.90	8.10

Cuadro- A 34. T Student para Nitrógeno Total entre T1 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T1	T4	NITROGENO TOTAL 1 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 4 (mg/l)	4	0.34	3.01	2.67	0.72	-0.50		sd 0.95	0.2065

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITROGENO TOTAL 1 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	3.01	2.67
T1	T4	D.E.	1.37	1.72
T1	T4	Var (n-1)	1.88	2.97
T1	T4	Var (n)	1.41	2.23
T1	T4	CV	45.66	64.68
T1	T4	Mín	2.00	1.56
T1	T4	Máx	5.00	5.20

Cuadro- A 35. T Student para Nitrógeno Total entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	NITROGENO TOTAL 2 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 3 (mg/l)	4	0.13	2.91	2.78	1.16	-1.24		sd 0.23	0.4173

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITROGENO TOTAL 2 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	2.91	2.78
T2	T3	D.E.	3.17	2.42
T2	T3	Var (n-1)	10.06	5.86
T2	T3	Var (n)	7.55	4.40
T2	T3	CV	109.10	87.25
T2	T3	Mín	0.60	0.70
T2	T3	Máx	7.60	6.10

Cuadro- A 36. T Student para Nitrógeno Total entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	NITROGENO TOTAL 2 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 3 (mg/l)	4	-0.61	2.59	3.20	0.49	-1.18		sd -2.48	0.9552

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITROGENO TOTAL 2 (mg/l)	NITROGENO TOTAL 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	2.59	3.20
T2	T3	D.E.	2.41	2.66
T2	T3	Var (n-1)	5.80	7.07
T2	T3	Var (n)	4.35	5.30
T2	T3	CV	93.00	83.23
T2	T3	Mín	1.26	1.28
T2	T3	Máx	6.20	7.10

Cuadro- A 37. Comportamiento de la Salinidad en los 4 estanques.

Estanque	HOR A	SALINIDAD (mg/l) o (ppm)															
		Inicio 12/0 4/17	SEM 1 17/04 /17	SEM 2 24/04 /17	SEM 3 05/05 /17	SEM 4 12/05 /17	SEM 5 19/05 /17	SEM 6 26/0 5/17	SEM 7 02/06 /17	SEM 8 09/06/1 7	SEM 9 16/06/1 7	SEM 10 23/06/1 7	SEM 11 30/06/1 7	SEM 12 07/07/1 7	SEM 13 14/07/1 7	SEM 14 21/07/1 7	SEM 15 28/07/1 7
10 (Testigo) G2 y PST	6:00 a. m.	20	20	20	25	22	20	20	18	15	15	13	13	10	10	8	5
13 E33 y PST	6:00 a. m.	20	20	20	25	22	20	20	18	15	15	13	13	10	10	8	5
11 (Testigo) G2 y PST	6:00 a. m.	20	20	20	25	22	20	20	18	15	15	13	13	10	10	8	5
12 E91 Y PST	6:00 a. m.	20	20	20	25	22	20	20	18	15	15	13	13	10	10	8	5

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 38. T Student para Nitritos entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	NITRITOS 1 (mg/l)	NITRITOS 4 (mg/l)	4	-0.09	0.20	0.28	0.09	-0.22	0.05	-2.04	0.1343

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITRITOS 1 (mg/l)	NITRITOS 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	0.20	0.28
T1	T4	D.E.	0.26	0.30
T1	T4	Var (n-1)	0.07	0.09
T1	T4	Var (n)	0.05	0.07
T1	T4	CV	131.47	105.37
T1	T4	Mín	0.03	0.06
T1	T4	Máx	0.58	0.71

Cuadro- A 39. T Student para Nitritos entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	NITRITOS 1 (mg/l)	NITRITOS 4 (mg/l)	4	0.13	0.38	0.25	0.23	-0.23	0.49	1.11	0.3473

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITRITOS 1 (mg/l)	NITRITOS 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	0.38	0.25
T1	T4	D.E.	0.51	0.28
T1	T4	Var (n-1)	0.26	0.08
T1	T4	Var (n)	0.19	0.06
T1	T4	CV	133.20	110.61
T1	T4	Mín	0.03	0.07
T1	T4	Máx	1.12	0.67

Cuadro- A 40. T Student para Nitritos entre T2 y T3 entrada

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	NITRITOS 2 (mg/l)	NITRITOS 3 (mg/l)	4	-0.14	0.16	0.30	0.15	-0.38	0.10	-1.87	0.1583

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITRITOS 2 (mg/l)	NITRITOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	0.16	0.30
T2	T3	D.E.	0.25	0.40
T2	T3	Var(n-1)	0.06	0.16
T2	T3	Var(n)	0.05	0.12
T2	T3	CV	156.14	131.16
T2	T3	Mín	0.01	0.05
T2	T3	Máx	0.54	0.90

Cuadro- A 41. T Student para Nitritos entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	NITRITOS 2 (mg/l)	NITRITOS 3 (mg/l)	4	-0.02	0.28	0.29	0.18	-0.31	0.27	-0.19	0.8616

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITRITOS 2 (mg/l)	NITRITOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	0.28	0.29
T2	T3	D.E.	0.30	0.24
T2	T3	Var(n-1)	0.09	0.06
T2	T3	Var(n)	0.07	0.04
T2	T3	CV	109.22	81.15
T2	T3	Mín	0.04	0.10
T2	T3	Máx	0.71	0.62

Cuadro- A 42.T Student para la Alcalinidad entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T1	T4	ALCALINIDAD TOTAL 1 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 4 (mg/l)..	4	40.88	174.50	133.63	77.87	-50.75	ed 1.05		0.1855

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	ALCALINIDAD TOTAL 1 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 4 (mg/l)..
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	174.50	133.63
T1	T4	D.E.	10.88	83.77
T1	T4	Var(n-1)	118.33	7017.90
T1	T4	Var(n)	88.75	5263.42
T1	T4	CV	6.23	62.69
T1	T4	Mín	166.00	8.50
T1	T4	Máx	190.00	186.00

Cuadro- A 43. T Student para Dureza Total del agua entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	DUREZA TOTAL 1 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 4 (CaCO3) (mg/..	4	105.00	2892.50	2787.50	95.39	-46.79	256.79	2.20	0.1150

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	DUREZA TOTAL 1 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 4 (CaCO3) (mg/..
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	2892.50	2787.50
T1	T4	D.E.	724.95	653.68
T1	T4	Var (n-1)	525558.33	427291.67
T1	T4	Var (n)	394168.75	320468.75
T1	T4	CV	25.06	23.45
T1	T4	Mín	1950.00	1900.00
T1	T4	Máx	3520.00	3350.00

Cuadro- A 44. T Student para Alcalinidad entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	ALCALINIDAD TOTAL 2 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 3 (mg/l)..	4	-6.00	171.50	177.50	5.89	-12.93	sd	-2.04	0.9329

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	ALCALINIDAD TOTAL 2 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 3 (mg/l)..
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	171.50	177.50
T2	T3	D.E.	11.82	12.37
T2	T3	Var (n-1)	139.67	153.00
T2	T3	Var (n)	104.75	114.75
T2	T3	CV	6.89	6.97
T2	T3	Mín	160.00	164.00
T2	T3	Máx	186.00	188.00

Cuadro- A 45. T Student para Dureza total del Agua entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	DUREZA TOTAL 2 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 3 (CaCO3) (mg/..	4	125.00	2812.50	2687.50	287.23	-332.04	582.04	0.87	0.4481

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	DUREZA TOTAL 2 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 3 (CaCO3) (mg/..
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	2812.50	2687.50
T2	T3	D.E.	829.03	975.00
T2	T3	Var (n-1)	687291.67	950625.00
T2	T3	Var (n)	515468.75	712968.75
T2	T3	CV	29.48	36.28
T2	T3	Mín	1800.00	1700.00
T2	T3	Máx	3650.00	3550.00

Cuadro- A 46. Comportamiento de la alcalinidad y dureza del agua muestreo de entrada.

ESTANQUES	FACTORES	MUESTREO 1 24/04/2017	MUESTREO 2 21/05/2017	MUESTREO 3 19/06/2017	MUESTREO 4 17/07/2017
ESTANQUE 10 (T1)	ALCALINIDAD	190	174	166	168
	DUREZ TOTAL	3,520	3,400	2,700	1,950
ESTANQUE 11 (T2)	ALCALINIDAD	186	164	160	176
	DUREZ TOTAL	3,650	3,300	2,500	1,800
ESTANQUE 12 (T3)	ALCALINIDAD	188	164	170	188
	DUREZ TOTAL	3,550	3,500	2,000	1,700
ESTANQUE 13 (T4)	ALCALINIDAD	186	168	8.5	172
	DUREZ TOTAL	3,350	3,200	2,700	1,900

Cuadro- A 47. T Student para Alcalinidad entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T1	T4	ALCALINIDAD TOTAL 1 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 4 (mg/l)..	4	55.98	195.50	139.53	78.15	-35.98		sd 1.43	0.1237

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	ALCALINIDAD TOTAL 1 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 4 (mg/l)..
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	195.50	139.53
T1	T4	D.E.	31.00	89.64
T1	T4	Var (n-1)	961.00	8034.90
T1	T4	Var (n)	720.75	6026.18
T1	T4	CV	15.86	64.24
T1	T4	Mín	170.00	8.10
T1	T4	Máx	240.00	210.00

Cuadro- A 48. T Student para Dureza Total del agua entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	DUREZA TOTAL 1 (CaCO3) (mg/..)	DUREZA TOTAL 4 (mg/l)	4	300.00	3162.50	2862.50	212.13	-37.55	637.55	2.83	0.0663

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	DUREZA TOTAL 1 (CaCO3) (mg/..)	DUREZA TOTAL 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	3162.50	2862.50
T1	T4	D.E.	1001.15	895.71
T1	T4	Var (n-1)	1002291.67	802291.67
T1	T4	Var (n)	751718.75	601718.75
T1	T4	CV	31.66	31.29
T1	T4	Min	2000.00	1850.00
T1	T4	Máx	4350.00	3800.00

Cuadro- A 49. T Student para Alcalinidad entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	ALCALINIDAD TOTAL 2 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 3 (mg/l)..	4	42.93	184.50	141.58	76.41	-46.98		sd 1.12	0.1715

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	ALCALINIDAD TOTAL 2 (mg/l)..	ALCALINIDAD TOTAL 3 (mg/l)..
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	184.50	141.58
T2	T3	D.E.	43.71	90.59
T2	T3	Var (n-1)	1910.33	8206.32
T2	T3	Var (n)	1432.75	6154.74
T2	T3	CV	23.69	63.99
T2	T3	Mín	160.00	8.30
T2	T3	Máx	250.00	210.00

Cuadro- A 50. T Student para Dureza total del agua entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs (1)	Obs (2)	N	media(dif)	Media (1)	Media (2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	DUREZA TOTAL 2 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 3 (mg/l)	4	3662.50	6537.50	2875.00	8099.32	-9225.32	16550.32	0.90	0.4325

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	DUREZA TOTAL 2 (CaCO3) (mg/..	DUREZA TOTAL 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	6537.50	2875.00
T2	T3	D.E.	7315.67	953.50
T2	T3	Var (n-1)	53518958.33	909166.67
T2	T3	Var (n)	40139218.75	681875.00
T2	T3	CV	111.90	33.17
T2	T3	Min	2500.00	1700.00
T2	T3	Máx	17500.00	3700.00

Cuadro- A 51. Comportamiento de la Alcalinidad y la Dureza del agua muestreo de salida.

ESTANQUES	FACTORES	MUESTREO 1 24/04/2017	MUESTREO 2 21/05/2017	MUESTREO 3 19/06/2017	MUESTREO 4 17/07/2017
ESTANQUE 10 (T1)	ALCALINIDAD	240	170	180	192
	DUREZ TOTAL	4,350	3,500	2,800	2,000
ESTANQUE 11 (T2)	ALCALINIDAD	250	164	160	164
	DUREZ TOTAL	2,850	3,300	2,500	1,750
ESTANQUE 12 (T3)	ALCALINIDAD	210	168	8.3	180
	DUREZ TOTAL	3,700	3,600	2,500	1,700
ESTANQUE 13 (T4)	ALCALINIDAD	210	168	8.1	172
	DUREZ TOTAL	3,800	3,400	2,400	1,850

Cuadro- A 52. Tabla de T Student para La Turbidez del Agua entre T1 y T4.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T4	TURBIDEZ 1 (cm)	TURBIDEZ 4 (cm)	15	1.67	38.00	36.33	7.48	-2.48	5.81	0.86	0.4027

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	TURBIDEZ 1 (cm)	TURBIDEZ 4 (cm)
T1	T4	n	15.00	15.00
T1	T4	Media	38.00	36.33
T1	T4	D.E.	6.21	3.99
T1	T4	Var (n-1)	38.57	15.95
T1	T4	Var (n)	36.00	14.89
T1	T4	CV	16.34	10.99
T1	T4	Mín	30.00	30.00
T1	T4	Máx	50.00	45.00

Cuadro- A 53. T Student para Turbidez del agua entre T2 y T3.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	TURBIDEZ 2 (cm)	TURBIDEZ 3 (cm)	15	2.33	37.67	35.33	6.23	-1.12	5.78	1.45	0.1689

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	TURBIDEZ 2 (cm)	TURBIDEZ 3 (cm)
T2	T3	n	15.00	15.00
T2	T3	Media	37.67	35.33
T2	T3	D.E.	5.94	6.40
T2	T3	Var (n-1)	35.24	40.95
T2	T3	Var (n)	32.89	38.22
T2	T3	CV	15.76	18.11
T2	T3	Mín	30.00	30.00
T2	T3	Máx	50.00	50.00

Cuadro- A 54. T Student para Fosfatos entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T4	FOSFATO 1 (mg/l)	FOSFATOS 4 (mg/l)	4	-0.50	1.85	2.35	1.82	-3.40	2.40	-0.55	0.6210

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	FOSFATO 1 (mg/l)	FOSFATOS 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	1.85	2.35
T1	T4	D.E.	0.93	1.91
T1	T4	Var (n-1)	0.86	3.66
T1	T4	Var (n)	0.64	2.74
T1	T4	CV	50.03	81.37
T1	T4	Mín	1.00	0.90
T1	T4	Máx	2.70	5.00

Cuadro- A 55. T Student para Fosfatos entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	FOSFATO 1 (mg/l)	FOSFATO 4 (mg/l)	4	0.18	1.88	1.70	0.33	-0.35	0.70	1.06	0.3672

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	FOSFATO 1 (mg/l)	FOSFATO 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	1.88	1.70
T1	T4	D.E.	1.17	0.94
T1	T4	Var (n-1)	1.37	0.89
T1	T4	Var (n)	1.03	0.67
T1	T4	CV	62.41	55.39
T1	T4	Mín	1.00	0.80
T1	T4	Máx	3.60	3.00

Cuadro- A 56. T Student para Fosfatos entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	FOSFATOS 2 (mg/l)	FOSFATOS 3 (mg/l)	4	-0.45	1.65	2.10	0.70	-1.28	sd -1.28	-1.28	0.8543

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	FOSFATOS 2 (mg/l)	FOSFATOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	1.65	2.10
T2	T3	D.E.	0.66	1.33
T2	T3	Var (n-1)	0.43	1.77
T2	T3	Var (n)	0.32	1.33
T2	T3	CV	39.74	63.29
T2	T3	Mín	0.90	0.90
T2	T3	Máx	2.20	3.30

Cuadro- A 57. T Student para Fosfatos entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T2	T3	FOSFATO 2 (mg/l)	FOSFATOS 3 (mg/l)	4	-0.25	1.75	2.00	0.53	-0.87	sd -0.95	-0.95	0.7940

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	FOSFATO 2 (mg/l)	FOSFATOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	1.75	2.00
T2	T3	D.E.	0.64	1.02
T2	T3	Var (n-1)	0.40	1.05
T2	T3	Var (n)	0.30	0.79
T2	T3	CV	36.29	51.15
T2	T3	Mín	1.20	1.00
T2	T3	Máx	2.30	3.30

Cuadro- A 58. T Student para Sílice entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p(Unilateral D)
T1	T4	SILICE 1 (mg/l)	SILICE 4 (mg/l)	4	0.50	17.43	16.93	2.29	-2.20		sd 0.44	0.3462

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	SILICE 1 (mg/l)	SILICE 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	17.43	16.93
T1	T4	D.E.	6.62	7.77
T1	T4	Var (n-1)	43.81	60.36
T1	T4	Var (n)	32.86	45.27
T1	T4	CV	37.98	45.90
T1	T4	Mín	12.35	11.90
T1	T4	Máx	26.75	28.50

Cuadro- A 59. T Student para Sílice entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	SILICE 1 (mg/l)	SILICE 4 (mg/l)	4	0.19	18.98	18.79	2.17	-3.26	3.64	0.17	0.8738

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	SILICE 1 (mg/l)	SILICE 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	18.98	18.79
T1	T4	D.E.	6.86	8.63
T1	T4	Var (n-1)	47.08	74.51
T1	T4	Var (n)	35.31	55.89
T1	T4	CV	36.16	45.95
T1	T4	Mín	12.50	11.20
T1	T4	Máx	26.60	29.20

Cuadro- A 60. T Student para Sílice entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	SILICE 2 (mg/l)	SILICE 3 (mg/l)	4	0.91	18.94	18.03	1.48	-1.44	3.27	1.23	0.3051

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	SILICE 2 (mg/l)	SILICE 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	18.94	18.03
T2	T3	D.E.	9.01	10.32
T2	T3	Var (n-1)	81.10	106.57
T2	T3	Var (n)	60.83	79.93
T2	T3	CV	47.55	57.27
T2	T3	Mín	13.40	11.45
T2	T3	Máx	32.40	33.40

Cuadro- A 61. T Student para Sílice entre T2 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	SÍLICE 2 (mg/l)	SÍLICE 3 (mg/l)	4	1.25	21.30	20.05	1.15	-0.58	3.08	2.17	0.1181

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	SÍLICE 2 (mg/l)	SÍLICE 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	21.30	20.05
T2	T3	D.E.	9.06	9.01
T2	T3	Var (n-1)	81.99	81.22
T2	T3	Var (n)	61.50	60.91
T2	T3	CV	42.51	44.95
T2	T3	Mín	13.60	12.00
T2	T3	Máx	32.50	31.90

Cuadro- A 62. T Student para Nitratos entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	NITRATOS 1 (mg/l)	NITRATOS 4 (mg/l)	4	0.72	3.41	2.69	5.02	-7.28	8.71	0.29	0.7937

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITRATOS 1 (mg/l)	NITRATOS 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	3.41	2.69
T1	T4	D.E.	4.36	3.10
T1	T4	Var (n-1)	18.98	9.62
T1	T4	Var (n)	14.24	7.22
T1	T4	CV	127.76	115.21
T1	T4	Mín	0.48	0.30
T1	T4	Máx	9.74	7.21

Cuadro- A 63. T Student para Nitratos entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	NITRATOS 1 (mg/l)	NITRATOS 4 (mg/l)	4	0.88	2.39	1.51	0.75	-0.32	2.07	2.33	0.1019

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	NITRATOS 1 (mg/l)	NITRATOS 4 (mg/l)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	2.39	1.51
T1	T4	D.E.	1.47	1.30
T1	T4	Var (n-1)	2.15	1.69
T1	T4	Var (n)	1.61	1.27
T1	T4	CV	61.44	86.32
T1	T4	Mín	0.89	0.75
T1	T4	Máx	4.30	3.45

Cuadro- A 64. Tabla de T Student para Nitratos entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	NITRATOS 2 (mg/l)	NITRATOS 3 (mg/l)	4	1.39	3.28	1.89	2.04	-1.86	4.63	1.36	0.2676

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITRATOS 2 (mg/l)	NITRATOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	3.28	1.89
T2	T3	D.E.	2.90	1.87
T2	T3	Var (n-1)	8.42	3.49
T2	T3	Var (n)	6.32	2.62
T2	T3	CV	88.55	98.71
T2	T3	Mín	0.40	0.55
T2	T3	Máx	6.20	4.56

Cuadro- A 65. T Student para Nitratos entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	NITRATOS 2 (mg/l)	NITRATOS 3 (mg/l)	4	0.73	1.67	0.95	0.76	-0.48	1.94	1.91	0.1519

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	NITRATOS 2 (mg/l)	NITRATOS 3 (mg/l)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	1.67	0.95
T2	T3	D.E.	1.28	0.55
T2	T3	Var (n-1)	1.65	0.30
T2	T3	Var (n)	1.24	0.23
T2	T3	CV	76.76	58.14
T2	T3	Mín	0.52	0.31
T2	T3	Máx	3.05	1.48

Cuadro- A 66. T Student para Clorofila a entre T1 y T4 entrada

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	CLOROFILA A 1 (mg/m3)	CLOROFILA A 4 (mg/m3)	4	10627.78	14467.78	3840.00	28884.43	-35333.79	56589.34	0.74	0.5151

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	CLOROFILA A 1 (mg/m3)	CLOROFILA A 4 (mg/m3)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	14467.78	3840.00
T1	T4	D.E.	26858.18	3698.29
T1	T4	Var (n-1)	721362069.60	13677312.67
T1	T4	Var (n)	541021552.20	10257984.50
T1	T4	CV	185.64	96.31
T1	T4	Mín	48.10	107.00
T1	T4	Máx	54710.00	7662.00

Cuadro- A 67. T Student para Clorofila a entre E10 y E13 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	CLOROFILA A 1 (mg/m3)	CLOROFILA A 4 (mg/m3)	4	2856.50	6696.50	3840.00	13173.68	-18105.76	23818.76	0.43	0.6938

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	CLOROFILA A 1 (mg/m3)	CLOROFILA A 4 (mg/m3)
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	6696.50	3840.00
T1	T4	D.E.	10992.32	3698.29
T1	T4	Var (n-1)	120831137.00	13677312.67
T1	T4	Var (n)	90623352.75	10257984.50
T1	T4	CV	164.15	96.31
T1	T4	Mín	396.00	107.00
T1	T4	Máx	23162.00	7662.00

Cuadro- A 68. T Student para Clorofila a entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	CLOROFILA A 2 (mg/m3)	CLOROFILA A 3 (mg/m3)	4	-2148.53	963.58	3112.11	3806.59	-8205.67	3908.61	-1.13	0.3411

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	CLOROFILA A 2 (mg/m3)	CLOROFILA A 3 (mg/m3)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	963.58	3112.11
T2	T3	D.E.	1042.43	4624.96
T2	T3	Var (n-1)	1086650.71	21390240.64
T2	T3	Var (n)	814988.03	16042680.48
T2	T3	CV	108.18	148.61
T2	T3	Mín	112.32	65.00
T2	T3	Máx	2361.00	9900.00

Cuadro- A 69. T Student para Clorofila a entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	CLOROFILA A 2 (mg/m3)	CLOROFILA A 3 (mg/m3)	4	-1675.41	1796.09	3471.50	6882.33	-12626.74	9275.92	-0.49	0.6597

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	CLOROFILA A 2 (mg/m3)	CLOROFILA A 3 (mg/m3)
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	1796.09	3471.50
T2	T3	D.E.	2355.33	5929.78
T2	T3	Var (n-1)	5547576.53	35162313.00
T2	T3	Var (n)	4160682.39	26371734.75
T2	T3	CV	131.14	170.81
T2	T3	Mín	36.72	258.00
T2	T3	Máx	5270.00	12362.00

Cuadro- A 70. Comportamiento de los parámetros del agua por estanque entrada.

