

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**EFFECTO DE PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp.
y *Lactobacillus* sp., EN LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO LARVAL DEL
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*, EN LA ESTACIÓN DE
MARICULTURA LOS CÓBANOS, SONSONATE**

POR:

MERCEDES ALEJANDRA DIAZ PALACIOS

MARCELA GUADALUPE MONTES RAFAILANO

SAN SALVADOR, NOVIEMBRE DEL 2012

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA



**EFFECTO DE PROBIÓTICO A BASE DE *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp.
y *Lactobacillus* sp., EN LA SOBREVIVENCIA Y CRECIMIENTO LARVAL DEL
CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*, EN LA ESTACIÓN DE
MARICULTURA LOS CÓBANOS, SONSONATE**

POR:

MERCEDES ALEJANDRA DIAZ PALACIOS

MARCELA GUADALUPE MONTES RAFAILANO

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SAN SALVADOR, NOVIEMBRE DEL 2012

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

RECTOR:

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL:

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING. AGR. MSc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

ING. AGR. MSc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO.

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

ING. AGR. MSc. NAPOLEÓN EDGARDO PAZ QUEVEDO

DOCENTES DIRECTORES

ING. AGR. MSc. NAPOLEÓN EDGARDO PAZ QUEVEDO

LIC. MARCO TULIO NAVARRETE

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

ING. AGR. CARLOS ENRIQUE RUANO IRAHETA

RESUMEN

La investigación se basa en el estudio de un producto probiótico que contiene un complejo de bacterias: *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. el cual fue aplicado en la fase de levantamiento larvario de *Litopenaeus vannamei*, en los laboratorios de la Estación de Maricultura de Los Cóbano ubicada en el departamento de Sonsonate empleando larvas de reproductores de la misma.

El objetivo del estudio fue comprobar si la sobrevivencia larval aumentaba en función de la aplicación del probiótico, y a su vez promover a la disminución de problemas relacionados con patógenos más comunes en un laboratorio. Además de generar información acerca de esta nueva temática facilitando una alternativa que no origine la resistencia de bacterias patógenas en el animal, ni residuos químicos para el consumidor final.

El trabajo de campo se realizó durante los meses de febrero a marzo del año 2012, utilizando una población de 3.6 millones de larvas divididas en 4 pilas. En dos de estas, se realizó la aplicación del probiótico desde la fase de nauplio hasta la venta de la larva, constituyendo el tratamiento T1, mientras las restantes fueron manejadas de la forma rutinaria en la Estación, denominándose T0. Se utilizó la prueba T de Student para grupos sorteados para igual o diferente número de observaciones.

Las variables que se estudiaron durante el experimento fueron: Y1 = Porcentaje de sobrevivencia (por método volumétrico), Y2 = Análisis microbiológico (patógenos en el ambiente acuático) y Y3 = PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa (resistencia de sobrevivientes). Los parámetros físico-químicos del medio acuático fueron salinidad y temperatura.

En los resultados del experimento la variable abiótica temperatura mostró tener diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los tratamientos T1 y T0. El promedio de la temperatura de T1 fue de 29.8°C y T0 con 30.6°C. Mientras que en la variable abiótica salinidad de ambos tratamientos no hubo significancia estadística ($P > 0.05$) mostrando promedios de 33.25 UPS para T1 y 34.15 UPS para T0.

En el análisis microbiológico del agua y en el hisopado del fondo y paredes de las pilas, los tratamientos en estudio mostraron ausencia de patógenos y únicamente se aisló *E. coli* dentro de los rangos normales según la Norma Salvadoreña Obligatoria 2009 que es de <1.1 NMP/100ML.

En cuanto a la variable de la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR), los análisis realizados en el experimento fueron para Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) en uno de los resultados, Virus del Síndrome de la Cabeza Amarilla (YHV), Virus del Síndrome de Taura (TSV). Mostrando únicamente en la pilas T1R2 del experimento positivo a la prueba IHHNV.