ESTANQUE	PARAMETROS DEL AGUA	MUESTREO 1 24/04/2017	MUESTREO2 21/05/2017	MUESTREO 3 19/06/2017	MUESTREO 4 17/07/2017
ESTANQUE 10 (T1)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	2845	268	54710	48.1
	TURBIDEZ (cm)	50	37	35	40
	Nitratos (mg/l)	9.74	0.59	0.48	2.83
	Sílice(mg/l)	17.5	13.1	12.35	26.75
	Fosfatos (mg/l)	1.1	2.7	2.6	1
ESTANQUE 11 (T2)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	1156	225	2361	112.32
	TURBIDEZ (cm)	50	35	37	37
	Nitratos (mg/l)	6.2	0.4	1.2	5.31
	Sílice(mg/l)	14.95	15	13.4	32.4
	Fosfatos (mg/l)	0.9	1.3	2.2	2.2
ESTANQUE 12 (T3)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	65	2194	9,900	289.44
	TURBIDEZ (cm)	45	37	35	30
	Nitratos (mg/l)		0.55	0.65	4.56
	Sílice(mg/l)	14.45	12.8	11.45	33.4
	Fosfatos (mg/l)	0.9	1	3.2	3.3
ESTANQUE 13 (T4)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	497	732	2058	60
	TURBIDEZ (cm)	40	35	37	35
	Nitratos (mg/l)	2.12	0.3	1.04	7.21
	Sílice(mg/l)	14.1	11.9	13.2	28.5
	Fosfatos (mg/l)	0.9	1	5	2.5

Cuadro- A 71. Comportamiento de los parámetros del agua por estanque salida.

ESTANQUE	PARAMETROS DEL AGUA	MUESTREO 1 24/04/2017	MUESTREO2 21/05/2017	MUESTREO 3 19/06/2017	MUESTREO 4 17/07/2017
ESTANQUE 10 (T1)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	1716	396	23162	1512
	TURBIDEZ (cm)	50	37	35	40
	Nitratos (mg/l)	2.65	0.89	1.7	4.3
	Sílice(mg/l)	22.9	13.9	12.5	26.6
	Fosfatos (mg/l)	1	1.4	3.6	1.5
ESTANQUE 11 (T2)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	870	5270	1007.64	36.72
	TURBIDEZ (cm)	50	35	37	37
	Nitratos (mg/l)	2.48	0.52	0.64	3.05
	Sílice(mg/l)	24.8	13.6	14.3	32.5
	Fosfatos (mg/l)	1.2	1.2	2.3	2.3
ESTANQUE 12 (T3)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	12362	684	582	258
	TURBIDEZ (cm)	45	37	35	30
	Nitratos (mg/l)	1.32	0.31	0.67	1.48
	Sílice(mg/l)	22.1	12	14.2	31.9
	Fosfatos (mg/l)	1.4	1	3.3	2.3
ESTANQUE 13 (T4)	CLOROFILA <u>a</u> (mg/m ³)	107	6294	1297	7662
	TURBIDEZ (cm)	40	35	37	35
	Nitratos (mg/l)	0.75	0.79	1.04	3.45
	Sílice(mg/l)	22.55	11.2	12.2	29.2
	Fosfatos (mg/l)	0.8	1.3	3	1.7

Cuadro- A 72. T Student para Índice de Estado Tráfico (TRIX) entre T1 y T4 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	TRIX 1	TRIX 4	4	0.25	9.75	9.50	0.50	-0.55	1.05	1.00	0.3910

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	TRIX 1	TRIX 4
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	9.75	9.50
T1	T4	D.E.	0.96	0.58
T1	T4	Var (n-1)	0.92	0.33
T1	T4	Var (n)	0.69	0.25
T1	T4	CV	9.82	6.08
T1	T4	Mín	9.00	9.00
T1	T4	Máx	11.00	10.00

Cuadro- A 73. T Student para Índice de Estado Tráfico (TRIX) entre T1 y T4 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	TRIX 1	TRIX 4	4	0.00	9.75	9.75	0.82	-1.30	1.30	0.00	>0.9999

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	TRIX 1	TRIX 4
T1	T4	n	4.00	4.00
T1	T4	Media	9.75	9.75
T1	T4	D.E.	0.50	0.50
T1	T4	Var (n-1)	0.25	0.25
T1	T4	Var (n)	0.19	0.19
T1	T4	CV	5.13	5.13
T1	T4	Mín	9.00	9.00
T1	T4	Máx	10.00	10.00

Cuadro- A 74. T Student para Índice de Estado Tráfico (TRIX) entre T2 y T3 entrada.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	TRIX 2	TRIX 3	4	-0.25	9.50	9.75	0.96	-1.77	1.27	-0.52	0.6376

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	TRIX 2	TRIX 3
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	9.50	9.75
T2	T3	D.E.	0.58	1.26
T2	T3	Var (n-1)	0.33	1.58
T2	T3	Var (n)	0.25	1.19
T2	T3	CV	6.08	12.91
T2	T3	Mín	9.00	8.00
T2	T3	Máx	10.00	11.00

Cuadro- A 75. T Student para Índice de Estado Tráfico (TRIX) entre T2 y T3 salida.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	TRIX 2	TRIX 3	4	-0.25	9.25	9.50	0.96	-1.77	1.27	-0.52	0.6376

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	TRIX 2	TRIX 3
T2	T3	n	4.00	4.00
T2	T3	Media	9.25	9.50
T2	T3	D.E.	0.50	0.58
T2	T3	Var (n-1)	0.25	0.33
T2	T3	Var (n)	0.19	0.25
T2	T3	CV	5.41	6.08
T2	T3	Mín	9.00	9.00
T2	T3	Máx	10.00	10.00

Cuadro- A 76. Comportamiento del Índice de Estado Tráfico (TRIX) por estanque para los muestreos de entrada y salida.

ESTANQUES	COMPUERTAS	MUESTREO 1 24/04/2017	MUESTREO 2 21/05/2017	MUESTREO 3 19/06/2017	MUESTREO 4 17/07/2017
ESTANQUE 10 (T1)	ENTRADA	9	10	11	9
	SALIDA	10	9	10	10
ESTANQUE 11 (T2)	ENTRADA	9	9	10	10
	SALIDA	9	9	10	9
ESTANQUE 12 (T3)	ENTRADA	8	10	11	10
	SALIDA	10	9	9	10
ESTANQUE 13 (T4)	ENTRADA	9	10	10	9
	SALIDA	9	10	10	10

Fuente: Laboratorio de microbiología, MEGATEC La Unión 2017.

Cuadro- A 77. Referencia para los rangos de calidad de agua (ICA) propuesto por Canadian Council of the Environment. 2001.

Calidad	Rango	Color
Excelente	95 - 100	
Buena	80 - 94	
Regular	65 - 79	
Marginal	45 - 64	
Pobre	0 - 44	

Cuadro- A 78. Límites permitidos para los parámetros considerados en el cálculo del Índice de Calidad del Agua (ICA).

Parámetro	Limite
Alcalinidad	60-250 mg/l
Amonio	0.00-0.26 mg/l
Dureza	2700-6600 mg/l
Fosfatos	0.01-0.20 mg/l
Fosforo	0.100 a 1.0 mg/l
Nitrato	1.7-3.1 mg/l
Nitrito	0.0033-0.660 mg/l
Nitrógeno Total	0.00-1.0 mg/l
Sílice	5-20 mg/l
Bac. Heterótrofas	menor de 500 UFC/ml
Vibrios	1.0X10 ⁵ NMP/100 ml
Pseudomonas	menor de 300

Fuente: Fundación SLA (Sociedad Latinoamericana de Acuicultura) y De Andrés, JBV. 2003.

Cuadro- A 79. Comparación de los parámetros del agua utilizados para el cálculo del Índice de Calidad del agua (ICA) para los estanques 10 y 13 en los muestreos de entrada y salida.

Estanque	Muestreo	Alcalinidad mg/l	Amonio mg/l	Dureza mg/l	Fosfato mg/l	Fosforo Total mg/l	Nitrato mg/l	Nitrito mg/l	Nitrógeno Total mg/l	Sílice mg/l	Bac. Heterótrofas UFC/ml	Vibrios NMP/100 ml	Pseudomonas UFC/ml
Estanque 10 Entrada	M1	190	0	3520	1.1	3.37	9.74	0.098	0.1	17.5	1300	9.3X10 ³	0
	M2	174	0	3400	2.7	8.28	0.59	0.028	3.3	13.1	1588	4.6X10 ⁴	40
	M3	166	0	2700	2.6	7.97	0.48	0.078	1.07	12.35	1100	4.3X10 ³	4600
	M4	168	0	1950	1	3.07	2.83	0.58	4.9	26.75	330000	1.5X10 ³	0
Estanque 10 Salida	M1	5	0	4350	1	3.07	2.65	0.295	2.8	22.9	1900	> 2.4X10 ⁵	0
	M2	170	1.5	3500	1.4	4.3	0.89	0.031	2	13.9	1575	> 2.4X10 ⁵	150
	M3	180	0	2800	3.6	11	1.7	0.075	2.22	12.5	778	4.3X10 ³	1500
	M4	192	0	2000	1.5	4.6	4.3	1.12	5	26.6	320000	4.3X10 ³	0
Estanque	Muestreo	Alcalinidad mg/l	Amonio mg/l	Dureza mg/l	Fosfato mg/l	Fosforo Total mg/l	Nitrato mg/l	Nitrito mg/l	Nitrógeno Total mg/l	Sílice mg/l	Bac. Heterótrofas UFC/ml	Vibrios NMP/100 ml	Pseudomonas UFC/ml
Estanque 13 Entrada	M1	186	0	3350	0.9	3.68	2.12	0.098	0.6	14.1	893	9.3X10 ³	0
	M2	168	0	3200	1	3.1	0.3	0.061	3	11.9	4100	> 2.4X10 ⁵	150
	M3	8.5	0	2700	5	15.33	1.14	0.262	1.91	13.2	3100	5.0X10 ⁴	70
	M4	172	0	1900	2.5	7.67	7.21	0.71	8.1	28.5	24000	3.6X10 ²	0
Estanque 13 Salida	M1	210	0	3800	0.8	2.76	0.75	0.18	1.6	22.55	813	1.1X10 ⁵	0
	M2	168	0	3400	1.3	4	0.79	0.066	2.3	11.2	2253	> 2.4X10 ⁵	90
	M3	8.1	0	2400	3	9.2	1.04	0.101	1.56	12.2	2200	5.0X10 ⁵	0
	M4	172	0	1850	1.7	5.21	3.45	0.67	5.2	29.2	73000	3.6x10 ²	0

Cuadro- A 80. Comparación de los parámetros del agua utilizados para el cálculo del Índice de Calidad del agua (ICA) para los estanques 11 y 12 en los muestreos de entrada y salida.

Estanque	Muestreo	Alcalinidad mg/l	Amonio mg/l	Dureza mg/l	Fosfato mg/l	Fosforo Total mg/l	Nitrato mg/l	Nitrito mg/l	Nitrógeno Total mg/l	Sílice mg/l	Bac. Heterótrofas UFC/ml	Vibrios NMP/100 ml	Pseudomonas UFC/ml
Estanque 11 entrada	M1	186	0	3650	0.9	2.76	6.2	0.065	0.6	14.95	590	4.6X10 ⁴	0
	M2	164	0.3	3300	1.3	4	0.4	0.035	1.7	15	1515	1.1X10 ⁵	930
	M3	160	0	2500	2.2	6.75	1.2	0.082	1.73	13.4	717	2.3X10 ³	460
	M4	176	0	1800	2.2	6.75	5.31	0.54	7.6	32.4	26100	4.3x10 ³	0
Estanque 11 Salida	M1	250	0.2	2850	1.2	3.68	2.48	0.246	1.4	24.8	726	>2.4X10 ⁵	0
	M2	164	0.5	3300	1.2	3.7	0.52	0.038	1.5	13.6	1557	4.6X10 ⁴	150
	M3	160	0	2500	2.3	7.05	0.64	0.111	1.26	14.3	2100	1.1X10 ³	1500
	M4	164	0	1750	2.3	7.05	3.05	0.71	6.2	32.5	20000	9.2x10 ²	90
Estanque	Muestreo	Alcalinidad mg/l	Amonio mg/l	Dureza mg/l	Fosfato mg/l	Fosforo Total mg/l	Nitrato mg/l	Nitrito mg/l	Nitrógeno Total mg/l	Sílice mg/l	Bac. Heterótrofas UFC/ml	Vibrios NMP/100 ml	Pseudomonas UFC/ml
Estanque12 Entrada	M1	188	0	3550	0.9	3.07	1.81	0.131	0.7	14.45	988	4.6X10 ⁴	0
	M2	164	0	3500	1	3.1	0.55	0.051	3	12.8	2358	> 2.4X10 ⁵	40
	M3	170	0	2000	3.2	9.81	0.65	0.135	1.3	11.45	9000	1.1X10 ⁵	1500
	M4	188	0	1700	3.3	10.12	4.56	0.9	6.1	33.4	59000	9.2x10 ²	0
Estanque 12 Salida	M1	210	0	3700	1.4	2.76	1.32	0.134	1.8	22.1	1500	>2.4X10 ⁵	0
	M2	168	0	3600	1	3.1	0.31	0.32	2.6	12	1210	> 2.4X10 ⁵	30
	M3	8.3	0	2500	3.3	10.12	0.67	0.1	1.28	14.2	3100	2.4X10 ⁴	0
	M4	180	0	1700	2.3	7.05	1.48	0.62	7.1	31.9	61500	3.6x10 ²	0

Cuadro- A 81. Conteo de especies de algas en el Fitoplancton entre los estanques 10 y 13.

Clase	Frecuencia	Abundancia relativa %
Chorella sp (clorofitas)	322,225	7.64
Monochrysis sp (Clorofitas)	615,552	14.60
Clamydimona sp (Clorofitas)	667	0.016
Dunalella sp (Clorofitas)	16,588	0.39
Nannochlois sp (Clorofitas)	1,736,235	41.18
Cocconeis sp (diatomea)	612	0.015
Anabaena sp (Cianofitas)	302,060	7.16
Spirulina sp (Cianofitas)	127,620	3.03
Oscillatoria sp (Cianofitas)	968	0.023
Microcystis sp (Cianofitas)	157,498	3.74
Chaetocenos (Diatomeas)	901,114	21.37
Navicula sp (Diatomeas)	17,956	0.43
Thallasiesira sp (Diatomeas)	16,588	0.39
Pleurosigma sp (Diatomeas)	226	0.01
Ceratium Sp (Dinoflagelados)	205	0.005
Total	4,216,114	100.00

Cuadro- A 82. Conteo de especies de algas en el Fitoplancton entre los estanques 11 y 12.

Clase	Frecuencia	Abundancia relativa %
<i>Chlorella Sp</i> (Clorofita)	526,950	2.62
<i>Menochrysis sp</i> (Clorofita)	5,155,968	25.60
<i>Nannochloris sp</i> (Clorofitas)	2,492,976	12.38
<i>Anabaena sp</i> (Cianofita)	1,937,393	9.62
<i>Spirulina sp</i> (Cianofita)	720,628	3.58
<i>Microcystis sp</i> (Cianofita)	5,564,597	27.63
<i>Chaetocenos sp</i> (Diatomeas)	3,018,404	14.99
<i>Cocconeis sp</i> (Diatomeas)	102,296	0.51
<i>Bidulphia sp</i> (Diatomeas)	2,815	0.01
<i>Thollassiosira sp</i> (Diatomeas)	109,435	0.54
<i>Navicula sp</i> (Diatomeas)	238,126	1.18
<i>Pleurosigma sp</i> (Diatomeas)	105,600	0.52
<i>Amphora sp</i> (Diatomeas)	79,986	0.40
<i>Dunaliella sp</i> (clorofita)	806	0.00
<i>Diplonosis sp</i> (Diatomeas)	75,936	0.38
<i>Gyrodinium Sturiale</i> (Dinoflageladas)	6,850	0.03
<i>Ceratium sp</i> (Dinoflageladas)	1,038	0.01
total	20,139,804	100.00

Cuadro- A 83. Relación del comportamiento de la lluvias el fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 10 (T1).

Factores	UNIDADES	MUESTREO 1 24/4/2017	MUESTREO 2 22/5/2017	MUESTREO 3 19/6/2017	MUESTREO 4 17/7/2017
LLUVIA	(mm)	0.6	108.8	243.8	270.6
FOSFORO TOTAL	(mg/l)	3.37	8.28	7.97	3.07
NITROGENO TOTAL	(mg/l)	0.1	3.3	1.07	4.9
SALINIDAD	(mg/l)	20	21.75	15.25	9.2
CLOROFILA <u>a</u>	(mg/l)	2.845	0.268	54.71	0.0481

Cuadro- A 84. Relación del comportamiento de las lluvias, fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 11 (T2).

Factores	UNIDADES	MUESTREO 1 24/4/2017	MUESTREO 2 22/5/2017	MUESTREO 3 19/6/2017	MUESTREO 4 17/7/2017
LLUVIA	(mm)	0.6	108.8	243.8	270.6
FOSFORO TOTAL	(mg/l)	2.76	4	6.75	6.75
NITROGENO TOTAL	(mg/l)	0.6	1.7	1.73	7.6
SALINIDAD	(mg/l)	20	21.75	15.25	9.2
CLOROFILA <u>a</u>	(mg/l)	1.156	0.225	2.361	0.11232

Cuadro- A 85. Relación del comportamiento de las lluvias, fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 12 (T3).

Factores	UNIDADES	MUESTREO 1 24/4/2017	MUESTREO 2 22/5/2017	MUESTREO 3 19/6/2017	MUESTREO 4 17/7/2017
LLUVIA	(mm)	0.6	108.8	243.8	270.6
FOSFORO TOTAL	(mg/l)	3.07	3.1	9.81	10.12
NITROGENO TOTAL	(mg/l)	0.7	3	1.3	6.1
SALINIDAD	(mg/l)	20	21.75	15.25	9.2
CLOROFILA <u>a</u>	(mg/l)	0.065	2.194	9.9	0.28944

Cuadro- A 86. Relación del comportamiento de las lluvias, fosforo total, nitrógeno total, salinidad y clorofila a para el estanque 13 (T4).

Factores	UNIDADES	MUESTREO 1 24/4/2017	MUESTREO 2 22/5/2017	MUESTREO 3 19/6/2017	MUESTREO 4 17/7/2017
LLUVIA	(mm)	0.6	108.8	243.8	270.6
FOSFORO TOTAL	(mg/l)	3.68	3.1	15.33	7.67
NITROGENO TOTAL	(mg/l)	0.6	3	1.91	8.1
SALINIDAD	(mg/l)	20	21.75	15.25	9.2
CLOROFILA <u>a</u>	(mg/l)	0.497	0.732	2.058	0.06

Cuadro- A 87. Componentes del Fitoplancton en Número de Células por mililitro entre los estanques 10 y 13.

ESTANQUE	COMPONENTES DEL FITOPLANCTON	CELULAS/ML
ESTANQUE 10 (T1)	Bacillariophytes y Chrysophytes (diatomeas)	1,316
	Chlorophytes (algas verdes)	821
	Cyanophytes (algas azul-verde)	220
	Dinophytes (dinoflagellates)	0
ESTANQUE 13 (T4)	Bacillariophytes y Chrysophytes (diatomeas)	1,512
	Chlorophytes (algas verdes)	4,907
	Cyanophytes (algas azul-verde)	930
	Dinophytes (dinoflagellates)	8

Cuadro- A 88. Componentes del Fitoplancton en Número de Células por mililitro entre los estanques 11 y 12.

ESTANQUE	COMPONENTES DEL FITOPLANCTON	CELULAS/ML
ESTANQUE 11 (T2)	Bacillariophytes y Chrysophytes (diatomeas)	8
	Chlorophytes (algas verdes)	1,831
	Cyanophytes (algas azul-verde)	322
	Dinophytes (dinoflagellates)	0.2
ESTANQUE 12 (T3)	Bacillariophytes y Chrysophytes (diatomeas)	2,220
	Chlorophytes (algas verdes)	2,998
	Cyanophytes (algas azul-verde)	7,923
	Dinophytes (dinoflagellates)	0

Cuadro- A 89. Hepatopáncreas, conteo de la deformación de Túbulos por estanque.

ESTANQUE	HEPATOPANCREAS / DEFORMACION DE LOS TUBULOS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	5	3	6	8	3	11	5	0	0	0
	MUESTREO 2	5	2	2	2	1	1	6	7	16	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	1	13	8	6	1	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	5	19	21	11	14	33	39	1	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	11	5	6	8	29	7	19	22	7	5
	MUESTREO 2	1	20	2	5	11	2	9	0	3	22
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	4	24	6	9	8	10	7	1	9	8
	MUESTREO 2	24	11	9	1	3	0	5	1	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 90. Conteo de Gregarinas en el intestino por cada estanque.

ESTANQUE	NUMERO DE GREGARINAS	INDI .1	INDI .2	INDI .3	INDI .4	INDI .5	INDI .6	INDI .7	INDI .8	INDI .9	INDI .10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	12	521	0	400	322	77	25	0	0	0
	MUESTREO 2	594	159	2	12	11	0	133	27	136	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	8	585	200	0	307	11	0	0	0	0
	MUESTREO 2	1	71	21	0	33	17	75	49	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	5	208	6	100	300	109	159	200	200	0
	MUESTREO 2	11	0	2	23	74	14	76	20	48	322
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	113	62	3	15	61	76	40	6	140	22
	MUESTREO 2	398	17	46	9	52	0	19	15	11	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 91. Nematodos por campo en intestino.

ESTANQUE	PRESENCIA DE NEMATODOS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 92. Numero de Cianofitas en intestino por estanque.

ESTANQUE	PRESENCIA DE CIANOFITAS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	0	13	12	20	0	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	47	12	13	22	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	MUESTREO 2	6	0	0	3	0	0	0	3	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 93. Necrosis en Branquias por cada estanque.

ESTANQUE	PRESENCIA DE NECROSIS EN BRANQUEAS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	2	2	2	3	1	0	3	0	0	0
	MUESTREO 2	1	14	0	0	2	4	1	0	0	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	3	84	7	21	2	12	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	22	2	2	20	39	1	50	3	2	22
	MUESTREO 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	6	108	15	14	13	28	18	6	22	12
	MUESTREO 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 94. Presencia de nódulos hemocíticos en branquias por cada estanque.

ESTANQUE	Presencia de nodulos hemocíticos en las branquias (organismos/campo)	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	3	10	4	0	0	2	2	0	0	0
	MUESTREO 2	0	3	8	0	1	1	1	5	5	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	21	85	2	2	0	4	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	4	31	43	17	3	10	9	5	3	8
	MUESTREO 2	0	0	0	0	3	1	1	1	0	0
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	0	32	20	5	4	4	26	37	42	20
	MUESTREO 2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 95. Protozoarios en Branquias por cada estanque.

ESTANQUE	PRESENCIA DE PROTOZOARIOS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	18	2	8	5	15	5	18	0	0	0
	MUESTREO 2	0	8	2	4	0	0	3	5	1	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	0	4	0	3	2	2	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	2	2	2	3	2	2	0	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	11	0	8	82	15	0	11	4	15	11
	MUESTREO 2	4	0	2	1	3	2	0	0	15	3
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	10	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	MUESTREO 2	3	1	0	1	3	1	1	2	1	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 96. Presencia de bacterias filamentosas en cada estanque.