Para el Análisis Económico se utilizó el presupuesto parcial utilizando el método de CYMMIT, el análisis económico para el tratamiento probiótico demostró ser superior al testigo en \$749.22 reflejando que la utilización de probiótico en el medio acuático de las larvas, es una alternativa rentable para aumentar la sobrevivencia en un 12% y evitar el uso de productos químicos como alternativa para tratar enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

A CENDEPESCA

Por otorgarnos el permiso de la elaboración de este proyecto de investigación en una de sus Estaciones.

A la Estación de Maricultura de Los Cóbanos y personal de trabajo

Por brindarnos el apoyo necesario en la realización de fase de campo de nuestra investigación.

A Ing. Msc Napoleón Paz Quevedo y Lic. Marco Tulio Navarrete

Por su importante papel como asesores de nuestra investigación, apoyándonos incondicionalmente y complementando con sus observaciones para la elaboración del documento.

A los miembros del jurado lector y coordinador de procesos de graduación:

Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García

Ing. Agr. David Ernesto Marín Hernández

Ing. Agr. Carlos René Platero Montoya

Ing. Agr. Carlos Enrique Ruano Iraheta

Por haber aportado observaciones clave para mejorar la calidad de la investigación.

DEDICATORIA

“Dedico este trabajo a todas las personas que han permitido que esos momentos efímeros de mi vida sean especiales y valgan la pena”.

A DIOS TODO PODEROSO que ha sido bueno y misericordioso y no me ha abandonado en todos aquellos momentos en que creí desfallecer, me ha brindado fuerza y sabiduría para llegar a este punto que tanto he anhelado.

A MIS PADRES: Rafael Díaz y Cruz Mercedes Palacios por su apoyo y dedicación todos estos años. Muchísimas gracias por ser un buen ejemplo de responsabilidad, perseverancia, lucha, fe, etc.

A MI TÍA: Carmen Beltrán por ser como una segunda madre para mi, gracias por todo su amor y sus cuidados, y por compartir conmigo los éxitos y fracasos.

A MIS HERMANOS Rafa, Ana y José por estar en las buenas y en las no tan buenas ayudando y apoyando.

A MIS AMIGAS Indrí y su mamá Sandra, Marcela ive, Mimi, Marce, gracias por su amistad y cariño, Dios definitivamente me bendijo cuando las conocí , y que nuestra amistad sea igual que hace 12 años es algo que no tiene precio. Gracias por ser mis hermanas, mis confidentes y por reír y llorar juntas las amo.

A MI MEJOR AMIGO Luisito Navarrete infinitas gracias por levantarme en todos aquellos momentos en que me caí, por cada uno de tus consejos, y enseñanzas, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho, sabes que te tengo mucho cariño, respeto y admiración y siempre la voy a tener. Te quiero mucho

A LOS QUE ME FORMARON PROFESIONALMENTE: Dr. Julián Alegría y Norma Flores por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y por haberme abierto las puertas de su clínica y las de su hogar, gracias por todos esos detalle que han tenido, por su apoyo, tiempo, confianza y por sus consejos etc., siempre estaré eternamente agradecida con ustedes los quiero mucho y los admiro.

Dr. Gustavo Figueroa, por aprecio, por su apoyo, por creer en mí, y por sus enseñanzas desde las etapas iniciales de la carrera, y por mostrarme la disciplina, y el amor a esta carrera, por abrirme las puertas de su clínica, lo admiro y aprecio mucho. Así como también a la Dra. Milixa Escobar y a Karen Lili por compartir sus conocimientos y brindarme su amistad.

A MI COMPAÑERA DE TESIS Marcela Rafailano con la cual hemos pasado momentos inolvidables y perduraran por siempre, gracias bisha por cuidarme y por apoyarme se te quiere.

A LA ESTACION DE MARICULTURA DE LOS COBANOS: y a todos los miembros que la conforman, a la Ing. Helen Sermeño y al Ing. Yang por abrirnos las puertas, por brindarnos su conocimiento y por los lazos de amistad que surgieron. A los camaradas del laboratorio (Rodolfo, Xioma, hermanos Juárez, Gerardo, Erick, Marlon, Nelson, Don Mario, Don julio, Salvador, Gilberto y Tomas) por compartir con nosotras sus conocimientos y por los buenos momentos en nuestra estancia al vivir allá ustedes fueron como nuestra familia y jamás los olvidare.