ESTANQUE	PRESENCIA DE BACTERIAS FILAMENTAS	INDI. 1	INDI. 2	INDI. 3	INDI. 4	INDI. 5	INDI. 6	INDI. 7	INDI. 8	INDI. 9	INDI. 10
ESTANQUE 10 (T1)	MUESTREO 1	4	12	23	40	0	43	8	0	0	0
	MUESTREO 2	0	0	0	3	0	4	2	15	2	0
ESTANQUE 11 (T2)	MUESTREO 1	1	25	0	9	9	63	0	0	0	0
	MUESTREO 2	0	4	2	4	0	11	2	7	0	0
ESTANQUE 12 (T3)	MUESTREO 1	0	3	0	7	0	0	0	23	28	66
	MUESTREO 2	89	0	0	40	4	2	42	22	0	7
ESTANQUE 13 (T4)	MUESTREO 1	0	49	17	9	0	0	43	0	0	0
	MUESTREO 2	60	3	0	0	0	31	0	51	0	0

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 97. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco T1.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml*	Interpretación de resultado	Diagnóstico
						UFC/g**		
1	10	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.0x10 ²	Normal	--
					<i>Vibrio harveyi</i>	2.0x10 ²	Serio	Vibriosis
			Hepatopáncreas (HP)**	1/100	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.4x10 ⁶	Normal	--
					<i>Vibrio harveyii</i>	9.5x10 ⁵	Serio	Vibriosis
				1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
2	10	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
					HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.6x10 ⁶
			1/100	<i>Vibrio harveyi</i>		5.2x10 ⁶	Serio	Vibriosis
			1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--	
3	10	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
					HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.7x10 ⁶
			1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		7.8x10 ⁷	Serio	Vibriosis
			1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>		3.1x10 ⁷	Normal	--
			1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	9.4x10 ⁷	Serio	Vibriosis	
4	10	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
					HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.3x10 ⁶

				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	2.6×10^7	Serio	Vibriosis	
5	10	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	7.3×10^3	Normal	--	
				HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.1×10^8	Normal	--
					1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.8×10^8	Normal	--
6	10	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--	
				HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.3×10^7	Normal	--
					1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.2×10^6	Serio	Vibriosis
						<i>Vibrio harveyi</i>	5.4×10^6	Serio	Vibriosis
					1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.0×10^7	Normal	--
					1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.0×10^7	Serio	Vibriosis
						<i>Vibrio harveyi</i>	4.3×10^7	Normal	--
					7	10	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa
Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	7.0×10^1	Serio	Vibriosis					
HP**	1/100	--	0	No hubo crecimiento					--
	1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	1.6×10^6	Serio	Vibriosis				

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 98. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco T2.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	11	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio alginolyticus</i>	3.1x10 ²	Normal	--
			Hepatopáncre as (HP)**	1/100	<i>Vibrio alginolyticus</i>	4.8x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	4.0x10 ⁷	Normal	--
2	11	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	7.0x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.3x10 ⁷	Normal	--
3	11	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	6.1x10 ⁸	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.4x10 ⁹	Normal	--
4	11	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.0x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.3x10 ⁸	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.2x10 ⁷	Serio	Vibriosis
5	11	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	8.5x10 ³	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5.5x10 ²	Serio-normal	Vibriosis
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.6x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.7x10 ⁷	Normal	--
6	11	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.5x10 ¹		
				Siembra directa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.0x10 ²	Serio-normal	Vibriosis
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.2x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9.8x10 ⁷	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.4x10 ⁸	Serio	Vibriosis

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 99. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco del T3.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	12	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncreas (HP)**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
2	12	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.8x10 ⁸	Serio	Vibriosis
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
3	12	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.6x10 ⁴	Serio	Vibriosis
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.2x10 ⁹	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.6x10 ⁹	Normal	--
4	12	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	8.8x10 ¹	Normal	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.2x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.4x10 ⁷	Serio-normal	Vibriosis
5	12	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.0x10 ¹	Normal	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.4x10 ⁸	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.1x10 ⁸	Normal	--
6	12	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	3.5x10 ⁸	Serio	Vibriosis
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
7	12	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.4x10 ⁸	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7.6x10 ⁸	Serio	Vibriosis
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	++++	Normal	--

8	12	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	9.9×10^7	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.4×10^8	Normal	--
9	12	Camarón 9	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.1×10^8	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	6.5×10^7	Normal	--
10	12	Camarón 10	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	9.9×10^9	Normal	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 100. Conteo e interpretación del primer análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T4.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	13	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncre as (HP)**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
2	13	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.9x10 ¹⁰	Serio	Vibriosis
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
3	13	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	++++	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	Normal	--
4	13	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
5	13	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.3x10 ¹¹	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.8x10 ¹⁰	Serio	Vibriosis
6	13	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6.0x10 ⁹	Serio	Vibriosis
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
7	13	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
8	13	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	3.1x10 ⁹	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.4x10 ⁸	Serio	Vibriosis
9	13	Camarón 9	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.5x10 ³	Normal	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.4x10 ⁹	Serio	Vibriosis
				1/10000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.3x10 ⁹	Serio	Vibriosis
10	13	Camarón 10	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--

			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 101. Conteo e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T1.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	10	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncreas (HP)**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.2x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.8x10 ⁷	Serio	Vibriosis
					<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.2x10 ⁸	Normal	--
2	10	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.3x10 ⁷	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	1.4x10 ⁷	Serio	Vibriosis
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2.6x10 ⁷	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.1x10 ⁸	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.8x10 ⁷	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7.4x10 ⁷	Serio	Vibriosis
3	10	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	7.8x10 ⁷	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	2.4x10 ⁶	Serio	Vibriosis
4	10	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.7x10 ⁷	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	7.1x10 ⁶	Serio	Vibriosis
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.6x10 ⁶	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.4x10 ⁷	Normal	--
1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.1x10 ⁷	Serio	Vibriosis				
5	10	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.7x10 ⁵	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	4.4x10 ⁴	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.4x10 ⁵	Normal	--
6	10	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.0x10 ²	Normal	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.4x10 ⁶	Normal	--

				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.8x10 ⁶	Normal	--
7	10	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	6.5x10 ²	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	5.0x10 ²	Serio	Vibriosis
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	9.1x10 ²	Normal	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	7.8x10 ⁵	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	2.8x10 ⁴	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.9x10 ⁶	Normal	--
8	10	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	8.4x10 ³	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	4.1x10 ³	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi (bioluminiscente)</i>	9.5x10 ²	Serio-normal	Vibriosis
				Siembra directa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.5x10 ²	Serio	Vibriosis
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.4x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	3.8x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi (bioluminiscente)</i>	5.3x10 ⁵	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.3x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.3x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi (bioluminiscente)</i>	3.3x10 ⁵	Serio	Vibriosis
9	10	Camarón 9	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.0x10 ³	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	1.0x10 ²	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi (bioluminiscente)</i>	1.7x10 ¹	Serio-Normal	Vibriosis
				Siembra directa	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.0x10 ²	Serio	Vibriosis
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.6x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	6.9x10 ⁵	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.0x10 ⁴	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.7x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.2x10 ⁶	Normal	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 102. Cuento e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T2.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	11	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncreas (HP)**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	9.4x10 ⁵	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.8x10 ⁶	Normal	--
2	11	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.1x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	1.5x10 ⁶	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.3x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	3.4x10 ⁵	Serio	Vibriosis
3	11	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.7x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	1.2x10 ⁵	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.1x10 ⁶	Normal	--
4	11	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.7x10 ⁷	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	5.9x10 ⁵	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.5x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	9.4x10 ⁵	Normal	--
5	11	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	5.8x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	8.8x10 ⁵	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.3x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.6x10 ⁶	Normal	--
6	11	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.6x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	5.4x10 ⁵	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.0x10 ⁵	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	9.8x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.0x10 ⁶	Normal	--

7	11	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.3x10 ²	Normal	--
				Siembra directa	<i>Vibrio harveyi</i>	6.6x10 ¹	Normal	--
			HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.4x10 ⁶	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio harveyi</i>	7.8x10 ⁵	Normal	--
				1/100	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.4x10 ⁵	Serio	Vibriosis
				1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	9.1x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	2.1x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.3x10 ⁵	Serio	Vibriosis
8	11	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
				HP**	1/100	<i>Vibrio anginolyticus</i>	4.6x10 ⁶	Normal
			1/100		<i>Vibrio harveyi</i>	8.0x10 ⁵	Normal	--
			1/1000		<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.0x10 ⁷	Normal	--
			1/1000		<i>Vibrio harveyi</i>	1.7x10 ⁶	Normal	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 103. Cuento e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T3.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	12	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncreas (HP)**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.0x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	4.5x10 ⁵	Normal	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
2	12	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.8x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	8.3x10 ⁷	Normal	--
3	12	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	<i>Vibrio anginolyticus</i>	7.5x10 ¹	Normal	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	6.6x10 ⁹	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.3x10 ¹⁰	Normal	--
4	12	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
5	12	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
6	12	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
7	12	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	--		No hubo crecimiento	--
				1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
8	12	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.2x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--

9	12	Camarón 9	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.1x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
10	12	Camarón 10	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.8x10 ⁶	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.4x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 104. Cuento e interpretación del segundo análisis de la bacteriología del análisis en fresco para el T4.

N°	Est	Tipo de muestra		Dilución	Resultados			
					Bacteria	UFC/ml* UFC/g **	Interpretación de resultado	Diagnóstico
1	13	Camarón 1	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			Hepatopáncreas (HP)**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	1.5x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.0x10 ⁷	Normal	--
2	13	Camarón 2	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.4x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	3.8x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	6.7x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio harveyi</i>	7.0x10 ⁶	Normal	--
3	13	Camarón 3	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	5.4x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	6.2x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.1x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.1x10 ⁷	Normal	--
4	13	Camarón 4	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	3.1x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio anginolyticus</i>	2.6x10 ⁷	Normal	--
5	13	Camarón 5	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.6x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.1x10 ⁸	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio harveyi</i>	9.2x10 ⁶	Normal	--
6	13	Camarón 6	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	9.6x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	3.7x10 ⁷	Normal	--
7	13	Camarón 7	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	--	0	No hubo crecimiento	--
				1/10000	--	0	No hubo crecimiento	--
8	13	Camarón 8	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--

			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	3.2x10 ⁷	Normal	--
				1/1000	<i>Vibrio harveyi</i>	1.1x10 ⁶	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1.9x10 ⁸	Normal	--
9	13	Camarón 9	Hemolinfa*	Siembra directa	--	0	No hubo crecimiento	--
			HP**	1/1000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2.3x10 ⁷	Normal	--
				1/10000	<i>Vibrio alginolyticus</i>	4.3x10 ⁷	Normal	--

Fuente: Navarrete 2017.

Cuadro- A 105. Carga de *Vibrios* sp. En el intestino primer muestreo.

Estanque	Especie de vibrio	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Estanque 10 (T1)	<i>V. anginolyticus</i> (1/100)	6.10E+07	8.30E+07		7.30E+07	1.10E+09	6.50E+07				
	<i>V. anginolyticus</i> (1/1000)	2.60E+08	5.20E+07	1.10E+08	8.10E+07	1.20E+09	5.40E+07				
	<i>V. harveyi</i> (1/100)	5.70E+07	7.90E+08	1.30E+09	6.90E+08	9.20E+07	4.20E+08				
	<i>V. harveyi</i> (1/1000)			3.80E+09	5.20E+07		1.60E+08				
	<i>V. parahaemolyticus</i> (1/100)						3.80E+07				
	<i>V. parahaemolyticus</i> (1/1000)						5.40E+07				
Estanques	Especies de vibrios	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 11 (T2)	<i>v. alginolyticus</i> (1/100)	3.50E+09	1.10E+08	7.80E+09	3.90E+07	4.70E+07	1.10E+07				
	<i>v. alginolyticus</i> (1/1000)	9.40E+09		1.00E+09	5.60E+07		5.50E+08				
	<i>v. parahaemolyticus</i> (1/100)		4.30E+09	8.00E+08	1.10E+09	1.10E+08	1.60E+09				

	v. parahaemolyticus (1/1000)		1.00E+10	1.00E+09	1.10E+09	8.30E+09	5.00E+09				
Estanques	Especies de vibrios	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 12 (T3)	v. alginolyticus (1/10000)	6.00E+09		1.50E+11	3.80E+12	9.60E+08			6.60E+09		3.50E+05
	v. alginolyticus (1/100000)			5.90E+11	1.00E+12				1.10E+12		1.50E+05
	v. harveyi (1/10000)	3.40E+10				9.60E+08		4.00E+08	1.20E+09	2.20E+09	
	V. harveyi (1/100000)				5.10E+11						
	v. parahaemolyticus (1/10000)						1.10E+09				
	v. parahaemolyticus (1/100000)										
Estanque	Especie de vibrio	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Estanque 13 (T4)	V. anginolyticus (1/10000)									6.00E+10	
	V. anginolyticus (1/100000)				3.00E+13					4.40E+11	
	V. parahaemolyticus (1/10000)	3.10E+11	7.40E+11			5.80E+11					
	V. parahaemolyticus (1/100000)	3.20E+11				1.00E+12		3.10E+11			

Fuente: Granja "Las Ánimas".

Cuadro- A 106. Carga de *Vibrio* sp. en intestino segundo muestreo.

Estanque	Especie de vibrio	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 10 (T1)	v. alginolyticus (1/100)	4.50E+08	7.80E+08	6.20E+08	7.20E+10	5.90E+09	3.30E+09	2.60E+08	8.40E+08	8.80E+08	
	v. alginolyticus (1/1000)	6.70E+08	2.90E+09	1.50E+09	8.50E+10	2.00E+10	1.80E+10	9.00E+09	2.40E+08	8.90E+08	
	v. parahaemolyticus (1/100)				1.00E+09		2.20E+08	6.10E+07	2.40E+08	9.50E+07	
	v. parahaemolyticus (1/1000)						4.90E+08	2.30E+08		6.30E+07	
	v. harveyi (1/100)	2.10E+08	4.50E+08	3.10E+08		8.30E+08		1.00E+08	4.80E+08	3.60E+09	
	V. harveyi (1/1000)	3.30E+08	2.60E+09	6.50E+08		5.00E+09		1.40E+08		4.90E+09	
	V. harveyi bioluminiscete (1/100)					3.20E+08	8.60E+08			1.40E+08	
	v. harveyi bioluminiscete (1/1000)					4.40E+08	2.80E+09			1.20E+08	
Estanque	Especie de Vibrio	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 11 (T2)	v. alginolyticus	4.50E+09	4.00E+08	2.10E+08	7.00E+09	4.40E+09	1.70E+09	6.40E+09			
		5.10E+09	2.00E+09	7.80E+08	3.80E+10	3.80E+08	2.30E+10	7.90E+09			
	V. parahaemolyticus				2.00E+08		1.50E+08	6.00E+08			
							3.50E+09	2.40E+08			
	V. harveyi		2.20E+08	1.00E+08	1.10E+09	8.80E+08	2.10E+08	8.60E+08			
			2.00E+08	3.90E+09	8.30E+09	1.90E+09	5.30E+02	2.8+9			
v. harveyi bioluminiscete					1.70E+08						

Estanque	Especie de Vibrio	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 12 (T3)	V. alginolyticus		2.70E+10		1.20E+11				3.20E+08	3.60E+09	5.20E+09
			2.50E+10		1.10E+11						5.00E+09
	v. harveyi		2.20E+09		1.10E+11						1.50E+09
					1.60E+11						
Estanque	Especie de vibrio	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 13 (T4)	v. alginolyticus (1/10000)	3.00E+10	2.40E+11	2.80E+11	6.50E+11	1.00E+11	4.00E+10	5.00E+10	6.20E+10	7.30E+11	
	v. alginolyticus (1/100000)	1.40E+11	5.70E+11	3.90E+11	1.10E+11	1.20E+11		5.00E+10	3.80E+10	3.10E+11	
	v. harveyi (1/10000)		2.60E+10	1.90E+10		3.00E+10					
	v. harveyi (1/100000)		5.30E+10	2.40E+10							

Cuadro- A 107. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio con Probiotico comercial primer muestreo.

Estanque M1	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 10 (T1)	<i>Lactobacillus</i> spp	1/10		5.20E+05					2.20E+06			
Estanque M1	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 11 (T2)	<i>Lactobacillus</i> spp	1/10		2.50E+06								

Fuente: Granja "Las Ánimas 2017."

Cuadro- A 108. Comparación de la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos al estudio con Probiotico comercial Segundo muestreo.

Estanque M2	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 10 (T1)	<i>Lactobacillus</i> spp	1/10			1.40E+06		8.90 E+06					
	<i>Lactobacillus</i> spp	1/100							1.40 E+07			
Estanque M2	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 11 (T2)	<i>Lactobacillus</i> spp	1/10				6.90 E+06					9.60 E+06	

Fuente: Granja "Las Ánimas 2017".

Cuadro- A 109. Concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos a tratamiento con las mismas en los T2 y T3. Primer muestreo.

Estanques	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 12 (T3)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1/1000	3.40E+09		9.10E+09	1.60E+10	3.20E+09		7.40E+09	1.70E+10		1.40E+08
		1/10000		1.10E+10	1.90E+10	5.60E+16	9.60E+08	1.80E+10	1.10E+10		5.70E+09	1.40E+11
		1/100000		6.80E+11	1.80E+10	1.00E+12	2.20E+12				5.70E+09	5.20E+12
Estanques	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 13 (T4)	<i>Lactococcus lactis</i>	1/1000		4.90E+08	1.30E+10	2.50E+09	2.10E+08		1.30E+08			
		1/10000	3.90E+10	4.90E+09	1.90E+12		5.30E+08	3.70E+09			7.10E+08	
		1/100000			3.10E+11	4.00E+10	4.20E+10	1.30E+10				

Fuente: Granjas "Las Ánimas 2017".

Cuadro- A 110. Concentración de bacterias ácido lácticas presentes en el tracto intestinal de camarones sometidos a tratamiento con las mismas en los T2 y T3. Segundo muestreo.

Estanques	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 12 (T3)	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1/1,000	4.70E+09	1.00E+10	3.00E+10	5.60E+11	4.70E+09	1.00E+11	7.10E+08	5.00E+09	9.20E+09	
		1/10,000	3.50E+10	2.60E+10	1.10E+11	5.90E+11	6.20E+11	5.60E+11	4.00E+09	1.10E+12	3.10E+04	
		1/100,000	2.50E+11	1.40E+12	1.60E+13	2.30E+12	2.20E+13	4.70E+13	1.10E+11	1.50E+13		4.20E+08
Estanques	Bacteria ácido láctica	Dilución	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10
Estanque 13 (T4)	<i>Lactococcus lactis</i>	1/1,000	5.50E+10	5.60E+09	9.60E+09		5.10E+10	7.20E+09	2.40E+08	6.30E+10	2.50E+10	
		1/10,000	1.10E+11	1.30E+10	9.80E+09	4.10E+10	1.40E+11	2.70E+10	1.50E+10	1.40E+11	5.70E+10	
		1/100,000	8.30E+11	3.20E+10			2.60E+11		8.80E+10	1.00E+12	5.20E+10	

Fuente: Granja "Las Ánimas 2017".

Cuadro- A 111. T Student para Porcentaje de Supervivencia semanal entre los T1 y T4.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	SOBREVIVENCIA %	SOBREVIVENCIA 4 %	10	11.30	10.59	3.73	18.87	3.37	0.0082

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	SOBREVIVENCIA %	SOBREVIVENCIA 4 %
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	72.49	61.19
T1	T4	D.E.	12.97	12.54
T1	T4	Var (n-1)	168.21	157.25
T1	T4	Var (n)	151.39	141.52
T1	T4	CV	17.89	20.49
T1	T4	Mín	54.31	47.19
T1	T4	Máx	87.70	80.58

Cuadro- A 112. Comparación del comportamiento del porcentaje de supervivencia entre los T1 y T4.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	87.7	84.15	82.69	82	81.51	74.87	61.13	58.76	57.76	54.31
ESTANQUE 13 (T4)	87.3	80.58	74.13	72.69	71.05	61.89	55.45	52.18	49.54	47.19

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 113. T Student para porcentaje de sobrevivencia semanal entre los T2 y T3.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	SOBREVIVENCIA 2 %	SOBREVIVENCIA 3 %	10	0.65	6.98	-4.34	5.64	0.30	0.7739

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	SOBREVIVENCIA 2 %	SOBREVIVENCIA 3 %
T2	T3	n	10.00	10.00
T2	T3	Media	65.66	65.00
T2	T3	D.E.	15.47	8.90
T2	T3	Var (n-1)	239.34	79.19
T2	T3	Var (n)	215.41	71.27
T2	T3	CV	23.56	13.69
T2	T3	Mín	44.51	51.78
T2	T3	Máx	89.11	78.21

Cuadro- A 114. Comparación del comportamiento del porcentaje de sobrevivencia semanal entre los T2 y T3.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	89.11	84.02	82.19	70.45	66.18	60.26	57.07	53.88	48.88	44.51
ESTANQUE 12 (T3)	78.21	74.48	72.13	69.67	66.58	65.49	60.13	57.23	54.32	51.78

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 115. T Student para Población en número de individuos entre los T1 y T4

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	POBLACION NUMERO DE INDIVI..	POBLACION NUMERO DE INDIVI..	10	453276.00	76225.53	398747.55	507804.45	18.80	<0.0001

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	POBLACION NUMERO DE INDIVI..	POBLACION NUMERO DE INDIVI..
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	1293570.00	840294.00
T1	T4	D.E.	233394.03	178668.36
T1	T4	Var (n-1)	54472775400.00	31922382960.00
T1	T4	Var (n)	49025497860.00	28730144664.00
T1	T4	CV	18.04	21.26
T1	T4	Mín	967140.00	608400.00
T1	T4	Máx	1561680.00	1122030.00

Cuadro- A 116. Comparación del comportamiento de la población en cuanto al número de individuos para T1 y T4.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	1561680	1498500	1472580	1461240	1451520	1451520	1088640	1046520	1028700	967140
ESTANQUE 13 (T4)	1122030	1038960	955890	937170	916110	797940	714870	672750	638820	608400

Fuente: Granja “Las Ánimas” 2017.

Cuadro- A 117. T Student para población en número de individuos entre los T2 y T3.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral		
T2	T3	POBLACION	NUMERO DE INDIV..	PIOBLACION	NUMERO DE INDIV..	10	181106.00	126287.64	90765.28	271446.72	4.53	0.0014

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	POBLACION	NUMERO DE INDIV..	PIOBLACION	NUMERO DE INDIV..
T2	T3	n		10.00		10.00
T2	T3	Media		936064.00		754958.00
T2	T3	D.E.		225574.80		103362.72
T2	T3	Var (n-1)		50883989048.89		10683852773.33
T2	T3	Var (n)		45795590144.00		9615467496.00
T2	T3	CV		24.10		13.69
T2	T3	Mín		625920.00		601350.00
T2	T3	Máx		1253120.00		908355.00

Cuadro- A 118. Comparación del comportamiento de la población en cuanto al número de individuos para T2 y T3

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	1253120	1181440	1155840	1118720	930560	847360	802560	757760	687360	625920
ESTANQUE 12 (T3)	908355	865100	837670	809185	773315	760655	698410	664650	630890	601350

Fuente: Granja “Las Ánimas” 2017.

Cuadro- A 119. T Student para la Biomasa (kg) entre los estanques T1 y T4.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	BIOMASA (kg)	BIOMASA 4(kg)	10	4466.09	13636.95	9170.86	2356.37	2780.45	6151.74	5.99	0.0002

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	BIOMASA (kg)	BIOMASA 4(kg)
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	13636.95	9170.86
T1	T4	D.E.	4374.33	2068.80
T1	T4	Var (n-1)	19134720.97	4279950.91
T1	T4	Var (n)	17221248.87	3851955.82
T1	T4	CV	32.08	22.56
T1	T4	Mín	6688.63	6223.63
T1	T4	Máx	19576.36	12091.36

Cuadro- A 120. Comparación de la Biomasa (kg) por semana entre los estanques T1 y T4.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	6702.27	8779.55	9597.73	11901.36	13517.27	14545.00	16038.18	16555.91	19169.55	19576.36
ESTANQUE 13 (T4)	6223.64	6230.91	7417.27	8670.00	9337.27	9650.91	9769.55	10520.91	11787.73	12091.36

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 121. T Student para Biomasa (kg) entre los estanques T2 y T3.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	Media(1)	Media(2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	BIOMASA 2 (kg)	BIOMASA 3 (kg)	10	441.23	9646.36	9205.13	1750.43	-810.95	1693.41	0.80	0.4459

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	BIOMASA 2 (kg)	BIOMASA 3 (kg)
T2	T3	n	10.00	10.00
T2	T3	Media	9646.36	9205.13
T2	T3	D.E.	3678.99	2944.49
T2	T3	Var (n-1)	13534944.27	8670017.63
T2	T3	Var (n)	12181449.85	7803015.87
T2	T3	CV	38.14	31.99
T2	T3	Mín	987.27	4610.90
T2	T3	Máx	13110.00	12847.72

Cuadro- A 122. Comparación del Comportamiento de la Biomasa (kg) entre los estanques T2 y T3.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	5532.73	7357.27	7626.36	10786.36	9121.36	10145.00	12069.09	12715.45	12545.45	13110.00
ESTANQUE 12 (T3)	4610.91	6140.91	7045.00	7388.64	7935.91	10228.64	11313.64	11818.18	12847.73	12721.82

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 123. T Student para Peso (grs) entre los T1 y T4.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	PESO (gr)	PESO 4 (gr)	10	-0.37	0.85	-0.97	0.24	-1.36	0.2058

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	PESO (gr)	PESO 4 (gr)
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	11.47	11.83
T1	T4	D.E.	5.60	5.00
T1	T4	Var (n-1)	31.38	25.04
T1	T4	Var (n)	28.25	22.54
T1	T4	CV	48.85	42.29
T1	T4	Min	4.30	5.54
T1	T4	Máx	20.28	19.85

Cuadro- A 124. Comparación del Peso (grs) semanal entre los T1 y T4.

ESTANQUE/ SEMANA DE MUESTREO	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	1.53	2.15	3.6	4.3	5.87	6.53	8.16	9.33	10.93	14.76	15.85	18.67	20.28
EATANQUE 13 (T4)	1.47	2.44	3.28	5.54	5.99	7.75	9.24	10.18	12.08	13.65	15.62	18.43	19.85

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 125. T Student para Peso (grs) entre los T2 y T3

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	PESO 2 (gr)	PESO 3 (gr)	10	-0.93	0.78	-1.48	-0.37	-3.77	0.0044

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	PESO 2 (gr)	PESO 3 (gr)
T2	T3	n	10.00	10.00
T2	T3	Media	11.95	12.88
T2	T3	D.E.	5.59	5.72
T2	T3	Var (n-1)	31.21	32.71
T2	T3	Var (n)	28.09	29.44
T2	T3	CV	46.75	44.41
T2	T3	Mín	4.41	5.07
T2	T3	Máx	20.92	21.13

Cuadro- A 126. Comparación del comportamiento del Peso (grs) semanal entre los T2 y T3.

ESTANQUE/ SEMANA DE MUESTREO	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	1.21	1.67	3.27	4.41	6.22	6.59	9.63	9.79	11.94	15.02	16.76	18.23	20.92
EATANQUE 12 (T3)	1.64	2.06	4.51	5.07	7.09	8.4	9.12	10.25	13.43	16.18	17.76	20.34	21.13

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 127. T Student para incremento de peso (grs) entre los T1 y T4.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	INCRE. PESO (gr)	INCRE. DE PESO 4 (gr)	10	0.01	1.10	-0.78	0.80	0.03	0.9756

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	INCRE. PESO (gr)	INCRE. DE PESO 4 (gr)
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	1.67	1.66
T1	T4	D.E.	0.97	0.66
T1	T4	Var (n-1)	0.95	0.44
T1	T4	Var (n)	0.86	0.39
T1	T4	CV	58.45	39.85
T1	T4	Mín	0.66	0.45
T1	T4	Máx	3.83	2.81

Cuadro- A 128. Comparación del comportamiento del incremento de peso (grs) entre los T1 y T4.

ESTANQUE/ SEMANA DE MUESTREO	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	0	0.62	1.45	0.7	1.57	0.66	1.63	1.17	1.6	3.83	1.09	2.82	1.61
EATANQUE 13 (T4)	0	0.97	0.84	2.26	0.45	1.76	1.49	0.94	1.9	1.57	1.97	2.81	1.42

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 129. T Student para incremento de peso (grs) entre losT2 y T3.

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	INCRE. DE PESO 2 (gr)	INCRE. DE PESO 3 (gr)	10	0.10	1.23	-0.77	0.98	0.27	0.7964

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	INCRE. DE PESO 2 (gr)	INCRE. DE PESO 3 (gr)
T2	T3	n	10.00	10.00
T2	T3	Media	1.77	1.66
T2	T3	D.E.	1.02	0.93
T2	T3	Var (n-1)	1.04	0.86
T2	T3	Var (n)	0.94	0.77
T2	T3	CV	57.78	55.78
T2	T3	Mín	0.16	0.56
T2	T3	Máx	3.08	3.18

Cuadro- A 130. Comparación del comportamiento semanal del incremento de peso (grs) entre los T2 y T3.

ESTANQUE/ SEMANA DE MUESTREO	SEM 3	SEM 4	SEM 5	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	0	0.46	1.6	1.14	1.81	0.37	3.04	0.16	2.15	3.08	1.74	1.47	2.69
ESTANQUE 12 (T3)	0	0.42	2.45	0.56	2.02	1.31	0.72	1.13	3.18	2.75	1.58	2.58	1.42

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 131. T Student para Factor de conversión Alimenticia entre los T1 y T4

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T1	T4	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	10	-0.12	0.11	-0.20	-0.04	-3.51	0.0067

Medidas resumen

TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 4	Resumen	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..
T1	T4	n	10.00	10.00
T1	T4	Media	1.08	1.20
T1	T4	D.E.	0.20	0.30
T1	T4	Var(n-1)	0.04	0.09
T1	T4	Var(n)	0.04	0.08
T1	T4	CV	18.67	25.17
T1	T4	Mín	0.79	0.69
T1	T4	Máx	1.36	1.62

Cuadro- A 132. Comparación del factor de conversión alimenticia entre los T1 y T4.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 10 (T1)	0.79	0.82	0.96	0.96	1.02	1.13	1.17	1.31	1.28	1.36
ESTANQUE 13 (T4)	0.69	0.92	1.01	1.02	1.11	1.25	1.32	1.52	1.53	1.62

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 133. T Student para Factor de conversión alimenticia entre los T2 y T3

Prueba T (muestras apareadas)

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Obs(1)	Obs(2)	N	media(dif)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	Bilateral
T2	T3	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	10	0.09	0.17	-0.03	0.21	1.71	0.1218

Medidas resumen

TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	Resumen	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..	FAC. CONVERSION ALIMENTICII..
T2	T3	n	10.00	10.00
T2	T3	Media	1.17	1.08
T2	T3	D.E.	0.28	0.13
T2	T3	Var(n-1)	0.08	0.02
T2	T3	Var(n)	0.07	0.02
T2	T3	CV	23.79	12.42
T2	T3	Mín	0.81	0.89
T2	T3	Máx	1.56	1.30

Cuadro- A 134. Comparación del Factor de conversión alimenticia entre los T2 y T3.

ESTANQUE / SEMANAS	SEM 6	SEM 7	SEM 8	SEM 9	SEM 10	SEM 11	SEM 12	SEM 13	SEM 14	SEM 15
ESTANQUE 11 (T2)	0.81	0.83	1.01	0.86	1.21	1.29	1.24	1.35	1.52	1.56
ESTANQUE 12 (T3)	0.91	0.89	0.95	1.05	1.16	1.05	1.09	1.17	1.2	1.3

Fuente: Granja "Las Ánimas" 2017.

Cuadro- A 135. Cantidad de Alimento proporcionado por cada estanque en quintales.

ESTANQUE	ALIMENTO PROPORCIONADO(Kg)									
	SEM 6 (46 ddc) 25/05/17	SEM 7 (53 ddc) 01/06/17	SEM 8 (60 ddc) 08/06/17	SEM 9 (67 ddc) 15/06/17	SEM 10 (74 ddc) 23/0617	SEM 11 (81 ddc) 30/06/17	SEM 12 (88 ddc) 07/07/17	SEM 13 (95 ddc) 14/07/17	SEM 14 (102 ddc) 21/07/17	SEM 15 (109 ddc) 28/07/17
10 (Testigo) G2 y PST	5,320.45	7,179.55	9,197.73	11,361.36	13,820.45	16,397.73	18,806.81	21,606.82	24,488.64	26,575.00
13 E33 y PST	4,313.64	5,745.45	7,490.90	8,831.81	10,325.00	12,038.64	13,861.36	15,984.09	17,984.09	19,529.55
11 (Testigo) G2 y PST	4,518.15	6,081.82	7,686.36	9,231.82	11,077.27	13,072.73	14,975.00	17,161.36	19,061.36	20,486.36
12 E91 y PST	4,190.91	5,440.91	6,695.45	7,772.73	9,243.18	10,727.27	12,270.45	13,863.64	15,368.18	16,584.09

Fuente: Granja "Las Ánimas 2017".

Cuadro- A 136. Cantidad de Probiotico G2 para los tratamientos testigos.

ESTANQUE	Epicin G2 (Gr)										TOTAL
	SEM 6 (46 ddc) 25/05/17	SEM 7 (53 ddc) 01/06/17	SEM 8 (60 ddc) 08/06/17	SEM 9 (67 ddc) 15/06/17	SEM 10 (74 ddc) 23/0617	SEM 11 (81 ddc) 30/06/17	SEM 12 (88 ddc) 07/07/17	SEM 13 (95 ddc) 14/07/17	SEM 14 (102 ddc) 21/07/17	SEM 15 (109 ddc) 28/07/17	
10 (Testigo) G2 y PST	11,705	15,795	20,235	24,995	30,405	36,075	41,375	47,535	53,875	58,465	340,460
11 (Testigo) G2 y PST	9,940	13,380	16,910	20,310	24,370	28,760	32,945	37,755	41,935	45,070	271,375

Fuente: Granja "Las Ánimas 2017".

Nota: La cantidad de EPICIN G2 y PST se calculó de acuerdo a la especificación de por cada quintal de alimento proporcionado se agregara 100 grs de cada uno de los elementos.

Cuadro- A 137. Tabla de interpretación antibiograma.

Características bioquímicas de varias especies de <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Plesiomonas shillitoi</i> y especies de <i>Photobacterium</i>	Características bioquímicas de varias especies de <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Plesiomonas shillitoi</i> y especies de <i>Photobacterium</i>															
	V. alginolyticus	V. anguillarum	V. cholerae	V. cincinnatiensis	V. damsela	V. fluvialis	V. furnessii	V. haerveyi	V. holvhielii	V. metchnikovii	V. mitsukurini	V. parahaemolyticus	V. vulnificus	A. hydrophila	P. shillitoi	E. photobacterium
Agar TCBS	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	Y	Y/G	NG	Y	G	G	Y	G	NG/G
Agar mPC	NG	NG	nd	P	nd	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
Medio AGS	KA	nd	nd	Ka	nd	nd	KK	KK	nd	Ka	KK	KA	KA	KK	nd	nd
Crecimiento en:																
0% de NaCl	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
3% de NaCl	+	+	+	-	+	V	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
6% de NaCl	+	+	+	-	-	-	V	+	V	-	V	-	-	-	-	-
8% de NaCl	+	-	+	-	-	-	V	+	V	-	V	-	-	-	-	-
10% de NaCl	+	-	+	-	-	-	V	+	V	-	V	-	-	-	-	-
Crecimiento a 42°C	+	-	nd	+	-	-	V	+	V	nd	V	+	+	V	+	+
Acido a partir de:																
sucrosa	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	-	-	V	-	V
D-celobiosa	-	+	+	-	+	+	+	+	nd	-	-	V	+	V	-	-
Lactosa	-	+	+	-	+	+	+	+	V	-	-	V	+	V	-	-
Arabinosa	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+
D-xarosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+
D-manitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	+	-	+	+	V	-	+	+	+	+	+	V
Voges-Proskauer	+	+	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Lisina descarboxilasa	+	-	+	+	+	V	-	-	+	-	+	+	+	V	+	V
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Sensibilidad a:																
10 µg de 0/129	R	S	R	S	R	S	R	R	R	nd	S	S	R	S	R	V
150 µg de 0/129	S	S	S	S	R	S	S	S	+	+	+	+	S	S	S	S
Gelatinasa	+	+	+	-	-	+	-	-	V	-	-	-	V	-	-	-
Ureasa	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

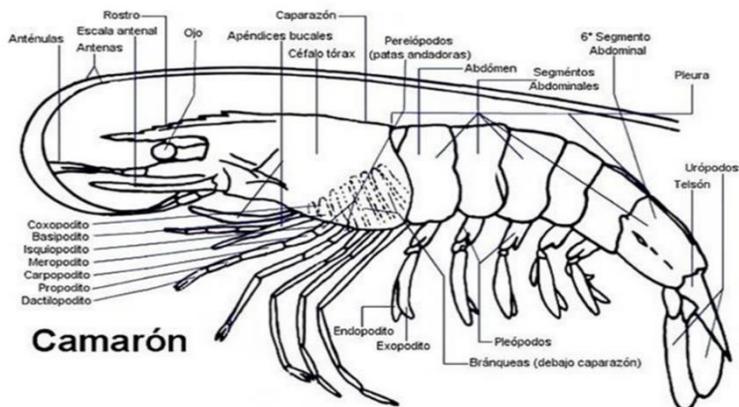


Figura - A 1. Camarón blanco (*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)).

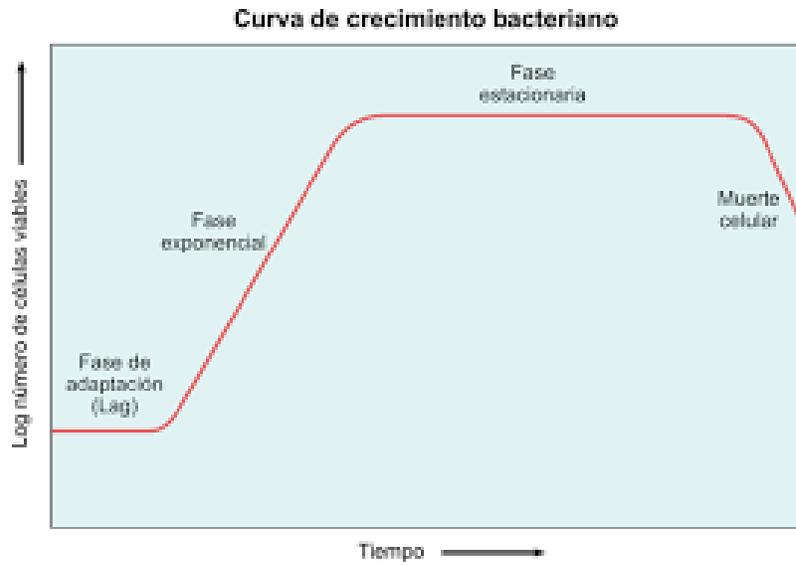


Figura - A 2 . Interpretación de la fase de crecimiento de una población bacteriana.



Figura - A 3. Mapas de ubicación del estudio.



Figura - A 4. Estanque de cultivo de camarón donde se observan las cuatro áreas para la selección de organismos en muestreo aleatorio y estanque de cultivo de camarón donde se observa muestreo aleatorio y el Contenedor con aireación donde se observan camarones muestreo aleatorio y el Contenedor con aireación donde se observan camarones vivos para análisis en frescos tomados en muestreo aleatorio. (Morales Covarrubias 2010).

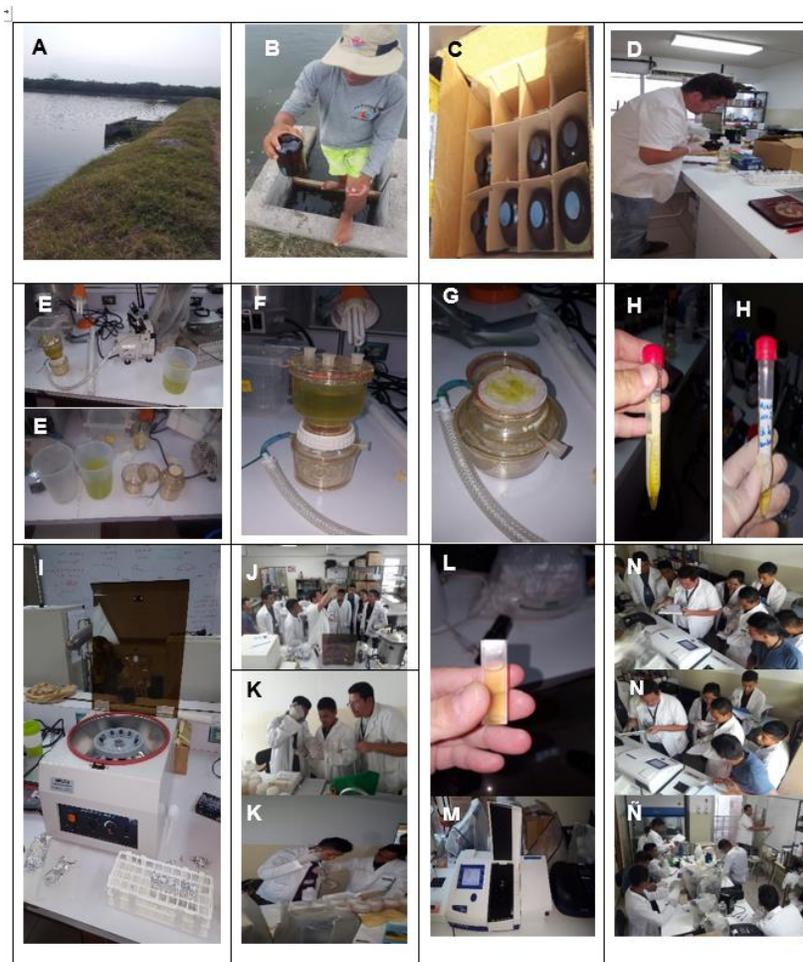


Figura - A 5. Proceso toma de muestra, procesamiento y análisis para clorofila *a*: **A:** selección del sitio cerca de la compuerta de salida; **B:** toma de muestra a 0.35 m; **C:** traslado de muestras en botellas color ámbar; **D:** instalando equipo para proceso de filtrado; **E:** equipo de filtrado de muestras de agua de los estanques; **F:** filtrado de agua de estanques con un filtro Buchner y papel filtro Whatman GF/F; **G:** recolección de muestra de componentes fotosintéticos en el papel filtro Whatman GF/F; **H:** doblado de papel filtro Whatman GF/F, colocación en un tubo Falcón con 10 ml de acetona HPLC y rotulación; **I:** centrifugado de muestras; **J:** obtención de muestras centrifugadas; **K:** extracción de sobrenadante del tubo Falcón; **L:** llenado de crioviales de 2.7 ml; **M:** colocación de crioviales de 2.7 ml en el espectrofotómetro multicelda; **N:** lectura de crioviales con la absorbancia, las longitudes de onda 630 nm, 645 nm, 665 nm y 750 nm y elaboración del cuadro de resultados; **N:** aplicación del procedimiento matemático para la obtención.

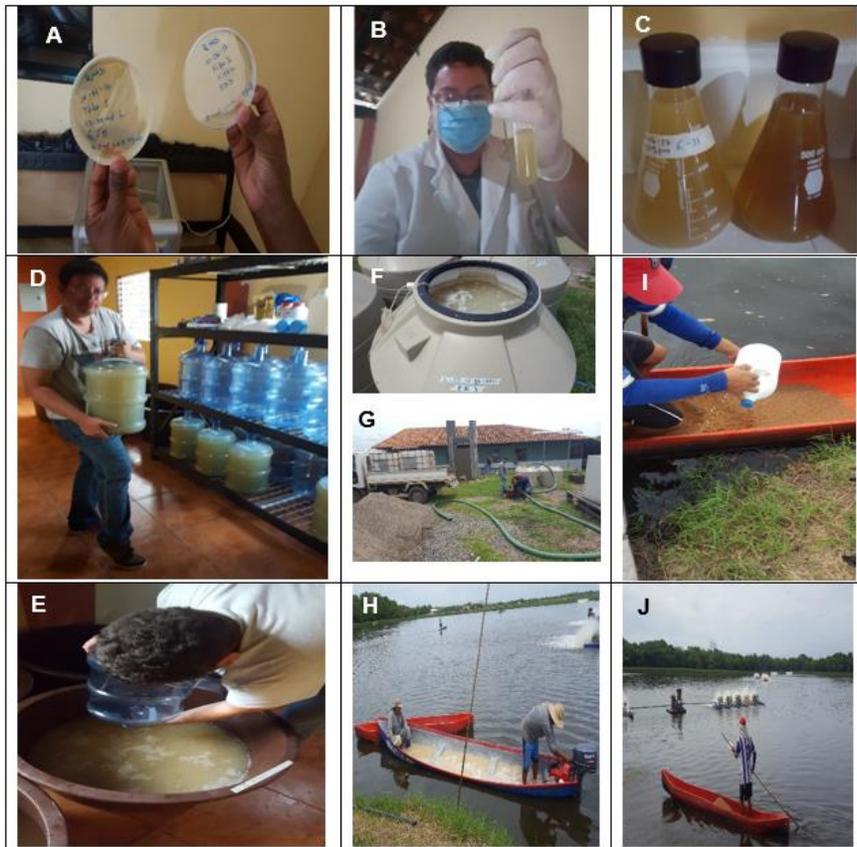


Figura - A 6. Secuencia del procedimiento de manejo de la cepas de bacterias ácido lácticas hasta la culminación con la aplicación en los estanques: **A:** cultivo en placa con agar RMS; **B:** transferencia de las colonias obtenidas en las placas Petri e inoculadas en tubos de ensayo conteniendo caldo de RMS; **C:** botellas de 500 ml con medio de cultivo sugerido por Navarrete 2017e inoculadas con lactobacillus obtenidos en los tubos; **D:** garrafones de 18 litros con el mismo medio de cultivo utilizado en las botellas e inoculado con lactobacillus; **E:** guacales de 72 litros con el mismo medio de cultivo utilizado en los garrafones e inoculados con lactobacillus; **F:** tinaco de 750 litros con el mismo medio de cultivo utilizado en las botellas e inoculado con lactobacillus; **G:** traslado del inoculo al estanque utilizando una bomba achicadora y dos tanques con capacidad de 1,000 litros cada uno; **H:** aplicación del inoculo utilizando una lancha con motor de fuera de borda de 5 HP; **I:** aplicación de 2.5 litros de inoculo por quintal de alimento peletizado; **J:** aplicación del alimento mezclado con el inoculo al voleo en el estanque.

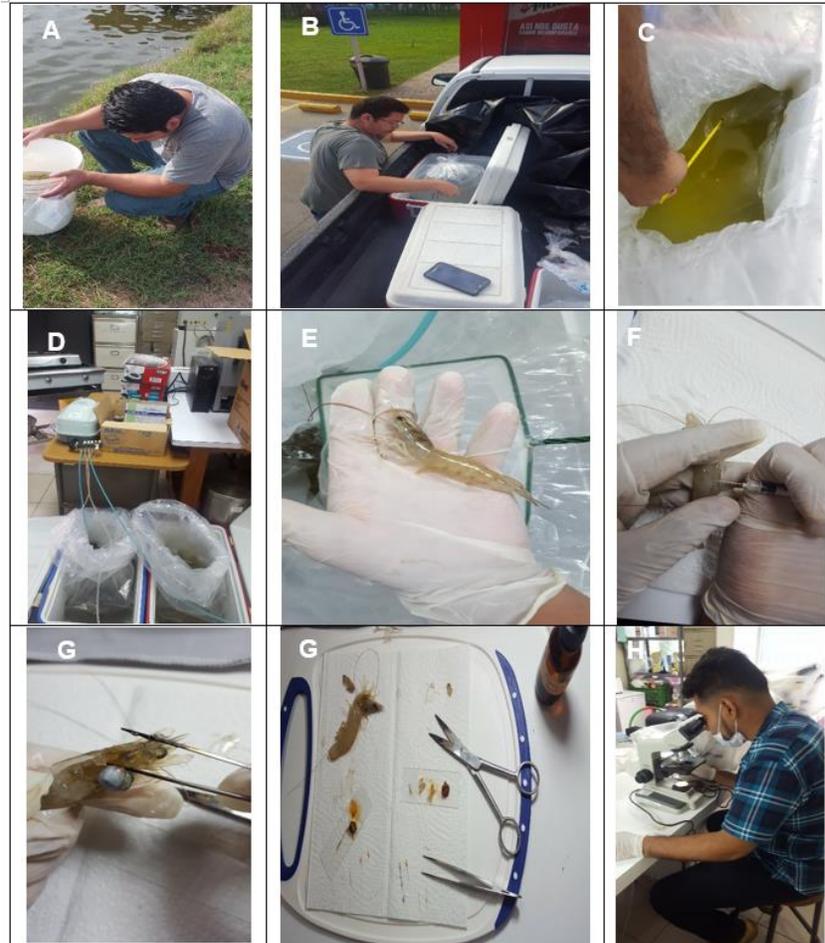


Figura - A 7. Procedimiento para realizar el análisis en fresco: A: recolección de muestras de camarón. B: colocación de muestras de camarón en bolsas con agua del estanque y aplicación de hielo, C: apertura de bolsas plásticas y medición de temperatura, D: colocación de aireación, E: extracción de muestras de camarón, F: extracción de hemolinfa, G: extracción de hepatopáncreas, intestino, ciego, branquias, urópodos, H: observación al microscopio.