AL DR. RAMIREZ LUNA: Por ser pieza clave para la formulación de nuestra tesis y por su ayuda en la realización de nuestro experimento de una manera desinteresada.

A NUESTROS ASESORES: el Ing. Napoleón Paz Quevedo por su apoyo en todo el proceso, sabe que se le aprecia muchísimo, gracias por compartir sus conocimientos y su amistad incondicional, así como también agradecer al Lic. Marco Tulio Navarrete, por creer en nuestro proyecto y por su colaboración.

A LOS DOCENTES: de la Facultad de Ciencias Agronómicas por sus enseñanzas a lo largo de la carrera.

A LA FAMILIA ROJAS: Judith y Nanci gracias por echarme la mano en los momentos más difíciles de mi vida definitivamente conocerlas a ambas es una bendición en mi vida. Gracias por sus consejos, amistad y cariño hacia mi persona las quiero mucho.

A MIS APOYOS EN LA UES: Ana Miriam, Erick Ortez, Sarita, Paty, Iveth, Sammy, Marta, Karen Molina, al club de pollos (Ana, Marle, David, Pancho), Colochó, Carlitos Valle, Julita,

Ulises, a Mayra y Carmen aun estén lejos siempre están allí para mí. A la Dra. Ivon Medinilla y a la Dra. Cristina Damas por su amistad y por su ayuda.

Y a todos aquellos a los que no he podido nombrar pero saben que son importantes.

A todos, gracias.

ALEJANDRA DIAZ

DEDICATORIA

A MI MADRE

I. del Carmen Rafailano C. (Q.D.D.G), quién alentó todos mis estudios y desarrollo como persona, brindándome su apoyo incondicional para que saliera adelante en la vida con su ejemplo, esfuerzo y dedicación, y con quien hubiese deseado compartir el logro de culminar mi carrera para desempeñarme como profesional.

A MI HERMANO

Luis Miguel Rafailano, que estuvo siempre a mi lado para superar los obstáculos juntos.

A MI AMIGA

Krizia Balibrera, mostrándome que la verdadera amistad no tiene momentos buenos o malos, y que siempre estuvo apoyándome.

A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Quienes colaboraron en mi formación a lo largo de este corto período y que siempre estuvieron dispuestos a facilitar sus experiencias cuando pedí de su ayuda:

MVZ. Ramón Oviedo, quien me brindó su tiempo de la manera más desinteresada al escucharme y aconsejarme.

MVZ. Gamero Guandique, por otorgarme la oportunidad de colaborar en sus prácticas de laboratorio.

Ing. Agr. MSc. Napoleón Paz Quevedo, no sólo por aceptar ser asesor de nuestra investigación, sino también por brindarme su valioso tiempo cuando necesité de sus consejos.

Y a todos los que me acompañaron en el momento más difícil.

A LOS TRABAJADORES DE LA ESTACIÓN DE MARICULTURA LOS CÓBANOS

Ing. Helen Martínez e Ing. Yang, brindándonos sus conocimientos y apoyo en la fase de campo de la tesis. A los camaradas Marlon, Rodolfo, Gerardo, Juarez y Juarez, Nelson, Erick, Xiomara, Don Mario, Don Julio, Gilberto, Tomás y Salvador, sin ustedes, el trayecto hubiese

sido más difícil de no ser porque no sólo nos brindaron su dedicación, sino también su preciosa amistad.

A MIS COMPAÑEROS Y CONOCIDOS

Que siempre estuvieron pendientes de mí y brindaron su apoyo, como amistad.

A MI COMPAÑERA DE TESIS

A pesar de todo, los resultados fueron de lo más grato, logrando un granito de experiencia para ser mejores profesionales y ojalá, sigamos adelante a pesar de lo que venga, gracias bisha.

A MARIO LÓPEZ Y LIC. ZIADÉ

Sin su colaboración y apertura, no hubiésemos logrado estar ya casi fuera con este gran logro. Le agradezco sinceramente su apoyo.

Gracias infinitas,

MARCELA G. M. RAFAILANO

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	xii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 CICLO DE VIDA NATURAL.....	3
2.2 ANATOMÍA DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	5
2.3 HABITOS DE ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS DE <i>L. vannamei</i>	6
2.3.1 Características morfológicas del tracto digestivo de las larvas de camarón.....	6
2.4 INMUNOLOGÍA DEL CAMARÓN.....	7
2.5 MANEJO DE REPRODUCTORES.....	9
2.5.1 Nutrición de los reproductores.....	9
2.5.2 Examen sanitario de los reproductores.....	9
2.5.3 Desove.....	10
2.5.4 Desinfección de los reproductores.....	11
2.6 MANEJO SANITARIO DE LARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	11
2.6.1 Lavado de nauplios.....	11
2.6.2 Selección de nauplios.....	11
2.6.3 Evaluación general de las condiciones de las larvas.....	12
2.6.3.1 Observaciones de Nivel 1.....	13
2.6.3.2 Observaciones de Nivel 2.....	13
2.6.3.3 Observaciones de Nivel 3.....	14
2.7 CULTIVO DE LARVAS DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	15
2.7.1 Densidad de siembra.....	15
2.7.2 Calidad del agua.....	16
2.7.3 Período de siembra.....	16
2.7.4 Nutrición y alimentación.....	17
2.7.5 Selección de las postlarvas para la siembra.....	17
2.7.6 Evaluación de riesgos para la siembra.....	17
2.8 ENFERMEDADES DEL CAMARÓN MARINO <i>L. vannamei</i>	19
2.8.1 Enfermedades virales comunes.....	19
2.8.1.1 Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (White spot syndrome virus, WSSV).....	19

2.8.1.2	Virus del Síndrome de Taura (Taura syndrome virus, TSV).....	20
2.8.1.3	Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Infectious hypodermic and hematopoietic necrosis virus, IHNV).....	22
2.8.1.4	Virus del síndrome de la cabeza amarilla (Yellow Head syndrome virus, YHV).....	22
2.8.2	Enfermedades bacterianas en la larvicultura.....	23
2.8.2.1	Bacterias luminiscentes.....	24
2.8.2.2	Bolitas blancas.....	25
2.8.2.3	Bacterias filamentosas (<i>Leucothrix mucor</i>).....	26
2.9	PROBLEMAS ASOCIADOS AL USO DE ANTIBIOTICOS.....	27
2.9.1	Desarrollo de la resistencia a los antibióticos.....	28
2.9.2	Persistencia de los residuos en el ambiente.....	29
2.9.3	Efectos en la comunidad microbiana.....	29
2.9.4	Impacto en la acuicultura.....	29
2.9.5	Efectos en la salud humana.....	29
2.10	PROBIÓTICOS.....	30
2.10.1	Origen.....	31
2.10.2	Modo de acción de los probióticos.....	32
2.10.2.1	Exclusión competitiva.....	32
2.10.2.2	Producción de antibióticos.....	33
2.10.2.3	Absorción de nutrientes.....	33
2.10.2.4	Inmunoestimulación.....	33
2.10.2.5	Disminución de enfermedades.....	34
2.10.3	Ventajas del uso de probióticos.....	34
2.10.4	Selección de cepas para probióticos.....	36
2.10.4.1	Colonización.....	38
2.10.4.2	Estimulación de la respuesta inmune.....	39
2.10.5	Probióticos en acuicultura.....	40
3.	MATERIALES Y METODOS.....	42
3.1	TIPO DE ESTUDIO.....	42
3.2	ÁREA DE ESTUDIO.....	42
3.3	POBLACIÓN.....	42
3.4	METODOLOGIA DE CAMPO DE CAMPO.....	42
3.4.1	Tratamiento del agua de mar.....	42
3.4.2	Desinfección de material de laboratorio.....	44
3.4.3	Cultivo de microalgas.....	44
3.4.3.1	Pre-masivo 1.....	45
3.4.3.2	Pre-masivo 2.....	46
3.4.3.3	Masivo.....	46
3.4.4	Obtención de nauplios de artemia.....	47
3.4.5	Levantamiento larvario de la población experimental en el laboratorio.....	49
3.4.5.1	Desinfección.....	49
3.4.5.2	Control de la temperatura.....	49