Anexo 1. Metodología para la preparación de EPICIN PST

Preparación de 18 litros de medio de cultivo masivo:

Fórmula para preparar de 18 litros de medio de cultivo masivo para crecimiento de *Bacillus* sp. de la marca EPICIN PST.

Ingrediente	Especificación técnica	Cantidad
Epicin PST de Epicore®	Polvo liofilizado conteniendo bacterias aeróbicas, con fecha vigente de expiración o vencimiento.	5.0 gramos
Extracto de levadura	Extracto de levadura y levadura de cerveza inactiva, con un mínimo de 40% de proteína cruda, polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.	5.0 gramos
Urea (CO(NH₂)₂)	Calidad USP o grado comercial (de agro servicio), granulada o en polvo.	2.0 gramos
Fosfato de Potasio di básico (K₂HPO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.	1.0 gramo
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca pero se prefiere la primera pues no contiene bisulfito de sodio (agente blanqueador).	20 gramos
Agua	Dulce, limpia y desinfectada, libre de cloro o de cualquier agente desinfectante, no debe tener sólidos en suspensión.	18 litros

Fuente: Navarrete 2017

La cantidad de sal marina empleada en éste paso estará directamente vinculada a la salinidad del agua del estanque, aunque se recomienda que aun cuando se tratase del empleo de EPICIN PST en agua dulce o para estanque con salinidades muy bajas (época lluviosa), siempre debe agregarse sal de acuario o pues las bacterias necesitan éste compuesto; así lo exponen: 5.0 gramos de sal/litro (igual a decir una concentración de 5 partes por mil).

Preparación de 2,000 litros de medio de cultivo masivo:

Puede utilizarse Rotoplas® plásticos limpios, que originalmente hayan sido empleados únicamente para contener sustancias no tóxicas tales como plaguicidas o agentes químicos que contengan metales pesados. Los recipientes encontrados en el mercado nacional oscilan tener una capacidad de 2000 litros; tanques hechos de hierro-cemento y revestidos con

plástico o geomembrana también son una buena opción. Los barriles de metal no se recomiendan pues son vulnerables a la corrosión al estar expuestos a las sales utilizadas para el medio de cultivo.

Fórmula para preparar de 2,000 litros de medio de cultivo masivo para crecimiento de Bacillus sp. de la marca EPICIN PST. Fuente: elaboración propia.

Ingrediente	Especificación técnica	Cantidad
Extracto de levadura	Extracto de levadura y levadura de cerveza, seca, con un mínimo de 40% de proteína cruda, polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.	200 gramos
Urea	Calidad USP o grado comercial (de agro servicio), granulada o en polvo.	100 gramos
Fosfato de Potasio di básico	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.	40 gramos
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca pero se prefiere la primera pues no contiene bisulfito de sodio (agente blanqueador).	1,000 gramos
Agua	Dulce, limpia y desinfectada, libre de cloro o de cualquier agente desinfectante, no debe tener sólidos en suspensión.	2,000 litros

Para la preparación de 2,000 litros no se hizo necesario la aplicación de PST y G2 liofilizado pues ya se había hecho el primer inóculo.

Aplicación de probióticos y biorremediador del cultivo masivo en estanques:

Al cabo de 16 horas de incubación, el caldo de bacterias puesto contenido en una tina de 2,000 litros de capacidad, ya estuvo listo para ser aplicado en un estanque con un área de espejo de agua de entre 2 a 3.5 hectáreas, utilizando una lancha a motor fuera de borda de 5 HP y aplicado al voleo. La frecuencia de aplicación para cada uno de los estanques utilizados en el estudio fue de dos días. El volumen utilizado para PST fue de 1,000 de cada uno por estanque.

Previo a la siembra, durante la preparación del estanque:

Un proceso importante que sucede en el cultivo de camarón es la acumulación y descomposición de materia orgánica en los estanques. Las principales fuentes en la acuicultura lo constituyen los restos de microorganismos (fitoplancton, zooplancton y zoobentos) producidos dentro del estanque, así como las heces de los animales cultivados y el sobrante de alimento no consumido. Solamente una proporción relativamente pequeña menor al 10% de la materia orgánica se estima que se convierte en biomasa de camarones cosechados. El resto de la materia orgánica puede degradarse en dióxido de carbono por efecto de la descomposición hecha por las bacterias, otra cantidad puede evacuarse junto con el agua de recambio y otra cantidad puede llegar acumularse como sedimento en el fondo del estanque. Se aplicó 300 g PST siete días antes previos a la siembra de las post larva.

Anexo 2. Protocolo para la aplicación probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*).

Medio solido

En primer lugar se debe contar con agua destilada donde se disolverá el medio bacteriológico cuya presentación es un polvo fino, de color beige, y es de la siguiente forma:

Preparación del agua para el medio de cultivo:

Se tiene en cuenta la concentración de sal que tiene el estanque donde se hará la aplicación futura una vez se logre obtener el medio masivo: si las condiciones del agua del estanque tienen algún contenido de sal entonces deberá contar con éste dato de manera precisa pues al agua destilada se le adiciona sal de la misma que se usa para acuarios, sal instantánea.

Preparación del agar RMS:

1. Pesar 68.2 gramos de agar RMS marca MERCK®.
2. Se disuelven en un litro de solución salina preparada con sal de acuario.
3. Se disuelve vigorosamente hasta disolver por completo asegurándose de homogenizar.
4. Se somete a calor, a fuego moderado hasta hervir y en ese lapso se agita moderadamente para evitar que se pegue parte del medio en el fondo del recipiente, sin chamuscar ni quemar; si la solución se agita demasiado fuerte el punto de ebullición tardará demasiado en lograrse. A este paso se le denomina “fundir el medio”.

5. A continuación se tapa con papel aluminio o con tapón de rosca si el recipiente lo permite, se esteriliza en una olla de presión a 121°C durante 15 minutos una vez comienza el punto de ebullición.
6. Una vez completado el paso anterior se saca de la olla de presión el medio ya esterilizado se deja enfriar. Se prepara la mesa de trabajo desinfectando las superficies con alcohol etanol y se colocó dos mecheros para crear un campo de esterilización.
7. A continuación se vierte sobre placas Petri de plástico desechables, estériles y se deja que se solidifique antes de usarse.
8. Una vez enfriado y solidificado el medio contenido en las placas, se procedió a inocular cada una de éstas con un alícuota de 0.001 ml (10 µl) con la ayuda de un micro pipeteador y puntas estériles. Se procedió de inmediato al estriado empleando asas bacteriológicas en anillo. Se pusieron a incubar en un compartimiento improvisado hecho de vidrio y estructura de aluminio tipo “vitrina”, instalándole un bombillo eléctrico de 60 watts y dándole seguimiento con un termómetro de mercurio, de modo de asegurarse una temperatura de entre 28 a 32 °C.
9. Se da seguimiento al crecimiento de colonias en las placas con RMS y al cabo de 24 horas y una vez obtenidas las unidades formadoras de colonias (UFC), se procede a escoger algunas de éstas y se inoculan en tubos de ensayo con la ayuda de una asa bacteriológica en anillo y dos mecheros Bunsen para asegurar un campo estéril en el sitio de trabajo. Así como para esterilizar asas hasta el punto de ignición.

Medios líquidos para tubos de ensayo:

Preparación de caldo RMS marca MERCK®:

1. Pesar 52.2 gramos de caldo TS.
2. Se disuelven en un litro de agua destilada 33.5 g de sal de acuario.
3. Se disuelve vigorosamente hasta disolver por completo asegurándose de homogenizar.
4. Se somete a calor a fuego moderado hasta hervir y en ese lapso de agita moderadamente para evitar que se pegue parte del medio en el fondo del recipiente, sin chamuscar ni quemar; si la solución se agita demasiado fuerte el punto de ebullición tardará demasiado en lograrse. A este paso se le denomina “fundir el medio”.
5. Distribuir el caldo RMS ya fundido en tubos de ensayo con capacidad de 20 ml.
6. Se esteriliza en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos después del punto de ebullición.
7. Una vez sacados los tubos de ensayo de la olla de esterilización al haberse completado dicho proceso, se dejan enfriar por completo en un lugar limpio y aséptico.

8. A continuación cada uno de los tubos se inoculan con 0.2 ml de medio conteniendo cepa de *Lactobacillus*, con la ayuda de un micro pipeteador (utilizando puntas estériles), y se agita vigorosamente hasta homogenizar y se puso a incubar a temperatura ambiente. El tiempo de incubación estuvo entre 18 hasta 24 horas como máximo una vez se experimentó un cambio de viraje en el color del medio contenido en cada tubo: de un color ámbar brillante a un color turbio, blanquecino, “lechoso”.

Procedimiento para las botellas de 500 ml:

Una botella de 500 ml, con tapón y conteniendo medio de cultivo líquido, preparado según las especificaciones utilizadas y recomendadas por Navarrete 2017 y utilizado en el Laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión, es puesto a esterilización en baño de maría, durante 20 minutos una vez alcanza el punto de ebullición. Cuando las botellas fueron sacadas del baño de maría se dejaron enfriar y entonces es cuando están listas para ser inoculadas cada una con 2 tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo turbio, con crecimiento microbiano.

A continuación, es puesto a incubar a una temperatura ambiente que oscila entre 28°C a 34°C, sin aireación, por 16 horas, no demorando este tiempo por más de 24 horas para continuar con la siguiente transferencia hacia una garrafa de 18 litros. De no cumplirse con esto último se corre el riesgo que la población de *Lactobacillus spp.* entre en la fase estacionaria, y peor aún, que entre en una fase de caída, muerte por agotamiento de los nutrientes. Se agitaron al menos tres veces durante su incubación.

En ninguno de los pasos que suceden en el ambiente controlado tiene que haber un caldo con bacterias que despida un fuerte olor fétido, repulsivo y volátil, los lactobacilos, cuando crecen en grandes cantidades, se caracterizan porque sus caldos son ligeramente color crema o beige, con un fuerte olor a “fermento de cerveza”. Un olor fétido y desagradable puede ser indicativo de la predominancia de otros microorganismos exógenos que han llegado por contaminación del producto durante su almacenamiento o por contaminación cruzada en el laboratorio.

La fórmula para la preparación de un litro de medio de cultivo y que se utilizó en botellas de 500 ml fue como se describe a continuación:

Fórmula para preparar un litro de medio de cultivo en ambiente controlado con inóculo de bacterias ácido lácticas (inoculación de 18 a 24 horas).

Ingrediente	Especificación técnica	Requisito	Cantidad
Inóculo con lactobacilos	Medio líquido de caldo RMS conteniendo bacterias ácido lácticas nativas con $\geq 1.0 \times 10^9$ UFC/ml. Que sea de reciente elaboración. Puede mantenerse en refrigeración a temperatura de 4°C.	Medio axénico y específico para crecimiento de bacterias ácido lácticas.	40 ml
Harina de soya	En polvo, de las misma que se utiliza para la elaboración de piensos en aves, cerdos y vacunos.	Con gránulo muy fino para que sea afectiva, libre de hongos, alto contenido proteico, sin humedad.	10.0 gramos
Extracto de levadura	Polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.	Con un mínimo de 40% de proteína cruda.	2.0 gramos
Peptona buferada	Medio de pre enriquecimiento, generalista, para muchos géneros de bacterias.	Debe contener Peptona (10.0 g), Cloruro de sodio (5.0 g) pH 7.2	5.0 gramos
Fosfato de Potasio di básico (K₂HPO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		1.0 gramos
Sulfato de Magnesio (MgSO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		0.1 gramos
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca.	Preferiblemente, no debe contener bisulfito de sodio (agente blanqueador).	10.5 gramos
Sal marino	De la misma que se utiliza en acuarios como agua de mar artificial, instantánea, con fecha vigente en cuanto a período de vencimiento.	Libre de humedad	Según sea la salinidad del estanque

Fuente: Navarrete 2017.

Preparación de 18 litros de medio de cultivo masivo:

Fórmula para preparar de 18 litros de medio de cultivo masivo para crecimiento de *Lactobacillus* spp (inoculación de 18 a 24 horas).

Ingrediente	Especificación técnica	Requisito	Cantidad
Inóculo con lactobacilos	Medio líquido de caldo RMS conteniendo bacterias ácido lácticas nativas y $\geq 1.0 \times 10^9$ UFC/ml. Que sea de reciente elaboración. Puede mantenerse en refrigeración a temperatura de 4°C.	Medio axénico y específico para crecimiento de bacterias ácido lácticas.	1000 ml
Extracto de levadura	Extracto de levadura y levadura de cerveza inactiva, con un mínimo de 40% de proteína cruda, polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.		72.0 gramos
Harina de soya	En polvo, de la misma que se utiliza para la elaboración de piensos en aves, cerdos y vacunos.	Con gránulo muy fino para que sea afectiva, libre de hongos, alto contenido proteico, sin humedad.	180.0 gramos
Fosfato de Potasio di básico (K₂HPO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		36 gramos
Sulfato de Magnesio (MgSO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		3.6 gramos
Sal marina	De la misma que se utiliza en acuarios como agua de mar artificial, instantánea, con fecha vigente en cuanto a período de vencimiento.	Libre de humedad	Según sea la salinidad del estanque
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca pero se prefiere la primera pues no contiene bisulfito de sodio (agente blanqueador).		378 gramos
Agua	Dulce, limpia y desinfectada, libre de cloro o de cualquier agente desinfectante, no debe tener sólidos en suspensión.		18 litros

Fuente: Navarrete 2017.

La cantidad de sal marina empleada en éste paso estará directamente vinculada a la salinidad del agua del estanque, en agua dulce o para estanque con salinidades muy bajas (época lluviosa), siempre debe agregarse sal de acuario o pues las bacterias necesitan éste compuesto; así lo exponen: 5.0 gramos de sal/litro (igual a decir una concentración de 5 partes por mil).

Preparación de 72 litros de medio de cultivo masivo:

Fórmula para preparar de 72 litros de medio de cultivo masivo para crecimiento de *Lactobacillus* spp (inoculación de 18 a 24 horas).

Ingrediente	Especificación técnica	Requisito	Cantidad
Inóculo con lactobacilos	Medio líquido de caldo RMS conteniendo bacterias ácido lácticas nativas y $\geq 1.0 \times 10^9$ UFC/ml. Que sea de reciente elaboración. Puede mantenerse en refrigeración a temperatura de 4°C.	Medio axénico y específico para crecimiento de bacterias ácido lácticas.	18 litros
Extracto de levadura	Extracto de levadura y levadura de cerveza inactiva, con un mínimo de 40% de proteína cruda, polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.		288 gramos
Harina de soya	En polvo, de la misma que se utiliza para la elaboración de piensos en aves, cerdos y vacunos.	Con gránulo muy fino para que sea afectiva, libre de hongos, alto contenido proteico, sin humedad.	720 gramos
Fosfato de Potasio di básico (K₂HPO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		144 gramos
Sulfato de Magnesio (MgSO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		14.4 gramos
Sal marina	De la misma que se utiliza en acuarios como agua de mar artificial, instantánea, con fecha vigente en cuanto a período de vencimiento.	Libre de humedad	Según sea la salinidad del estanque
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca pero se prefiere la primera pues no contiene bisulfito de sodio (agente blanqueador).		1,512 gramos
Agua	Dulce, limpia y desinfectada, libre de cloro o de cualquier agente desinfectante, no debe tener sólidos en suspensión.		72 litros

Fuente: Navarrete 2017.

La cantidad de sal marina empleada en éste paso estará directamente vinculada a la salinidad del agua del estanque, en agua dulce o para estanque con salinidades muy bajas (época lluviosa), siempre debe agregarse sal de acuario o pues las bacterias necesitan éste compuesto; así lo exponen: 5.0 gramos de sal/litro (igual a decir una concentración de 5 partes por mil).

Fórmula para preparar de 750 litros de medio de cultivo masivo para crecimiento de *Lactobacillus spp* (inoculación de 18 a 24 horas).

Ingrediente	Especificación técnica	Requisito	Cantidad
Inóculo con lactobacilos	Medio líquido de caldo RMS conteniendo bacterias ácido lácticas nativas y $\geq 1.0 \times 10^9$ UFC/ml. Que sea de reciente elaboración. Puede mantenerse en refrigeración a temperatura de 4°C.	Medio axénico y específico para crecimiento de bacterias ácido lácticas.	72 litros
Extracto de levadura	Extracto de levadura y levadura de cerveza inactiva, con un mínimo de 40% de proteína cruda, polvo de coloración castaño claro, con fecha vigente de expiración o vencimiento. La mejor opción en cuanto a calidad y rendimiento bacteriano es el producto Nupro™ de Alltech®, pero puede emplearse cualquier levadura: de cerveza, de la misma que se utiliza en panadería.		1,500 gramos
Harina de soya	En polvo, de las misma que se utiliza para la elaboración de piensos en aves, cerdos y vacunos.	Con gránulo muy fino para que sea afectiva, libre de hongos, alto contenido proteico, sin humedad.	7,500 gramos
Fosfato de Potasio di básico (K₂HPO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		750 gramos
Sulfato de Magnesio (MgSO₄)	Calidad USP, en polvo, con fecha vigente de expiración o vencimiento.		75 gramos
Sal marina	De la misma que se utiliza en acuarios como agua de mar artificial, instantánea, con fecha vigente en cuanto a período de vencimiento.	Libre de humedad	Según sea la salinidad del estanque
Azúcar	De mesa, de caña de azúcar, puede ser morena o blanca pero se prefiere la primera pues no contiene bisulfito de sodio (agente blanqueador).		7,875 gramos
Agua	Dulce, limpia y desinfectada, libre de cloro o de cualquier agente desinfectante, no debe tener sólidos en suspensión.		750 litros

Fuente: Navarrete 2017.

La cantidad de sal marina empleada en éste paso estará directamente vinculada a la salinidad del agua del estanque, en agua dulce o para estanque con salinidades muy bajas (época lluviosa), siempre debe agregarse sal de acuario o pues las bacterias necesitan éste compuesto; así lo exponen: 5.0 gramos de sal/litro (igual a decir una concentración de 5 partes por mil).

Anexo 3. Metodología de bacteriología para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* spp. Sometidas a los antibióticos: prueba de Kirby-Bauer.

Preparación de material bacteriológico:

Limpieza y esterilización de material:

Cristalería y material descartable de laboratorio:

- 1) Se lavó con cepillos de cerdas finas y mango largo las paredes internas de los tubos de ensayo utilizando hipoclorito de sodio (lejía) al 37% de concentración.
- 2) Se escurrió el material una vez lavado y enjuagado con abundante agua del sistema de distribución con que cuenta el laboratorio y se procedió a colocar los tapones y dejándolos flojos para permitir el paso del vapor de esterilización.
- 3) Puestos a incubar en dos tipos de autoclave para esterilización a vapor con la ayuda de uno digital y automático, de marca Sturdy, modelo 232-X, y otro de manejo análogo de marca AML American, modelo SP 131325. El tiempo de esterilización fue por 15 minutos y sometido a 121°C.

Solución salina utilizada para el caldo de peptona:

- 1) Se preparó una solución salina al 2% (igual a decir 20 partes por mil) utilizando de la misma sal marina para reconstituir agua empleada en acuarios de la marca HEKA coral y sometida a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos. El propósito de dicha práctica es recrear a la mayor similitud posible el ambiente hialino en que viven las bacterias que se pretendían aislar y evitar de esta manera cualquier tensor ambiental como podría ser un cambio brusco de salinidad.
- 2) Una vez cumplido el tiempo de esterilización de la solución salina se procedió a llenar tubos de ensayo estériles con 10.0 ml de ésta solución y empleando una pipeta serológica, estéril, graduada y facilitando el tiempo de labor con el uso de un macro pipeteador eléctrico marca Jencons, modelo Powerpette Plus.

Caldo de peptona bacteriológica:

- 1) Se pesó 30.0 gramos de peptona bacteriológica y se mezcló en 1.000 ml de solución salina al 2%, con la misma descrita en el párrafo anterior. Se puso a esterilizar a 121°C por 15 minutos.

- 2) Se preparó tubos de ensayo estériles con 10.0 ml de caldo de peptona también estéril, recién sacada del autoclave y todo esto con la ayuda de una pipeta serológica, graduada y el empleo de un macro pipeteador eléctrico, de la marca Jencons, modelo Powerpette Plus.

Placas Petri con medio de agar Muller-Hinton:

El medio de cultivo bacteriológico seleccionado es utilizado para la prueba de Kirby-Bauer, de la marca Oxoid y preparado según las indicaciones del fabricante referidas en el manual de uso de la misma marca: se mezcló la cantidad de 38.0 gramos de agar Muller-Hinton por cada 1,000 ml de solución salina al 2%, mezclándolo hasta lograr por hasta lograr homogenizarlo por completo con el apoyo de un equipo de agitación electromagnética de la marca Thermo Scientific, modelo SP 131325. A continuación se verificó que el pH del medio fuese igual a 7.0 mediante el uso de paletas indicadoras con escala de color de la marca HYDRION.

- 1) El medio de cultivo de agar Muller-Hinton fue sometido a fundición puesto al fuego de la llama de una estufa de gas propano hasta lograr llevarlo al punto de ebullición.
- 2) De inmediato, el medio de cultivo de agar Muller-Hinton fue sometido a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez completada la esterilización fue puesto a enfriar a 50°C con el propósito de desintegrar algún grumo presente.
- 3) El medio de agar Muller-Hinton ya enfriado se vertió en cada uno de las placas Petri con la cantidad de aproximadamente 20 ml de medio pues se utilizó placas de 90 mm de diámetro, desechables, esterilizadas con radiación según la ficha técnica del fabricante.
- 4) El tiempo de espera necesario para poder utilizarlas fue justo el momento en que el medio ya estaba solidificado en cada una de las placas.

Procedimiento de inoculación de colonias bacterianas:

- 1) Cuando se tuvo hecho el análisis bacteriológico De las colonias aisladas de *Vibrio spp.* en el medio de agar TCBS, se recolecto con la ayuda de un asa bacteriológica en anillo, previamente esterilizada se inoculo en un tubo conteniendo peptona bacteriológica, estéril se homogenizo y luego se incubo a 32°C por 16 horas, después del periodo de incubación con ayuda de un hisopo de algodón, previamente esterilizado y una vez habiendo obtenido crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC), se procedió a escoger las colonias que pudieran estar más aisladas en la superficie de la placa, que tuviesen una caracterización fenotípica representativa de cada especie presente teniendo en cuenta el tamaño, forma, color, borde y grosor.