3.4.5.3 Preparación del material a utilizar por pila.....	50
3.4.5.4 Pilas.....	50
3.4.5.5 Siembra de nauplios.....	51
3.4.5.6 Manejo de las larvas.....	51
3.4.5.7 Alimentación.....	52
3.4.5.8 Limpieza y desinfección de las pilas de Tratamiento control.....	53
3.4.6 Preparación y aplicación del probiótico.....	53
3.5 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	56
3.5.1 Factor en estudio.....	56
3.5.2 Descripción de los tratamientos.....	56
3.5.3 Diseño estadístico.....	56
3.5.4 Número de repeticiones.....	57
3.5.5 Modelo estadístico.....	57
3.5.6 Nivel de significancia.....	58
3.5.7 Plano de distribución del tratamiento.....	58
3.5.8 Variables a evaluar.....	59
3.6 METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA.....	59
3.6.1 Sobrevivencia.....	59
3.6.2 Microbiología del agua.....	60
3.6.2.1 Desinfección de manos.....	60
3.6.2.2 Recolección de muestras.....	60
3.6.3 Microbiología del medio acuático.....	61
3.6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	62
3.6.5 Condición general de las larvas.....	62
3.6.5.1 Actividad natatoria.....	62
3.6.5.2 Contenido intestinal.....	62
3.6.5.3 Fototaxis.....	63
3.6.5.4 Hilo fecal.....	63
3.6.5.5 Luminiscencia.....	63
3.6.5.6 Homogeneidad del estadio.....	63
3.6.5.7 Necrosis.....	63
3.6.5.8 Deformidades.....	63
3.6.5.9 Fouling epibionte.....	63
3.6.6 Toma de parámetros físico químicos del agua.....	64
3.6.6.1 Temperatura.....	64
3.6.6.2 Salinidad.....	64
3.7. ANÁLISIS ECONOMICO.....	64
3.7.1 Presupuesto parcial.....	64
3.7.1.1 Rendimiento.....	64
3.7.1.2 Ajuste de tratamientos.....	64
3.7.1.3 Beneficios brutos de campo.....	65
3.7.1.4 Costos que varían por tratamiento.....	65
3.7.1.5 Beneficios netos.....	65

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	66
4.1 Sobrevivencia larval.....	66
4.2 Temperatura.....	70
4.3 Salinidad.....	72
4.4 Análisis microbiológico.....	74
4.4.1 Agua.....	74
4.4.2 Hisopado.....	76
4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	78
4.5.1 Debido a la muestra.....	79
4.5.2 Falsos positivos debido al sistema de detección de PCR (primers y sondas).....	79
4.6 ANÁLISIS ECONÓMICO.....	80
5. CONCLUSIONES.....	81
6. RECOMENDACIONES.....	82
7. BIBLIOGRAFIA.....	83
8. ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos factores que afectan al estado sanitario de las larvas y sus posibles medidas control.....	12
Cuadro 2. Resumen de las evaluaciones de Nivel 1 del estadio sanitario de la larva.....	13
Cuadro 3. Resumen de las observaciones del Nivel 2 del estado sanitario de las larvas.....	14
Cuadro 4. Resumen de la evaluación de la calidad de las postlarvas usando procedimientos de Nivel 3.....	15
Cuadro 5. Enfermedades de mayor importancia en la camaronicultura de las Américas.....	27
Cuadro 6. Antibióticos y reactivos empleados en Los Cóbano.....	30
Cuadro 7. Esquema de alimentación en el ciclo larval de <i>Litopenaeus vannamei</i>	52
Cuadro 8. Gramos de probiótico utilizados en el ciclo larvario.....	54
Cuadro 9. Variables del experimento.....	59
Cuadro 10. Promedio de sobrevivencia durante el ciclo.....	66
Cuadro 11. Promedio de temperatura en ambos tratamientos durante el experimento.....	71
Cuadro 12. Promedio de salinidad en ambos tratamientos.....	73
Cuadro 13. Determinación de bacterias en el agua de los tratamientos.....	74
Cuadro 14. Resultados del análisis de hisopados.....	77
Cuadro 15. Resultados del análisis de PCR en las pilas de tratamiento.....	80
Cuadro 16. Análisis de presupuesto parcial.....	80
Cuadro A-1. Métodos para la detección de los principales agentes virales en camarones penaeidos.....	97
Cuadro A-2. Esquema de hoja de registros usada en el ciclo larvario para los tratamientos en estudio.....	98
Cuadro A-3. Tabla de T de Student.....	99
Cuadro A-4. Porcentaje de recambios de agua hechos en el experimento.....	100
Cuadro A-5. Condiciones de las larvas del experimento durante el ciclo larvario.....	102
Cuadro A-6. Comparaciones de tratamientos para la variable sobrevivencia. (Estadío desde	