- 2) Se removieron cada una de las UFC seleccionadas con la ayuda de un asa bacteriológica en anillo, previamente esterilizada en incinerador hasta lograr la ignición y dejada enfriar. Se introdujo el contenido removido de cada UFC en un tubo de ensayo conteniendo peptona bacteriológica, estéril y cada tubo de ensayo se puso a incubar a 32°C por 16 horas. Se empleó un tubo de ensayo con caldo de peptona bacteriológica para solamente una UFC en particular seleccionada y removida.
- 3) Transcurridas las 16 horas de incubación se fueron seleccionando los tubos de ensayo que presentaron crecimiento bacteriano y por apreciación visual esto se dedujo al virar un cambio de color originalmente amarillo ámbar brillante de la peptona hacia un color turbio amarillo-blanquecino, más denso.
- 4) Con un hisopo de algodón, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos, se introdujo en cada tubo con crecimiento hasta humedecerlo por completo con el caldo más bacterias y se procedió de inmediato a inocular una placa con agar Muller-Hinton haciendo un estriado con el hisopo de manera uniforme en toda la superficie hasta asegurarse que no quedara espacio sin haber sido frotado.
- 5) Una vez hecho el estriado en la placa, se colocó en espacios equidistantes, discos de sensibilidad con los siguientes antibióticos en ese orden: agente Vibrio estático 0/129 (concentración de 10 micro gramos), Cloranfenicol (concentración de 10 micro gramos), Oxitetraciclina (30 micro gramos), Sulfametoxazole o Trimetroprim sulfa (concentración de 25 micro gramos), Enrofloxacina con su nombre comercial de Enroblend (concentración de 5 micro gramos) y Florfenicol con su nombre comercial como Florblend (concentración de 30 micro gramos).
- 6) Cada una de las placas con el medio Muller-Hinton ya inoculadas y puestos los discos de sensibilidad antes descritos, fueron incubadas a 32°C por un tiempo máximo de hasta 48 horas, según se iba observando el crecimiento bacteriano con halos de inhibición alrededor de los discos de sensibilidad según fuese el caso. A las 12 horas de incubación ya pudo observarse crecimiento en algunas placas pero fueron dejadas continuar en la incubadora de la marca Quincy Lab, Inc, modelo 12-140, hasta que en el caso de los halos de inhibición estuvieran bien claros y presentasen los bordes bien definidos.
- 7) Se hizo medición del diámetro de cada halo de inhibición utilizando una regla transparente, y el dato obtenido se anotó en unidades de milímetros.
- 8) Los datos obtenidos fueron comparados con tablas de referencia Tabla-Anexo 3-1 y Tabla-Anexo 3-2.

Interpretación de los diámetros de los halos de inhibición de los antibióticos (Tomado de Gil, B. 2014. Curso de patología e inmunología del camarón blanco. OIRSA. Panamá).

Antibiótico	Concentración (microgramo)	Resistente	Intermedio	Sensible
Cloranfenicol	10	≤ 12	13-17	≥ 18
Florfenicol	30	≤ 16	17-20	≥ 21
Sulfametoxazole	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Enrofloxacin	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Oxitetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Ácido nalidíxico	30	≤ 13	14-18	≥ 19

Criterio de sensibilidad de los halos de inhibición (tomado de National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, USA)

Grado de sensibilidad	Diámetro del halo de inhibición (en milímetros)
Resistente o no sensible	Menor o igual a 7 mm
Sensibilidad media	De 8 a 11 mm
Sensible	De 11 a 16 mm
Muy sensible	Mayor o igual a 17 mm

Anexo 4. Metodología de bacteriología para el aislamiento, identificación y cuantificación de bacterias del género *Vibrio Spp.* A partir de que muestra Camarones

Preparación de material Bacteriológico.

Limpieza y esterilización de material:

Cristalería y material descartable de laboratorio:

- 1) Se lavó con cepillos de cerdas finas y mango largo las paredes internas de los recipientes de cristalería utilizando hipoclorito de sodio (lejía) al 37% de concentración.
- 2) Se escurrió el material una vez lavado y enjuagado con abundante agua del sistema de distribución con que cuenta el laboratorio y se procedió a tapar con el uso de papel kraft para aquellos recipientes u objetos que no cuentan con tapón de rosca; los que tenían tapón fueron enroscados dejándolos flojos para permitir el paso del vapor de esterilización.
- 3) Puestos a incubar en dos tipos de autoclave para esterilización a vapor con la ayuda de uno digital y automático, de marca Sturdy, modelo 232-X, y otro de manejo análogo de

marca AML American, modelo SP 131325. El tiempo de esterilización fue por 15 minutos y sometido a 121°C.

- 4) Al momento de retirar el material contenido en los autoclaves, la efecto del vapor dejó con humedad tanto en el espacio interno de los recipientes, así como en el papel cobertor y se procedió a desecar hasta eliminar por completo cualquier residuo de agua con la ayuda de un horno de convección gravimétrica sometiéndolo a 70°C por un lapso máximo de 30 minutos.

Tubos de ensayo con solución salina utilizado para las diluciones:

- 1) Se preparó una solución salina al 20% (igual a decir 20 partes por mil) utilizando de la misma sal marina para reconstituir agua empleada en acuarios de la marca HEKA coral, y sometida a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos. El propósito de dicha práctica es recrear a la mayor similitud posible el ambiente hialino en que viven las bacterias que se pretendían aislar y evitar de esta manera cualquier tensor ambiental como podría ser un cambio brusco de salinidad que pudiese interferir en los procedimientos de laboratorio para el aislamiento, identificación y cuantificación de bacterias del género *Vibrio spp.*
- 2) Una vez cumplido el tiempo de esterilización de la solución salina se procedió a llenar tubos de ensayo estériles con 9.0 ml de ésta solución y empleando una pipeta serológica, estéril, graduada y facilitando el tiempo de labor con el uso de un macro pipeteador marca Jencons, modelo Powerpette Plus.

Placas Petri con medio de agar TCBS:

- 1) El medio de cultivo bacteriológico específico para bacterias del género *Vibrio spp.* empleado fue el agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sucrosa por sus siglas en inglés) de la marca Oxoid y preparado según las indicaciones del fabricante referidas en el manual de uso de la misma marca: se mezcló la cantidad de 88.0 gramos de medio TCBS por cada 1,000 ml de agua destilada esterilizada y hasta lograr homogenizar por completo con el apoyo de un equipo de agitación electromagnética de la marca Thermo Scientific, modelo SP131325. A continuación se verificó que el pH del medio fuese igual a 8.2 mediante el uso de paletas indicadoras con escala de color de la marca HYDRION.
- 2) El medio de cultivo de agar TCBS fue sometido a fundición sometiéndolo al fuego de la llama de una estufa de gas propano hasta lograr llevarlo al punto de ebullición. Nota aclaratoria: este medio nunca debe esterilizarse en autoclave.

- 3) De inmediato, el medio de cultivo de agar TCBS fue sometido a enfriamiento rápido colocándolo en un recipiente conteniendo agua fría y monitoreando su temperatura con la ayuda de un termómetro de vidrio hasta dejarlo reposado a 45-50°C.
- 4) El medio de agar TCBS ya enfriado se vertió en cada uno de las placas Petri con la cantidad de aproximadamente 20 ml de medio cuando se utilizó placas de 90 mm de diámetro, desechables, esterilizadas con radiación según la ficha técnica del fabricante.
- 5) El tiempo de espera necesario para poder utilizarlas fue justo el momento en que el medio ya estaba solidificado en cada una de las placas.

Anexo 5. Toma de datos para el análisis en fresco en camarones

Selección y toma de la muestra:

Se optó por hacer un muestreo no aleatorio, conocido también como muestreo dirigido, es decir, tomando en cuenta solamente los camarones vivos que pudieron presentar alguna signología alterada, tales como: hepatopáncreas con descoloración o pálidos, opacidad muscular, melanización, pleópodos y periópodos rojizos, etc.; es decir, que para el análisis en laboratorio solamente se escogieron aquellos organismos sospechosamente enfermos, tal y como lo sugiere Morales-Covarrubias (2013).

Se seleccionaron 10 organismos por cada estanque capturados con atarraya en el sitio de la compuerta de salida pues es aquí donde existe la mayor posibilidad de encontrar organismos enfermos. El número de la muestra tomado en cuenta se decidió según el criterio propuesto por Lightner 1996, modificado por Amos 1985 citado por Morales-Cobarrubias 2010. Se tomó en cuenta una prevalencia presuntiva de 20% y un tamaño de población mayor a 100,000 camarones presentes en el estanque.

Transporte de organismos:

- 1) Se tomó en cuenta la posibilidad de que durante el transporte algunos camarones pudieran morir y para asegurar que llegaran los suficientes organismos vivos al laboratorio se escogieron 40 camarones por cada estanque, distribuidos de la siguiente manera: 10 organismos vivos confinados en bolsa plástica conteniendo 18 litros de agua del mismo estanque, agregándole 4.0 gramos de alimento peletizado al 30% de contenido proteico y 12 miligramos por litro de Oxígeno puro en estado gaseoso.
- 2) Las bolsas selladas fueron depositadas en hieleras de plástico, de 65 litros de capacidad cada una, y añadiéndole hielo en cubos para lograr enfriar el agua a un rango de entre 19

a 22 °C con el objetivo de minimizar el metabolismo de los animales como una vía para reducir el estrés, literalmente “adormeciéndolos”.

- 3) El tiempo de recorrido desde la granja hasta las instalaciones del MEGATEC La Unión fue aproximadamente de 2.5 horas y la labor de enfriamiento del agua es crucial para lograr la mejor supervivencia de los animales en estudio. Esto pudo garantizar que las muestras, al momento de ser recibidas en el laboratorio no hubo suceso de mortalidad y las temperaturas fueron para la bolsa del estanque 10 de 20°C, estanque 11 de 22°C, estanque 12 de 19°C y el estanque 13 de 20°C.

Tratamiento de la muestra en el laboratorio:

- 4) El tratamiento de sostén de los animales en el laboratorio tuvo en cuenta mantener la aireación permanentemente con la ayuda de un compresor para acuario marca Attman, modelo 1800, de 10 salidas, junto con mangueras y piedras difusoras.
- 5) Se contó con la ayuda de personal auxiliar y asignándole a cada uno de ellos tareas específicas para agilizar el análisis lo más rápido posible teniendo en cuenta que los camarones son organismos delicados, propensos a estrés. Un operador fue designado exclusivamente para extraer cada uno de los camarones, no asignándole otra actividad para evitar problemas de contaminación cruzada en la manipulación de la muestra pues paralelamente y de manera simultánea también se hizo el procedimiento de bacteriología.
- 6) Cada camarón vivo, entero y aún sin disectar, fue pesado con la ayuda de una balanza digital marca AND, modelo HL-400, y cada dato fue registrado en un formulario elaborado para tal fin.
- 7) Una vez pesado cada camarón, fue transferido a un auxiliar designado para hacer la extracción de la hemolinfa como se describe a continuación: el camarón, con la ayuda de un frasco atomizador, se rocía con alcohol isopropílico al 90%, bañándolo en su totalidad y escurriéndolo en papel toalla. Se ubica el sitio donde se encuentra la base de cualquiera de los periópodos del último par ubicado en el cefalotórax y se hizo una punción superficial con una jeringa de insulina de 1 ml de capacidad. La extracción de la hemolinfa se logra rápidamente halando el émbolo y anotando el volumen extraído teniendo como referencia la escala graduada impresa en la jeringa. Cada segmento de la graduación equivale 0.02 ml pues tiene 50 divisiones que completan 1.0 ml en total. Esta muestra sirvió para su análisis bacteriológico en su totalidad.
- 8) De inmediato al finalizar el procedimiento descrito en el numeral anterior, contando con otro auxiliar con experticia comprobada fue designado para proceder a la disección de

cada organismo extrayendo una porción de branquia, el hepatopáncreas entero, el intestino medio y posterior completo; y un corte parcial de un urópodo específicamente del extremo distal.

Análisis en fresco del hepatopáncreas:

- 1) Una vez extraído, se pesó el órgano completo con la ayuda de una balanza analítica, marca AND, modelo HR-100 A, anotando el dato en un formulario. La observación de túbulos hepáticos y contenido de vacuolas lipídicas se logra al partir por la mitad el hepatopáncreas, puesto en una lámina porta objeto, sin utilizar lámina cubre objeto y volteando hacia arriba la parte cortada y procediendo de inmediato, lo más pronto posible a observarlo en un microscopio compuesto, marca MOTIC, modelo B1-220, seleccionando los objetivos 4X y 10 X. La otra mitad del hepatopáncreas se volvió a pesar en la balanza analítica, se anotó el dato y esta muestra fue destinada para el análisis bacteriológico.
- 2) Se hizo conteo de túbulos hepáticos con signología alterada que pudiera estar presente teniendo en cuenta el número de túbulos deformes por campo, túbulos vacíos por campo, necrosis y melanización tubular por campo. Una vez disectado el hepatopáncreas y cortado en más o menos partes iguales se deberá proceder lo más rápido posible a su observación para evitar que la acción enzimática contenida en dicho órgano comienza a interferir en el diagnóstico por el efecto de la acción proteolítica y lisis celular que degrada los tejidos.

Análisis en fresco de la branquia:

- 1) Tanto la branquia como el intestino y el urópodo se depositan en una lámina porta objeto y conviene humedecerlos de inmediato con gotas de solución salina al 2% (2.0 gramos de Cloruro de Sodio calidad USP en 100 ml de agua destilada) para evitar que por efecto del aire acondicionado la muestra pueda desecarse rápidamente haciéndola no válida para el análisis en fresco. La colocación de una lámina cubre objeto puede ser opcional a criterio del analista.
- 2) Utilizando el microscopio compuesto descrito en el numeral 9, e inmediatamente después de haber hecho el análisis del hepatopáncreas, se procedió a la observar la porción de branquia anotando el número de protozoarios, nódulos hemocíticos y bacterias filamentosas presentes por cada lamela branquial; se anotó el dato en su respectivo formulario.

Análisis en fresco del intestino medio y posterior:

- 1) Se debe procurar en la medida de lo posible de hacer una disección completa de este tramo intestinal y sobre todo extraer de forma íntegra el ciego o saco intestinal pues allí es donde muchas veces se encuentran la mayor cantidad de parásitos retenidos, aun cuando en el lapso del transporte y estancia en el laboratorio esperando los camarones ser procesados, gran parte de la carga de parásitos pudiera ser expulsado cuando el animal defeca.
- 2) Se hace un recorrido con el microscopio desde un extremo a otro y para lograr una buena cuantificación de parásitos el órgano debe estar lo más extendido posible en la lámina porta objeto. El órgano no debe ser aplastado ni debe tener cortes en su trayecto.
- 3) Con el objetivo 10X se hizo un barrido completo y por cada campo visual con la ayuda de un contómetro manual se procedió al conteo de gregarinas diferenciando cada una de sus distintas formas de estadio de su ciclo biológico y el conteo debió ser preciso para cada una de las formas de vida encontradas; se anotó el dato en el formulario respectivo y además, se tomó en cuenta cualquier otra forma de vida parasítica presente en la muestra, tales como nematodos, etc.
- 4) Por último, se pesa el órgano completo con la ayuda de una balanza analítica, se anota el dato y la muestra se transfirió al personal encargado de hacer el análisis bacteriológico.

Análisis en fresco del urópodo:

- 1) Utilizando los objetivos 4X y 10X, se observó el extremo distal del urópodo y valiéndose de las figuras presentadas por Morales-Covarrubias (2013) para tipificar los estadios de inter muda, pre muda, muda y post muda, se determinó el estado que cada uno de los camarones podía tener. Esta información sirve para el análisis de algún cuadro clínico encontrado en el diagnóstico pues se establece que precisamente en el período de la muda el camarón es vulnerable a los patógenos oportunistas debido a que su estado es relativamente inmuno deprimido; el gasto o costo energético que emplea para elaborar su nuevo exoesqueleto es la razón que explica lo anterior aparte de la exposición de su cuerpo literalmente “desnudo” en el fango o lodo del fondo del estanque debido a su naturaleza bentónica.

Procedimiento de Selección del sitio y toma de la muestra:

El análisis bacteriológico se hizo aplicándolo a los mismos camarones utilizados para el análisis en fresco, específicamente de la hemolinfa y el hepatopáncreas de cada organismo tal y como se describió en los numerales 7 y 9 respectivamente.

Análisis de la hemolinfa:

- 1) Una vez extraída la hemolinfa, ésta se inoculó directamente en un plato Petri con medio de agar TCBS y vaciando por completo todo el volumen extraído; a continuación se hizo un estriado en la placa empleando un asa de Digrafsky estéril, desechable. En este procedimiento no se hizo dilución de la muestra sino que fue una siembra directa, debido a la dificultad que presenta la hemolinfa de ser solubilizada pues el tiempo de coagulación sucede muy rápido e incluso a menudo suele tapar el conducto de la aguja que tiene la jeringa de no ser vaciada con prontitud sobre la placa Petri.
- 2) Se rotularon cada uno de las placas y se pusieron a incubar a 28°C, volteadas hacia abajo, en una incubadora de tipo análogo, marca Quincy Lab. Inc, modelo 12-140, por un lapso no menor a 16 horas, y sometidas a observación periódica según el resultado del crecimiento de las colonias que se iba obteniendo. En aquellas placas donde no hubo crecimiento en las primeras 16 horas, éstas se dejaron en incubación por un período máximo de hasta 48 horas.
- 3) Con las placas Petri donde hubo crecimiento de colonias, se procedió a continuación a hacer un conteo de las mismas con el apoyo de un equipo cuenta colonias marca Stuart, modelo SC-6, y anotando en su respectivo formulario todas aquellas características morfológicas más sobresalientes: color de la colonia, forma, diámetro o tamaño expresado en milímetros, forma del borde de la colonia, consistencia, presencia/ausencia de bioluminiscencia.
- 4) Los datos obtenidos fueron transformados de modo que los resultados han sido presentados como unidades formadoras de colonias por mililitro de hemolinfa (UFC/ml) y numéricamente expresados en unidades y una décima multiplicado por potencia de base 10 (Por ejemplo 2.3×10^2). Sirve a modo de explicación acerca del procedimiento empleado con el siguiente ejemplo:
Número de UFC: 19
Volumen de la hemolinfa extraída: 0.06 ml
Entonces para el cálculo de UFC/ml:
$$X = \frac{(1 \text{ ml}) (19 \text{ UFC})}{0.06 \text{ ml}} = 317 \text{ UFC/ml} = 3.1 \times 10^2 \text{ UFC/ml de hemolinfa}$$
- 5) Los datos finales fueron comparados con los valores que Gómez-Gil, B. (2006) y citado por Morales-Covarrubias, M. (2013) establece para un diagnóstico de vibriosis en camarones peneidos.

Análisis del hepatopáncreas:

Siguiendo con la marcha descrita en el numeral 9 de la sección del análisis en fresco donde se menciona que una vez partido en mitad el hepatopáncreas, una porción o mitad de éste fue pesado nuevamente en balanza analítica y transferido inmediatamente para su análisis bacteriológico como se describe a continuación:

- 1) Se depositó la porción del órgano en un tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml solución salina al 2 % (**ver sección para la preparación de tubos de ensayo**) estéril y con el empleo de un palillo de madera de extremo plano, estéril se procedió a macerarlo hasta deshacerlo por completo. Se homogenizó el sobrenadante con agitación vigorosa con la ayuda de un agitador tipo vortex, marca Scientific Industries, modelo 0560. Este tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 10 (expresado como 1/10).
- 2) Con un micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/10 y se inoculó otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral anterior. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 100 (expresado como 1/100).
- 3) Nuevamente, con el mismo micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una nueva punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/100 y se inoculó otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral 1. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 1,000 (expresado como 1/1,000).
- 4) Por último, y nuevamente con el mismo micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una nueva punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/1,000 y se inoculó otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral 1. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 10,000 (expresado como 1/10,000).
- 5) Una vez hechas las cuatro diluciones, se eligió los tubos 1/100, 1/1,000 y 1/10,000 para tomar una alícuota de 5 μ l (0.005 ml) de sobrenadante de cada uno de éstos y se inoculó o “sembró” en una placa Petri con TCBS destinada para cada alícuota extraída de cada tubo (3 placas en total denominadas placa 1/100, placa 1/1,000 y placa 1/10,000).

- 6) Se rotularon cada uno de las placas y se pusieron a incubar a 28°C, volteadas hacia abajo, en una incubadora de tipo análogo, marca Quincy Lab. Inc, modelo 12-140, por un lapso no menor a 16 horas, y sometidas a observación periódica según el resultado del crecimiento de las colonias que se iba obteniendo. En aquellas placas donde no hubo crecimiento en las primeras 16 horas, éstas se dejaron en incubación por un período máximo de hasta 48 horas.
- 7) Los datos obtenidos fueron transformados de modo que los resultados han sido presentados como unidades formadoras de colonias por gramo de hepatopáncreas (UFC/g) y numéricamente expresados en unidades y una décima multiplicado por potencia de base 10 (por ejemplo: 2.3 x 10⁵).

Pero a diferencia del análisis de hemolinfa, donde lo que se hizo fue una siembra directa; para el caso de la bacteriología del hepatopáncreas se hizo 4 diluciones por cada muestra y el resultado final entonces deberá tomar en cuenta el llamado “factor de dilución” (F.D.) para cada tubo de ensayo. El cálculo se obtiene de la siguiente formula:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volúmenes totales formados}}{\text{Alícuotas totales tomadas}}$$

Sirve a modo de explicación acerca del procedimiento empleado con el siguiente ejemplo:

Placa de TCBS: 1/100

Peso del hepatopáncreas (HP): 0.1904 gramo

Número de UFC: 96

Primer volumen formado: peso del HP + volumen de solución salina contenida en el tubo 1/10

Segundo volumen formado: la suma de 1 ml de alícuota tomada del tubo 1/10 y depositada en el tubo 1/100 + volumen de solución salina contenida en el tubo 1/100

Primera alícuota tomada: 0.1904 g

Segunda alícuota tomada: 1 ml

Tercera alícuota tomada: es el volumen de la alícuota inoculada en la placa de TCBS 1/100: 0.005 ml (igual a 5 µl)

Entonces para el cálculo del factor de dilución:

$$\text{F.D.} = \frac{(0.1904 \text{ g} + 9 \text{ ml}) (1 \text{ ml} + 9 \text{ ml})}{(0.1904 \text{ g}) (1 \text{ ml}) (0.005)} = \frac{91.904}{0.000952} = 96,537.815126$$

A continuación se procede a multiplicar el valor del factor de dilución por el número de UFC contabilizadas en la placa:

F.D. x UFC = (96,537.815126) (96) = 9, 267,630.252096 UFC/0.1904 gramo de hepatopáncreas

Es necesario determinar cuántas UFC existen en 1.0 gramo de hepatopáncreas:

$$X = \frac{(9, 267,630.252096 \text{ UFC}) (1.0 \text{ g})}{0.1904 \text{ g}} = 48,674,528.634957 / 1.0 \text{ gramo de hepatopáncreas}$$

Ahora deberá expresarse en potencia base 10:

48, 674,528.634957 UFC/g es igual a 4.8×10^7 UFC/g de hepatopáncreas

- 8) Los datos finales fueron comparados con los valores que Gómez-Gil, B. (2006) y citado por Morales-Covarrubias, M. (2013) establece para un diagnóstico de vibriosis en camarones peneidos. Para lograr tal cometido, la cuantificación solamente es posible si se emplean diluciones en el tratamiento de la muestra pues es lo que permite obtener crecimiento de colonias bien diferenciadas porque crecen unas muy separadas de las otras, el conteo se desarrolla sin ninguna dificultad y el morfotipo puede ser claramente tipificado.

Análisis del intestino medio y posterior:

Siguiendo con la marcha descrita en el numeral 16 de la sección del análisis en fresco donde se menciona que una vez se hizo la observación microscópica del órgano disectado, éste fue íntegramente pesado nuevamente en balanza analítica y transferido inmediatamente para su análisis bacteriológico como se describe a continuación:

- 1) Se depositó el órgano completo en un tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml solución salina al 2 % (**ver sección para la preparación de tubos de ensayo**) estéril y con el empleo de un palillo de madera de extremo plano, estéril se procedió a macerarlo hasta deshacerlo por completo. Se homogenizó el sobrenadante con agitación vigorosa con la ayuda de un agitador tipo vortex, marca Scientific Industries, modelo 0560. Este tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 10 (expresado como 1/10).
- 2) Con un micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μl (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/10 y se inoculó en otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo

equipo mencionado en el numeral anterior. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 100 (expresado como 1/100).