nauplio hasta postlarva 3).....	104
Cuadro A-7. Comparaciones de tratamientos para la variable parámetro temperatura. (Estadio desde nauplio hasta postlarva 3).....	105
Cuadro A-8. Comparaciones de tratamientos para la variable salinidad (Estadio desde nauplio hasta postlarva 3).....	106
Cuadro A-9. Informe de resultados: Resultados de bacteriología.....	107
Cuadro A-10. Informe de resultados: Agua M4.....	108
Cuadro A-11. Informe de resultados: Agua M3.....	109
Cuadro A-12. Informe de resultados: Agua M2.....	110
Cuadro A-13. Informe de resultados: Acuícola.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

figura. 1	Ciclo de desarrollo de especies de Penaeidae con fase de crecimiento en aguas costeras.....	3
figura. 2	Estadios larvales de <i>Litopenaeus vannamei</i>	4
figura. 3	Partes en que se divide el cuerpo del camarón.....	5
figura. 4	Sistema circulatorio abierto/semi-abierto de camarón y órganos asociados.....	8
figura. 5	Kit de OTO Test.....	43
figura. 6	Esquema de premasivo 2 en cultivo de microalgas.....	46
figura. 7	Inoculación de cultivo pre-masivo a cultivo masivo.....	47
figura. 8	Eclosión de artemia.....	47
figura. 9	Incubadoras de nauplios de artemia, en la parte superior tubería de aireación.....	48
figura. 10	Ablación ocular en la hembra de <i>Litopenaeus vannamei</i>	49
figura. 11	Preparación de la cantidad de probiótico a utilizar por tratamiento.....	54
figura. 12	Dilución del probiótico.....	55
figura. 13	Incubación del probiótico en el laboratorio de levantamiento larvario.....	55
figura. 14	Distribución de los tratamientos en la Estación de Los Cóbano.....	58
figura. 15	Frascos estériles para la recolección de muestra de agua.....	60
figura. 16	Toma de muestra de agua.....	61
figura. 17	Toma de hisopado de pared.....	61
figura. 18	Introducción de larvas en tubo para análisis de PCR.....	62
figura. 19	Fouling observado a 40x en larvas tratadas con probiótico.....	68
figura. 20	Muestreos de sobrevivencia por tratamientos.....	70
figura. 21	Muestreos de temperatura para los tratamientos en estudio, realizados durante la investigación.....	71
figura. 22	Muestreos de salinidad para los tratamientos en estudio, realizados durante la investigación.....	74
figura A-1.	Presentación del alimento utilizado en el levantamiento larvario.....	112

figura A-2. Necrosis encontrada en Z II-III.....	113
figura A-3. Bolsa de probiótico.....	114
figura A-4 Croquis de la Estación de Maricultura Los Cóbano.....	115
figura A-5 Esquema del laboratorio de larvicultura.....	116

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	117
Anexo 2. Ejemplo de cálculo de sobrevivencia por método volumétrico.....	122
Anexo 3. Cálculos del Presupuesto Parcial.....	122
Anexo 4. Glosario.....	123

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el rubro de la camaricultura ha ido aumentando con los avances tecnológicos en el manejo, alimentación y desarrollo larvario. No sólo se ha logrado un avance en la parte de la crianza en estanques y salud en las fases larvarias, sino también en el control de las principales enfermedades. En El Salvador la producción de larvas según datos de ventas de La Estación de Maricultura Los Cóbano¹, CENDEPESCA (Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura) está estimada en unas 48,795,033 larvas valoradas en \$195,180.13 para su venta como Postlarvas para el año 2011 y, 22,102,500 larvas valoradas en \$88,410 hasta ventas del mes de junio del 2012.