- 3) Nuevamente, con el mismo micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una nueva punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/100 y se inoculó en otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral 1. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 1,000 (expresado como 1/1,000).
- 4) De nuevo, con el mismo micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una nueva punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/1,000 y se inoculó en otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral 1. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 10,000 (expresado como 1/10,000).
- 5) Por último, con el mismo micro pipeteador de 1,000 micro litros de capacidad y empleando una nueva punta de plástico, estéril, desechable, se extrajo una alícuota de 1,000 μ l (1.0 ml) del sobrenadante del tubo denominado 1/10,000 y se inoculó en otro tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de solución salina al 2%, estéril. Se sometió a agitación vigorosa siempre utilizando el mismo equipo mencionado en el numeral 1. Este nuevo tubo de ensayo se denominó dilución 1 en 100,000 (expresado como 1/100,000). Existió la necesidad de hacer una dilución adicional debido a que éste tramo del tracto digestivo tiene una carga mucho mayor de bacterias si se compara con la que pudiese tener el hepatopáncreas y por lo tanto una dilución adicional podría facilitar mejor el conteo de UFC en placas cuando el número de éstas pudiese ser elevado.
- 6) Una vez hechas las cinco diluciones, se eligió los tubos 1/100, 1/1,000, 1/10,000 y 1/100,000 para tomar una alícuota de 5 μ l (0.005 ml) de sobrenadante de cada uno de éstos y se inoculó o “sembró” en una placa Petri con TCBS destinada para cada alícuota extraída de cada tubo (4 placas en total denominadas placa 1/100, placa 1/1,000, placa 1/10,000 y placa 1/100,000).
- 7) Se rotularon cada uno de las placas y se pusieron a incubar a 28°C, volteadas hacia abajo, en una incubadora de tipo análogo, marca Quincy Lab. Inc, modelo 12-140, por un lapso no menor a 16 horas, y sometidas a observación periódica según el resultado del crecimiento de las colonias que se iba obteniendo. En aquellas placas donde no hubo

crecimiento en las primeras 16 horas, éstas se dejaron en incubación por un período máximo de hasta 48 horas.

- 8) Los datos obtenidos fueron transformados de modo que los resultados han sido presentados como unidades formadoras de colonias por gramo de intestino (UFC/g) y numéricamente expresados en unidades y una décima multiplicado por potencia de base 10 (p.e., 2.3×10^2).

Pero a diferencia del análisis de hemolinfa, donde lo que se hizo fue una siembra directa; para el caso de la bacteriología del intestino medio y posterior se hizo 5 diluciones por cada muestra y el resultado final entonces tomó en cuenta el llamado “factor de dilución” (F.D.) para cada tubo de ensayo. El cálculo o procedimiento matemático se hizo de igual forma que el descrito en el numeral 7 de la sección alusiva al análisis bacteriológico del hepatopáncreas.

- 9) Los datos finales no pudieron ser comparados con los valores que Gómez-Gil, B. (2006) y citado por Morales-Covarrubias, M. (2013) establece para un diagnóstico de vibriosis en camarones peneidos, pues únicamente la referencia en mención es para UFC de vibrios presentes en la hemolinfa y el hepatopáncreas. Si fue importante obtener ésta información para un análisis comparativo acerca de la carga bacteriana de vibrios antes y posterior al tratamiento con los probióticos nativos ácido lácticos.

Anexo 6. Metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton presente en los estanques de camarón cultivado:

Toma de la muestra:

- 1) La hora más indicada para la toma de la muestra fue por la mañana, durante sol pleno, día bien iluminado y se descartó hacerlo en un día nublado.
- 2) Los mismos frascos descritos en la sección de metodología de clorofilas fueron empleados para la obtención de la muestra de células de fitoplancton, seleccionando frascos de vidrio color ámbar, limpios, lavados con desinfectante (lejía o lugol) y enjuagados con agua destilada.
- 3) Se seleccionó el sitio de la toma de la muestra en el estanque: la compuerta de entrada y la compuerta de salida, se procedió a tomar una muestra de agua introduciendo el frasco a una profundidad de al menos 0.35 metro, por la siguiente razón: es menos probable encontrar el fitoplancton en la capa superficial de la masa de agua debido a que en este sitio se experimenta la mayor temperatura como producto de los rayos del sol y, por

diferencias de densidad (el fitoplancton es más denso que el agua), la capa sub superficial es la que aloja la mayor cantidad de células fitoplanctónicas.

- 4) Una vez tomada la muestra, se procedió a fijarla para su conservación y evitar su deterioro añadiendo 23 gotas de solución de lugol para un volumen de agua de 1.0 litro contenido en cada frasco, agitándose vigorosamente hasta homogenizarla logrando una solución amarillenta.
- 5) Inmediatamente se alojaron los frascos en una hielera o caja, protegida de los rayos del sol, a temperatura ambiente y listas para su transporte, debidamente rotuladas.

Análisis en el laboratorio:

1. Las muestras contenidas en cada frasco se dejaron reposar por un espacio de 48 horas hasta lograr que las células fitoplanctónicas se fuesen depositando en el fondo.
2. Con la ayuda de una sonda de la misma que se usa en procedimientos médicos de venocllisis, limpia, no usada previamente y haciendo un sifón se separó el sobrenadante y se descartó pues se asume que la mayor parte del fitoplancton, aquel mayor a 4.0 micras de tamaño ya se encontraba depositado en el fondo del frasco.
3. Del material de la muestra depositado en el fondo y de manera aleatoria se tomó una muestra de 0.1 mililitro con la ayuda de un micro pipeteador de volumen ajustable y se depositó en una cámara de Sedwick-Rafter para el análisis microscópico.
4. Se utilizó un microscopio compuesto, marca Motic, modelo B1-220, y utilizando los objetivos 4X, 10X y 40X se hizo un barrido completo de la muestra para identificar y cuantificar los taxones del fitoplancton presentes tomando como referencia la guía de identificación taxonómica de Thomas (1997). Los conteos se hicieron auxiliándose de un contómetro manual y anotando los datos en su respectivo formulario.

Anexo 7. Descripción De La Metodología Para El Análisis De Clorofila a

Toma de la muestra:

- 1) La hora más indicada para la toma de la muestra es por la mañana, durante sol pleno, día bien iluminado y se descarta hacerlo en un día nublado.
- 2) Se utilizaron frascos de vidrio color ámbar limpios, lavados con desinfectante (lejía o lugol) y enjuagados con agua destilada.
- 3) Una vez se selecciona el sitio de la toma de la muestra en el estanque, se procede a tomar una muestra de agua introduciendo el frasco a una profundidad de al menos 0.35 metro,

por la siguiente razón: es menos probable encontrar el fitoplancton en la capa superficial de la masa de agua debido a que en este sitio se experimenta la mayor temperatura como producto de los rayos del sol y, por diferencias de densidad (el fitoplancton es más denso que el agua), la capa sub superficial es la que aloja la mayor cantidad de células fitoplanctónicas.

- 4) Una vez tomada la muestra, inmediatamente se alojan los frascos en una hielera o caja, protegida de los rayos del sol, a temperatura ambiente y listas para su transporte, debidamente rotuladas.

Análisis en el laboratorio:

- 1) Se coloca el agua de la muestra en un embudo Buchner e incorporando papel filtro Whatman GF/F, de 0.7 micras y 47 mm de diámetro, para lograr retener todas las células del fitoplancton que pudieran estar presentes.
- 2) Una vez se inicia el filtrado, se anota el volumen inicial depositado en el embudo Buchner, transcurrido cierto tiempo, se suspende la acción del filtrado y se anota el volumen final para poder determinar el volumen filtrado total. Este dato será tomado en cuenta al momento de hacer el cálculo según la fórmula sugerida por Strickland y Parson (1972).
- 3) El papel filtro conteniendo las células retenidas se retira del embudo Buchner, se dobla y se introduce en un tubo tipo Falcón, graduado (de 15 ml de capacidad), de plástico, conteniendo acetona anhídrida calidad HCPL por un período de entre 16 a 24 horas de reposo. Cada tubo tipo Falcón conteniendo el material filtrado deberá ser envuelto de manera inmediata en papel aluminio sin dejar espacios descubiertos.
- 4) Cuando ya se tienen todos los filtrados inmersos en cada tubo con acetona, éstos se colocan en la parte baja del refrigerador y se dejan reposar por el lapso antes mencionado. El propósito de este procedimiento es obtener el máximo de pigmentos fotosintéticos extraídos y solubilizados en la acetona.
- 5) Una vez transcurrido el tiempo de inmersión en acetona, se procede a retirar el papel filtro que está dentro de cada tubo haciendo uso de una pinza de disección de punta fina y previamente esterilizada en un mechero tipo Bunsen.
- 6) Se tiene especial cuidado de verificar que el volumen de acetona en cada tubo sea el mismo que el colocado al inicio pues por diversos motivos y teniendo en cuenta lo volátil que es este reactivo, parte de su contenido puede perderse y por eso es necesario hacer un ajuste añadiendo nuevamente la cantidad que sea necesaria.

- 7) A continuación, se procede a centrifugar las muestras contenidas en los tubos tipo Falcón, a 3,000 rpm durante un lapso de 3 minutos. El propósito de éste procedimiento es separar del sobrenadante toda aquella partícula de impureza que no sean pigmentos fotosintéticos que puedan estar presentes en la muestra. Después de éste procedimiento de centrifugado todas las impurezas quedarán asentadas en el fondo del tubo.
- 8) Haciendo uso de un micropipeteador, de volumen fijo, de 1,000 micro litros de capacidad y puntas de plástico, estériles se procede a depositar parte del sobrenadante filtrado extrayéndolo de la parte media de la columna de acetona conteniendo los pigmentos que está en cada tubo Falcón y se depositó en un vial de centelleo hasta aforar a la señal indicada que tiene cada uno, para el caso, cada vial de centelleo empleado tenía un máximo de 2.7 ml de capacidad.

Procedimiento de análisis espectrofotométrico:

- 1) Cada vial de centelleo conteniendo una muestra, se colocó en el carrusel multicelda de un espectrofotómetro de barrido, marca Jenway, modelo 6715, y se procedió a continuación hacer la lectura de absorbancia a 630 nanómetros, 645 nm, 665 nm y 750 nm. Previamente, el espectrofotómetro fue sometido a calibración utilizando un blanco de acetona anhídrida, calidad HPLC y llevando a un valor de absorbancia de 100%.
- 2) Se anotó cada dato arrojado por el equipo y se posteriormente se aplican estos datos en el cálculo de clorofilas aplicando la fórmula de Strickland y Parson (1972) para su análisis.

Anexo 8. 4500- P Fosforo total

4500- P C. Método colorímetro del ácido vanadomolibdofosforico

1. Discusión general

- a) **Principio:** en una solución diluida de ortofosfato, el molibdato amónico reacciona en condiciones acidas para formar un heteropoliácido, ácido molibdofosforico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosforico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato.
- b) **Interferencia:** sílice y arsénico interfieren positivamente solo cuando se calienta la muestra. Arseniato, fluoruro, torio, bismuto, sulfuro, tiosulfato, tiocianato o exceso de molibdato producen interferencias negativas. El hierro ferroso produce un color azul, pero no afecta a los resultados si su concentración es inferior a 100 mg/l.

- c) Concentración mínima detectable: la concentración mínima detectable es 200 $\mu\text{g P/l}$ en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm.

2. Instrumental

- a) Equipo colorímetro: espectrofotómetro, para uso a 400 a 490 nm.
b) Material de vidrio lavado al ácido: para determinar concentraciones bajas de fósforo.
c) Aparato de filtración y papel de filtro Whatman nº42 o equivalente.

3. Reactivos

- a) Solución acuosa de indicador de fenolftaleína.
b) Ácido clorhídrico. La concentración ácida no es crítica para la determinación, pero se recomienda una concentración final en la muestra 0,5 N.
c) Carbón activado Darco G60.
d) Reactivo vanadato- molibdato:
1) Solución A: disuélvase 25 g de molibdato amónico en 300 ml de agua destilada.
2) Solución B: disuélvase 1.25 g de metavanadato de amonio, calentándose hasta ebullición en 300 ml de agua destilada. Enfríese y añádanse 330 ml de HCl conc. Enfríese la solución B a temperatura ambiente, viértase la solución A sobre la B, mézclese y dilúyase a 1 l.
e) Solución patrón de fosfato: disuélvase 219.5 mg de KH_2PO_4 anhidro en agua destilada y dilúyase a 1,000 ml

4. Procedimiento

- a) Ajuste del pH de la muestra: si el pH de la muestra es mayor de 10, añádanse 0.05 ml (una gota) de indicador de fenolftaleína a 50,0 ml de muestra y decólórese el color rojo con HCl 1 + 1 antes de diluir a 100 ml.
b) Eliminación del color de la muestra: elimínese el excesivo color de la muestra agitando unos 50 ml con 200 mg de carbón activado en un Erlenmeyer durante 5 minutos y filtrando para eliminar el carbón.
c) Desarrollo de color en la muestra: pónganse 35 ml de muestra o menos, conteniendo de 0.05 a 1.0 mg P, en un matraz aforado de 50 ml. Añádanse 10 ml de reactivo vanadato - molibdato y dilúyase hasta la señal con agua destilada. Prepárese un blanco con 35 ml de agua destilada en lugar de la muestra. Al cabo de 10 minutos, mídase la absorbancia de la muestra frente a un blanco a longitud de onda de 400 a 490 nm, en función de la sensibilidad deseada. El color es estable durante días y su intensidad no es afectada por las variaciones de la temperatura ambiental.

d) Preparación de la curva de calibrado: prepárese una curva de calibrado utilizando volúmenes adecuados de solución patrón de fosfato. Cuando el ion férrico sea suficientemente bajo para no interferir, elabórese un conjunto de curvas de calibrado de una serie de soluciones patrón para varias longitudes de ondas. Esta acción permite una amplia gama de concentraciones en una serie de determinaciones. Analícese, al menos, un patrón con cada juego de muestras.

5. Cálculo

$$\text{Mg P/l} = \frac{\text{mg P (en 50 ml volumen final)} \times 1,000}{\text{ml muestra}}$$

Anexo 9. Determinación de fosfatos en aguas por espectrofotometría

1. Metodología experimental.

A. Fundamento

El método propuesto para determinar fosfatos se basa en la formación de un heteropoliácido con el reactivo vanado-molíbdeno (de color amarillo y soluble en agua) cuya absorción de luz se mide a 420 nm. En esta identificación interfieren concentraciones apreciables de Fe (III), silicato y arseniato, entre otras especies. Para eliminar dicha interferencia se preparará un **blanco** (sin fosfato) cuya absorbancia se restará de la del resto de las muestras. Adicionalmente, es posible que la absorbancia del complejo se vea afectada **por efectos de matriz**. La matriz puede potenciar o atenuar la absorbancia de luz por el complejo, lo cual puede conducir a resultados erróneos.

B. Espectrofotometría: es una de las técnicas experimentales más utilizadas para la detección específica de moléculas de distinta naturaleza (contaminantes, biomoléculas, etc.) y estado de agregación (sólido, líquido, gas). El fundamento físico-químico de la espectrofotometría está relacionado con la capacidad de las moléculas de absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite que se inicien ciclos vitales de muchos organismos, entre ellos el de la fotosíntesis en plantas y bacterias.

C. Método de calibrado: adiciones estándar

El método alternativo de adiciones estándar consiste en añadir sobre la muestra problema cantidades crecientes conocidas de analito. De esta manera, todas las medidas se realizan

sobre la misma matriz. Al representar la señal experimental frente a la concentración de analito *añadida* resulta una recta a partir de cuya pendiente y ordenada en el origen se obtiene la concentración de la muestra problema.

2. Aparatos y material

Materiales: 8 matraces aforados de 25 ml, Probeta de 250 ml, 1 matraz aforado de 100 ml, Pipetas de 5 y 10 ml, Matraces aforados de 100ml y 1000 ml.

Reactivos: Heptamolibdato amónico, ortofosfato ácido potásico, Metavanadato amónico.

3. Procedimiento experimental

A. Preparación de reactivos

1. **Reactivo vanado-molibdico:** En unos 400 ml de agua destilada, disolver 20g de heptamolibdato amónico, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Preparar una segunda disolución de 0.5 g de metavanadato amónico, NH_4VO_3 , en 300 ml de agua y añadir 100 ml de ácido nítrico concentrado (con guantes y gafas de protección, en la campana extractora). Mezclar ambas disoluciones en un matraz aforado de 1 lt y enrasar con agua destilada.

2. **Disolución patrón de ortofosfato** (PO_4^{3-}) (1 g/l): Preparar 100 ml de disolución patrón en matraz aforado disolviendo la cantidad adecuada (calcúlela) de KH_2PO_4 en agua destilada.

3. **Disolución de trabajo de ortofosfato** (0.1 g/l): Cada pareja prepara una disolución de trabajo pipeteando 10 ml de disolución patrón y enrasando a 100 ml con agua destilada en matraz aforado.

B. Determinación de fosfato por el método de adiciones estándar

Con el fin de minimizar *efectos de matriz* se aplica el método de adiciones estándar. Para ello se pasan 4 alícuotas del mismo volumen de muestra problema en matraces de 25 ml. A 3 de esos matraces se les añade cantidades crecientes de la disolución de trabajo. A continuación se agregarán 10 ml de la disolución de vanado-molibdato y se enrasará con agua destilada. Dejar reposar 10 minutos.

Medidas de absorbancias: Poner a cero el espectrofotómetro con el mismo blanco del apartado anterior y medir la absorbancia a 420 nm de cada muestra. Construir la recta de adiciones estándar y determinar la concentración de fosfatos. Aplicar el factor de dilución correspondiente.

Anexo 10. 4500 Norg Nitrógeno total

4500 Norg B. Método macro Kjeldahl

- 1) Principio: El nitrógeno Kjeldahl es definido como la suma de amonio libre y compuestos orgánicos nitrogenados que son convertidos a una sal de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, después de la digestión de la muestra en medio ácido y en presencia de un catalizador.

El amonio es destilado en medio alcalino y recuperado nuevamente para su cuantificación. El nitrógeno Kjeldahl orgánico es la diferencia obtenida substrayendo el amonio libre del valor del nitrógeno Kjeldahl total. El origen del nitrógeno orgánico puede ser natural o industrial como desechos alimenticios, farmacéuticos de productos peptídicos, colorantes, etc. Para la ingeniería sanitaria es muy importante el contenido de nitrógeno de origen orgánico, ya que indica el grado de contaminación de la masa de agua.

- 2) Instrumental: Equipo de digestión con sistema de recolección de gases, equipo de destilación con flujo de vapor, equipo titulador, pH-metro, erlenmeyers de 250 ml, vasos de precipitado.

- 3) Reactivos: agua destilada y desionizada: Exenta de amonio (recién obtenida).

- Reactivo de digestión: Disolver 134 g de K_2SO_4 y 7.3 g de CuSO_4 en cerca de 800 ml de agua. Cuidadosamente agregar 134 ml de H_2SO_4 concentrado. Cuando se haya enfriado hasta temperatura ambiente, diluir la solución a 1 L con agua. Mezclar bien y mantener a una temperatura cercana a 20°C para prevenir la cristalización.
- Solución tampón de borato: Agregar 88 ml de solución de NaOH 0,1 N a 500 ml de solución de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) aproximadamente 0,025 M (9.5 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /l) y diluir a 1 litro.
- Solución de ácido bórico (H_3BO_3): Disolver 20 g de reactivo analítico en agua, y diluir a 1 l.
- Solución indicadora de ácido bórico: Disolver 20 g de H_3BO_3 en agua, agregar 10 ml de la solución indicadora mixta y diluir a 1 l. Preparar mensualmente.
- Solución indicadora mixta: Disolver 200 mg de indicador rojo de metilo en 100 ml de alcohol etílico del 95%. Disolver 100 mg de azul de metileno en 50 ml de alcohol etílico del 95%. Combinar las soluciones. Preparar mensualmente.
- Solución titulante de ácido sulfúrico 0,02N: Preparar una solución de H_2SO_4 0.1N diluyendo 3 ml de H_2SO_4 concentrado a 1 l con agua destilada libre de CO_2 . Diluir 200 ml de esta solución a 1l con agua destilada. Estandarizar el ácido 0,02N contra una

solución de Na_2CO_3 0,0200 N (1,060 g de Na_2CO_3 anhidro secado a 140 °C, diluido a 1000 ml con agua destilada).

- 4) Procedimiento: para muestras de lodos y sedimentos, pesar una porción de muestra húmeda que contenga entre 0.2 y 2 mg de nitrógeno orgánico en un crisol o en un pesa sustancias. Transferir la muestra al tubo de digestión diluyendo y enjuagando el recipiente de pesaje varias veces con pequeñas cantidades de agua. Hacer esta operación con la cantidad más pequeña posible de agua, sin exceder un volumen de 50 ml.

Digestión: cuidadosamente agregar 10 ml de reactivo de digestión al balón Kjeldahl que contiene la Muestra. En muestras marinas el contenido de sal puede afectar negativamente el análisis, por lo cual es recomendable la adición de ácido extra (aprox. 10 ml). Agregar 4 perlas de ebullición para prevenir sacudidas durante la digestión. Ajustar cada unidad de calentamiento en el aparato de digestión Kjeldahl. Calentar bajo una campana de extracción o con equipo de remoción de gases. Continuar la ebullición vigorosa hasta que la solución se haga transparente y verde pálida y se observen copiosos vapores. Calentar al máximo y digerir por 30 minutos adicionales.

Destilación: enfriar y transferir el tubo con la muestra digerida al equipo de destilación. Diluir la muestra digerida con agua destilada hasta aproximadamente 50 ml de volumen total. Adicionar solución de hidróxido de sodio para neutralizar la muestra digerida hasta obtener un viraje de color claro a oscuro (50 ml son suficientes). En un Erlenmeyer medir entre 50 y 75 ml de solución de ácido bórico y si desea, adicionar 2 ó 3 gotas de indicador mixto. Colocar el Erlenmeyer en el destilador de nitrógeno por debajo del tubo de salida del destilado. Asegurar que la punta del condensador esté totalmente sumergida dentro del ácido bórico. Destilar la muestra hasta obtener un volumen de 150 a 200 ml aproximadamente. La presencia de amoníaco cambia el color de la solución de ácido bórico de azul a verde, cuando se ha empleado el indicador.

Anexo 11. 4500 NH₃ Amonio

4500 NH₃ F Método Fenato

1. Discusión General

- a. Principio: Un compuesto intensamente azul, indofenol, se forma por la reacción de amoníaco, hipoclorito, y fenol catalizada por el nitroprusiato de sodio.

b. Interferencias: complejación magnesio y calcio con citrato elimina la interferencia producida por la precipitación de estos iones a pH alto. No hay interferencia de otras formas trivalentes de nitrógeno. Retire turbidez interferir por destilación o filtración. Si el sulfuro de hidrógeno está presente, retire por acidificación de las muestras a pH 3 con HCl diluido y airear vigorosamente hasta que el olor de sulfuro ya no puede ser detectado.

2. Aparato: Espectrofotómetro para uso a 640 nm con una trayectoria de luz de 1 cm o más.

3. Reactivos

a. Solución de fenol: Mezclar 11,1 ml de fenol licuado ($\geq 89\%$) con 95% v / v de alcohol etílico a un volumen final de 100 ml. Preparar semanal. *C RECAUCIÓN: Usar guantes y protección para los ojos cuando manipule fenol; utilizar una buena ventilación para minimizar toda exposición del personal a esta sustancia volátil tóxico.*

b. El nitroprusiato de sodio, 0,5% w / v: Disolver 0,5 g de sodio en 100 nitroprusiato ml de agua desionizada. Almacenar en botella ámbar hasta por 1 mes.

c. Citrato alcalino: Disolver 200 g de citrato trisódico y 10 g de hidróxido de sodio en agua desionizada. Diluir hasta 1 000 ml. El hipoclorito de sodio, solución comercial, aproximadamente 5%. Esta solución se descompone lentamente una vez que el sello en la tapa de la botella está roto. Reemplace cada 2 meses.

d. Solución oxidante: Mezclar 100 ml de solución de citrato alcalino con 25 ml de hipoclorito de sodio. Preparar fresco todos los días.

f. Solución de amonio: Ver la sección _{4500-NH₃} .D.3 d.

4. Procedimiento: a una muestra de 25 ml en un matraz erlenmeyer de 50 ml, añadir, con mezcla a fondo después de cada adición, 1 ml de solución de fenol, 1 ml solución de nitroprusiato de sodio, y 2,5 ml de solución oxidante. Muestras Cubra con papel plástico o película de envoltura de parafina. Deje que el color se desarrolla a temperatura ambiente (22 a 27 ° C) a la luz tenue durante al menos 1 h. El color es estable durante 24 h. Medir la absorbancia a 640 nm. Preparar un blanco y al menos otros dos estándares mediante la dilución de la solución madre de amoníaco en el rango de concentración de la muestra. Normas tratan la misma como muestras.

5. Cálculos: Preparar una curva estándar trazando las lecturas de absorbancia de las normas contra las concentraciones de amoníaco de las normas. Calcule concentración de la muestra mediante la comparación de la absorbancia de la muestra con la curva estándar.

Anexo 12. 4500 NO₃- Nitrato

4500 NO₃⁻ B. Método espectrométrico ultravioleta selectivo

1. Discusión general

- a) Principio: utilícese esta técnica solamente para seleccionar muestras con bajo contenido de materia orgánica, es decir, aguas naturales incontaminadas y suministros de agua potable. La medida de absorción UV A 220 nm hace posible la determinación rápida de nitrato. Dado que la materia orgánica disuelta puede absorber también a 220 nm y nitrato no lo hace a 275 nm, se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de nitrato. Esta corrección empírica dependerá de la naturaleza y concentración de la materia orgánica y puede variar de unas aguas a otras.
- b) Interferencia: interfirieren la materia orgánica disuelta, los surfactantes. Pueden interferir varios iones inorgánicos, que no se encuentran normalmente en el agua natural, como clorito y clorato.

2. Instrumental: Espectrofotómetro, para uso a 220 nm y 275 nm con cubetas de sílice iguales, de 1 cm de recorrido de luz o más.

3. Reactivos

- a) Agua exenta de nitrato: utilícese agua re-destilada o destilada, desionizada, de la máxima pureza para preparar todas las soluciones y diluciones.
- b) Solución madre de nitrato: séquese nitrato potásico (KNO₃) en un horno a 105°C durante 24 horas. Disuélvanse, 0.7218 g en agua y dilúyase a 1,000 ml; 1000 ml = 100 µg NO₃⁻ N. consérvese con
- c) Solución intermedia de nitrato: dilúyase 100 ml de solución madre de nitrato a 1,000 ml con agua; 1,00 ml = 10,0 µg NO₃⁻ N. consérvese con 2 ml de CHCl₃/l. esta solución es estable durante un mínimo de 6 meses.
- d) Solución de ácido clorhídrico, HCl 1 N.

4. Procedimiento

- a) Tratamiento de la muestra: sobre 50 ml de muestra transparente, filtrada si fuera preciso, añádase 1 ml de solución de HCl y mézclese bien.

- b) Preparación de la curva patrón: prepárese estándares calibrado de NO_3^- en el rango de 0 a 7 mg NO_3^- N/l por dilución de 50 ml de los siguientes volúmenes de solución intermedia de nitrato: 0, 1,00, 2,00, 4,00, 7,00 ..., 35,0 ml. Trátense los patrones de NO_3^- del mismo modo que las muestras.
- c) Medida espectrofotométrica: léase la absorbancia o transmitancia frente a agua redestilada, ajustada a absorbancia cero o transmitancia 100 por 100. Utilícese la longitud de onda 220 nm para obtener la lectura NO_3^- y 275 nm para determinar la interferencia debida a materia orgánica disuelta.
- 5. Cálculo:** Para muestras y patrones, réstese dos veces la absorbancia leída a 275 nm de la lectura a 220 nm, para obtener la absorbancia debida a NO_3^- con la concentración de NO_3^- N del patrón. Utilizando las absorbancias corregidas de la muestra, obténgase la concentración directamente a partir de la curva patrón. NOTA: si el valor de corrección supera el 10 por 100 de la lectura a 220 nm, no utilizar este método.

Anexo 13. 4500 NO₂- Nitrógeno (nitrito)

4500 NO₂- B. Método Colorimétrico

- 1) a) Principio: el nitrito (NO_2^-) se determina por la formación de un colorante azo purpura rojizo, producido a pH 2.0 a 2.5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina.
- b) Interferencias: la incompatibilidad química hace improbable la coexistencia de NO_2^- , cloro libre, y tricloruro de nitrógeno. El tricloruro de Nitrógeno proporciona un color rojo falso cuando se añade el reactivo colorante.
- 2) Instrumental: espectrofotómetro VIS, con rango espectral de 400- 900 nm, celdas de 10 o 1 cm de paso óptico, viales de 40 ml, dosificadores o pipetas de 1 ml, pipetas aforadas de 25, 10, 5, 2 y 1 ml, probetas de 100 y 50 ml, matraces aforadas de diferentes capacidades.
- 3) Reactivos.

Solución de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$): Disolver 2.5 g de sulfanilamida R.A. en 25 ml de ácido clorhídrico concentrado y añadir 150 ml de agua destilada, mezclar y completar a 250 ml, guardar en un frasco ámbar. Esta solución es estable por varias semanas en oscuridad.

Solución de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$): Disolver 0.5 g de reactivo puro en agua destilada y completar a 500 ml, almacenar en un frasco ámbar. La solución es estable por un mes. Debe renovarse cuando desarrolle una coloración café.

Estándar de nitrito: Disolver 0.0690 g de nitrito de sodio (NaNO_2) previamente seco a $105\text{ }^\circ\text{C}$ por dos horas en agua destilada y completar exactamente a 100 ml. Almacenar en botella oscura con 50 μl de cloroformo como preservativo. La concentración de esta solución es de 10000 $\mu\text{g.at/l}$.

4) Procedimiento

Depositar en los viales de reacción, 25 ml de cada muestra de agua filtrada.

Agregar a cada frasco 0.5 ml de la solución de sulfanilamida. Mezclar y dejar en reposo entre 2 y 8 minutos.

Añadir 0.5 ml de solución de N-(1- naftiletilendiamina) y mezclar.

Dejar en reposo mínimo 10 minutos para empezar a medir la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 543 nm.

Con cada conjunto de muestras se debe montar un blanco y una muestra patrón de 1.0 $\mu\text{g.at/l}$ (cuando se usa celda de 10 cm).

Determinación del blanco

Siga el método descrito para la muestra usando 25 ml de agua desionizada.

Calibración

- Stock secundario: Medir 1.0 ml de la solución patrón y llevar a 100 ml con agua desionizada, la concentración de esta nueva solución es de 00 $\mu\text{mol/l}$.
- Tomar 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 1.25 ml de la solución secundaria y completar a 25 ml, con agua desionizada en balones aforados; las concentraciones de estas soluciones son 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 $\mu\text{g.at.N/l}$ respectivamente, o seleccionar concentraciones que estén en el rango de trabajo de las muestras
- Aplicar el proceso descrito para la muestra y el blanco.

Anexo 14. 2320 Alcalinidad

2320 B. Método de titulación.

1. Discusión general

a) Principio: Los iones hidroxilo presentes en una muestra como resultado de la disociación o hidrólisis de los solutos reaccionan con las adicciones del ácido estándar. Por tanto, la alcalinidad depende del pH de punto final utilizado. Para conocer los métodos de determinación de puntos de inflexión a partir de curvas de titulación y las normas para titulación a puntos finales de pH fijados.

Para muestras de alcalinidad baja (menos de 20 mg de CaCO_3/l), utilícese una técnica de extrapolación basada en la proporcionalidad cercana de la concentración de

hidrogeniones y el exceso de reactivo más allá del punto de equivalencia. Se mide con precisión la cantidad de ácido estándar requerida para reducir el pH exactamente en 0,30 unidades.

- b) Puntos finales: cuando la alcalinidad se debe enteramente al contenido de carbonato o bicarbonato, el pH en el punto de equivalencia de la titulación se determina en función de la concentración de dióxido de carbono(CO_2) en esta fase.
- c) Interferencias: los jabones, las materias oleosas y los sólidos en suspensión o precipitados pueden recubrir el electrodo de vidrio y causar una respuesta retardada. Déjese un tiempo adicional entre las adiciones del reactivo para permitir que el electrodo recupere el equilibrio o límpiense este en su caso. No se debe filtrar, diluir, concentrar o alterar la muestra.

2. Reactivos.

- a) Solución de carbonato sódico, aproximadamente 0,05 N: séquese entre 3 y 5 g de Na_2CO_3 estándar primario a 250°C durante 4 h y enfríense en desecador. Se pesan $2,5 \pm 0,2$ g (miligramicos) y se transfieren a un matraz volumétrico de 1 l, llenando hasta la marca con agua destilada y mezclando el reactivo. No debe conservarse más de una semana.
- b) Ácidos sulfúrico o clorhídrico estándar 0,1 N: prepárese la solución acida de normalidad aproximada a la indicada en preparación de reactivos de mesa. Estandarícese frente a una solución de 40 ml de Na_2CO_3 0,05 N en probeta, con unos 60 ml de agua, titulando potenciométricamente a un pH aproximado de 5. Elévese los electrodos, enjuáguese en la misma probeta y háganse hervir suavemente durante 3-5 min cubriendo con un vidrio de reloj. Enfríese a temperatura ambiente, enjuáguese el cristal en la probeta y conclúyase la operación titulando en el punto de inflexión de pH. Calcúlese la normalidad.
- c) Ácidos sulfúrico o clorhídrico estándar, 0,02 N; dilúyanse 200,0 ml de ácido estándar 0,1000 N hasta 1,000 ml de agua destilada o desionizada. Estandarícese mediante titulación potenciométrica de 15,0 ml de Na_2CO_3 0,05 N.
- d) Solución indicadora de verde de bromocresol, indicador de pH 4,5: disuélvanse 100 mg de purpura de verde de bromocresol, sal sódica, en 100 mg de agua destilada.
- e) Solución indicadora de purpura de metacresol, indicador de pH 8,3: disuélvanse 100 mg de purpura de metacresol en 100 ml de agua.
- f) Solución alcohólica de fenolftaleína, indicada a pH 8,3.
- g) Tiosulfato sódico 0,1 N.

3. Procedimiento
 - a) Cambio de color.
 - b) Curva de titulación potenciometrica
 - c) Titulación potenciometrica a pH preseleccionado.
 - d) Titulación potenciometrica de alcalinidad baja.

Anexo 15. 2340 DUREZA

2340 C. Método título métrico de EDTA.

1. Discusión general
 - a) Principio: el ácido etilendiaminotetraacético y sus sales de sodio (abreviatura EDTA) forman un complejo de quelato soluble al añadirse a las soluciones de algunos cationes metálicos.
 - b) Interferencias: algunos iones metálicos interfieren produciendo puntos finales débiles, o provocando estequiometría de EDTA. Redúzcase esta interferencia añadiendo algunos inhibidores antes de la titulación.
 - c) Precauciones en la titulación: practíquese la titulación a la temperatura ambiente. El cambio de color se hace demasiado lento a medida que la muestra se acerca a la temperatura de congelación. La descomposición del indicador llega a constituir un problema cuando se emplea agua caliente.
2. Reactivos.
 - a) Solución tampón: disuélvase 16.9 g de cloruro amónico (NH_4OH) conc. Añádase 1.25 g de sal de magnesio de EDTA (disponible en el mercado) y dilúyase hasta 250 ml de agua destilada.
 - b) Agentes complejantes: para la mayoría de las aguas no son necesarios. En ocasiones, cuando el agua contenga iones de interferencia, se deberá añadir un complejante adecuado para lograr un cambio neto y exacto del color en el punto final.
 - c) Indicadores: se han propuesto muchos tipos de soluciones indicadoras, que pueden utilizarse si el analista demuestra que proporcionan valores exactos.
 1. Negro de eriocromo T.
 2. Calmagita.
 - d) Titulante EDTA estándar, 0,01 M
 - e) Solución de calcio estándar.
 - f) Hidróxido sódico, NaOH, 0,1 N.

3. Procedimiento

- a) Tratamiento previo de muestras de aguas contaminadas y residuales: utilícese la digestión de ácido nítrico- ácido sulfúrico, o bien ácido nítrico- ácido perclórico.
- b) Titulación de muestras: selecciónese un volumen de muestra que requiera menos de 15 ml de reactivo EDTA y realícese la titulación en cinco minutos, medidos a partir del momento de la adición del tampón. Dilúyanse 25 ml de muestra hasta alrededor de 50 ml de agua destilada en una batea de porcelana u otro recipiente adecuado. añádase entre 1 y 2 ml de solución tampón. Añádanse una o dos gotas de solución indicadora o una cantidad adecuada del reactivo en polvo seco. Poco a poco, añádase titulante EDTA estándar. Añádanse las últimas gotas con intervalos de 3-5 segundos.
- c) Muestras de dureza baja: para fluido intercambiador de iones u otras aguas ablandadas y para aguas naturales de dureza baja (menos de 5 mg/l), tómese para titulación una muestra amplia, de 100 a 1,000 ml, y añádanse cantidades proporcionalmente grandes de tampón, inhibidor e indicador. Añádase lentamente titulante EDTA por medio de una microbureta y realícese un blanco, utilizando agua bidestilada, destilada o desionizada del mismo volumen que la muestra, a la que hay que añadir idénticas cantidades de tampón, inhibidor e indicador. Sustráigase el volumen del EDTA utilizando como blanco a partir del volumen empleado en la muestra.

4. Calculo.

Dureza (EDTA) como mg de $\text{CaCO}_3/\text{l} = A \times B \times 1,000/\text{ml}$ de muestra

Donde:

A= ml de titulación para la muestra, y

B= mg CaCO_3 equivalente a 1,0 ml de titulante EDTA.

Anexo 16. 4500- Si SILICE

4500 –Si D. Método colorímetro del complejo azul

1) Discusión general

- a) Principio: la sílice reacciona con el molibdato de amonio en condiciones acidas(pH 1.2 aproximadamente) para producir heteropoliácidos, que son complejos de color amarillo intensos. Seguidamente se adiciona ácido oxálico para destruir la interferencia del ácido molibdofosforico, pero no al ácido silicomolibdato. Posteriormente el ácido molibdosilicato es reducido con ácido aminoaftosulfonico para

formar un complejo azul cuya absorbancia se mide a 810 nm utilizando celda de 1 cm (aguas costeras y estuarías).

- b) Interferencia y limitaciones: como la vidriería puede contribuir con silica, evite al máximo su uso. Haga un blanco para corregir la silica introducida con los reactivos y los aparatos. Los taninos, grandes cantidades de hierro, color, turbidez, sulfito y fosfatos interfieren en el ensayo. El ácido oxálico elimina las interferencias de fosfatos y disminuye las producidas por taninos.

2) Materiales y equipos:

Espectrofotómetro VIS rango de 400 a 900 nm, celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico, balones aforados de diferentes capacidades preferiblemente plásticos, micropipetas, viales de plástico de 40 ml, vasos de precipitado de 50 ml, probetas.

- 3) Reactivos y soluciones: bicarbonato de sodio, NaHCO_3 en polvo, ácido sulfúrico, H_2SO_4 1 N. ácido clorhídrico, HCl, 1+1, solución de Heptamolibdato de amonio reactivo., solución de ácido oxálico, agente reductor: ácido aminonaltolsulfónico, solución stock de silicato, solución estándar de silicato.

4) Procedimiento:

a) Calibración:

- ✓ Preparar una curva de calibración de una serie de aproximadamente 6 estándar que cubra el rango óptimo (para una celda de 1 cm a 815 nm: prepara soluciones estándar entre 20 y 100 μg). siga el método descrito para la muestra usando porciones adecuadas de solución estándar de silica diluida a 50 ml en tubos Nessler.
- ✓ Ajustar la absorbancia del espectrofotómetro a cero con agua destilada y leer todos los patrones, incluyendo un blanco reactivo con agua destilada.
- ✓ Diagramar $\mu\text{g SiO}_2$ en la solución final desarrollada de los 55 ml VS absorbancia.
- ✓ Corra un blanco y por los menos un estándar con cada grupo de muestras para verificar la curva de calibración.

b) Análisis:

- ✓ Tomar 25 ml de muestra y adicionar rápidamente 0.5 ml de HCl 1+1 y 1,0 ml de solución de heptamolibdato de amonio.
- ✓ Mezclar por inversión por lo menos 6 veces y dejar reposar de 5 a 10 minutos.
- ✓ Adicionar 1.0 ml de solución de ácido oxálico y mezclar bien.
- ✓ Esperar mínimo 2 minutos (máximo 15 minutos).
- ✓ Añadir 1,0 ml del agente reductor y mezclar bien.

- ✓ Dejar en reposo por 5 minutos para que se forme el azul del complejo.
- ✓ Leer absorbancia a una longitud de onda de 810 nm para todas las muestras.

Anexo 17.9260 H. *Vibrio cholerae*

Es el agente etiológico del cólera, una forma de leve a grave de enfermedad diarreica. Se trata de un patógeno autóctono de aguas salobres y es posible que las aguas de los estuarios contribuyan a la transmisión hídrica del cólera y a su persistencia en el ambiente.

1. Procedimiento de enriquecimiento.

Enriquezcase en agua de peptona alcalina (1 por 100 de peptona, 1 por 100 de NaCl, pH 8.4) mediante una concentración adecuada de medio liquido en relación al volumen de la muestra. Siémbrense cultivos en agar tiosulfato- citrato- sales biliares- sacarosa (TCBS) después de incubaciones de 6 y de 15-18 horas a 35°C. se han observado lotes de muestras TCBS de características mejores que otros para aislamiento de *V. cholerae*.

2. Crecimiento masivo.

Incúbense las placas de TCBS durante 24 horas a 35 °C. las colonias sospechosas de *V. cholerae* son amarillas a causa de la fermentación de la sacarosa. Las principales bacterias que pueden interferir son *V. Anginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. metschikovii* y *Aeromonas sp.*

3. Pruebas presuntivas de diferenciación de *V. cholerae*

Siémbrense las colonias positivas a la sacarosa en un medio selectivo de agar como el trítico soja con NaCl al 1 por 100 p/v.

4. Identificación serológica.

Puede utilizarse la técnica de la aglutinación en porta (véase sección 9260B.5).

5. Otros procedimientos.

Las muestras ambientales también pueden estudiarse con técnicas de anticuerpos fluorescentes siempre que se disponga de antisueros altamente específico.

Anexo 18. 9213. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

9213. F. Técnica de tubos múltiples para *Pseudomonas aeruginosa*.

- 1) Medios de cultivo.
 - a) Medio líquido asparagina: a veces no se encuentra este medio en forma deshidratada, por lo que habrá que prepararlo a partir de sus ingredientes básicos. Se ajusta el pH a 6,9 - 7.2 antes de esterilizar.
 - b) Medio líquido acetamida: a veces no se encuentra este medio en forma deshidrata, por lo que habrá que prepararlo a partir de sus ingredientes básico. Se ajusta el pH a 6,9 - 7.2 antes de esterilizar. Prepárense las pendientes de agar acetamida añadiendo 15 g a la formula anterior, hiérvanse hasta que se disuelva y fórmense porciones de 8 ml que se colocan en tubos de 16 mm. Tras pasar por el autoclave, inclínense los tubos mientras se enfrían para conseguir una larga superficie de pendiente.
- 2) Procedimiento
 - a) Prueba supuesta: inocúlese cinco muestras de 10 ml, cinco de 1 ml y cinco de 0,1 ml en el medio líquido asparagina. utilícense medios de potencia sencilla de 10 ml para inocular 1 ml o menos y 10 ml de medio de potencia doble para las inoculaciones de 10 ml. Incúbense los tubos inoculados a 35- 37 ° C a las 24 y 48 horas de la incubación, examínense los tubos bajo una luz ultravioleta de larga longitud de onda (luz negra) en una habitación a oscuras. La producción de un pigmento verdoso fluorescente indica positividad del análisis.
 - b) Prueba confirmatoria: confírmese el resultado positivo inoculando 0,1 ml del cultivo en medio líquido acetamida o sobre la superficie de pendientes de agar acetamida. La reacción positiva de confirmación viene dada por la aparición de un pH elevado, detectable por el color púrpura que aparece a las 24- 36 horas de incubar a 35-37 °C.
 - c) Cálculo y grabación del NMP: véanse tabla 9221: V y sección 9221D.

Anexo 19. 9215 Recuento heterótrofo de placa

9215 B. Método de placa fluida

- 1) Dilución de la muestra
 - a) Selección de las diluciones: las diluciones se seleccionaran de forma que el número de colonias en una placa sea de 30 a 300.

- b) Medición de las porciones de la muestra: utilícese una pipeta esterilizada para los pases inicial y posteriores del material procedente de cada envase.
 - c) Medición de las diluciones: al desechar porciones de la muestra, manténgase la pipeta en un ángulo de alrededor de 45°, con el extremo tocando el fondo del disco de Petri o dentro del cuello de botella de dilución. Levántese la tapadera del disco de Petri lo suficiente al introducir la pipeta. Se dejara que el líquido drene desde una marca de graduación de 1 ml al extremo de la pipeta durante 2 a 4 segundos. No deben transcurrir más de 20 minutos entre el momento en que se inicia el pipeteo y la adición del medio a las placas.
- 2) Siembra
- a) Licuación del medio: Licúese el medio de agar sólido estéril en agua hirviendo o sometiéndolo a un chorro de vapor en un envase parcialmente cerrado para evitar una excesiva exposición a temperaturas innecesariamente elevadas durante y después de la licuefacción. Manténgase el medio líquido en un baño de agua entre 44 y 46 ° C hasta el momento de usarlo. Utilícese agar de recuento de placa, agar R2A o agar NWRI.
 - b) Vertido en las placas: límitese el número de muestras de siembra en una serie, de manera que no transcurran más de 20 minutos (mejor aún 10) entre la dilución de la primera muestra y la adición del medio a la última placa de la serie. Viértanse al menos 10-12 ml de medio licuado, mantenido a 44-46°C en cada disco y levántese suavemente la tapadera lo suficiente para introducir el medio. Una vez añadido el medio a todas las placas, mézclase cuidadosamente el medio líquido con la porción de muestra en estudio.
 - c) Controles estériles: compruébese la esterilidad del medio y de los blancos de agua de dilución preparando con ellos placas fluidas en cada serie de muestras. Prepárense controles adicionales para determinar la contaminación de las placas, las pipetas y el aire de la habitación.
- 3) Incubación: para adaptarse a estas disposiciones, incúbese a 35 ° C durante 48 horas. En cualquier otro caso, elíjanse algunos de los tiempos y temperaturas recomendados para el control de los cambios en la calidad del agua. Los recuentos más elevados en la incubación se obtendrán a los 5-7 días a temperatura de 20 a 28° C. manténgase humedad en la incubadora durante la incubación para que la pérdida de peso por evaporación en las placas no supere el 15 por 100, hecho especialmente importante si la incubación va a ser larga.

4) Recuento y registro.

Al preparar las placas, introdúzcanse volúmenes de muestra que proporcionen 30- 300 colonias/placa. Por lo general, no deben sembrarse más de 2,0 ml de muestra; por tanto, cuando el número total de colonias que se desarrollan con 2,0 ml se inferior a 30. Regístrese el recuento bacteriano por mililitro, multiplicando el número medio de colonias por placa por el recíproco de la dilución utilizada. Preséntese el informe en UFC (Unidades Formadoras de Colonia) por mililitro.