Con el tiempo, la búsqueda de especímenes resistentes a enfermedades hizo que se utilizaran antibióticos en el ciclo biológico del camarón al ser cultivado masivamente en explotaciones, promoviendo el control más estricto de las enfermedades.

La implementación de estos productos comerciales al mercado acuícola no sólo permitió que las enfermedades pudieran ser combatidas, sino también al haber abusado de estos productos, surgieron poblaciones bacterianas resistentes (Balcázar *et. al.*, 2006; Montoya, 2002).

Dado el riesgo de que el camarón presente residuos en sus tejidos, la FDA² incrementó las medidas de control en las exportaciones de productos acuícolas, ya que en países asiáticos en los 90 y principios del 2000, especímenes de camarón dieron positivos en contener antibióticos como trimetoprim y gentamicina (Montoya, 2002).

La existencia de nuevas regulaciones para la exportación y la preocupación por el uso de agentes quimioterapéuticos en Acuicultura, condujo a la búsqueda de alternativas enfocando estudios a los microorganismos que habitan naturalmente en el tracto digestivo de los animales, denominándoles probióticos. Se definen como microorganismos vivos que tiene un efecto favorable dentro del animal, desarrollando así una mejor respuesta inmunológica contra las enfermedades. (Lilly y Stillwell 1965).

¹ Datos de resumen de ventas de la Estación hasta el mes de junio del 2012.

² FDA: Food and Drug Administration/Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América.

Las ventajas de los probióticos sobre los antibióticos fue discutido por Moriarty (1998), el cual enfatizó los beneficios de los probióticos y sus mecanismos de acción como la exclusión competitiva por nutrientes, secreción de enzimas o sustancias inhibitorias.

El manejo de probióticos en acuicultura tiene un desarrollo joven en América Latina, siendo países como Cuba y Ecuador los principales pioneros en esta área investigativa, sin embargo, en El Salvador es la primera experiencia a reportar a nivel de un laboratorio comercial de larvas de *Litopenaeus vannamei*.

En Ecuador se estudió la capacidad probiótica de bacterias aisladas del hepatopáncreas de camarones silvestres como la cepa de *Vibrio*, demostrando un porcentaje de inhibición de entrada de un 54% de patógenos.

Debemos considerar que el uso y desarrollo de los probióticos es una actividad reciente, por lo que muchas veces los resultados vistos no son esperados y en algunos momentos son materia de discusión y controversia incluso en estos países. Por otro lado, aun existe mucho por desarrollar especialmente en la industria camaronera.

Con el presente estudio se evaluó la sobrevivencia como respuesta al efecto de un probiótico en larvas del genero *Litopenaeus vannamei* conteniendo un complejo de bacterias *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactobacillus* sp., en su medio acuático, de esta manera generar información útil acerca del manejo de larvas de camarón blanco como alternativa al uso de sustancias antibióticas o químicas para el control de patógenos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CICLO DE VIDA NATURAL

Según Hendrickx (2001), la hembra libera los huevos directamente al agua; las larvas experimentan una metamorfosis profunda correspondiente a la primera etapa de un complejo ciclo biológico cuya realización requiere de aguas tanto marinas como salobres (figura 1). Las especies desovan frente a las costas, a profundidades que varían aproximadamente de 10 a 80 m. Los huevos eclosionan al término de algunas horas, liberando larvas sencillas y muy pequeñas, los nauplios, que representan el primero de los 11 estadios larvales: 5 estadios de nauplio, 3 de zoea y 3 de mysis (figura 2).

Las larvas planctónicas son transportadas por las corrientes hacia la costa adonde llegan en un estadio de postlarva; esto ocurre aproximadamente 3 semanas después del desove, cuando los animales han alcanzado tallas entre 6 y 14 mm de longitud y presentan un aspecto de camarón (Hendrickx, 2001).

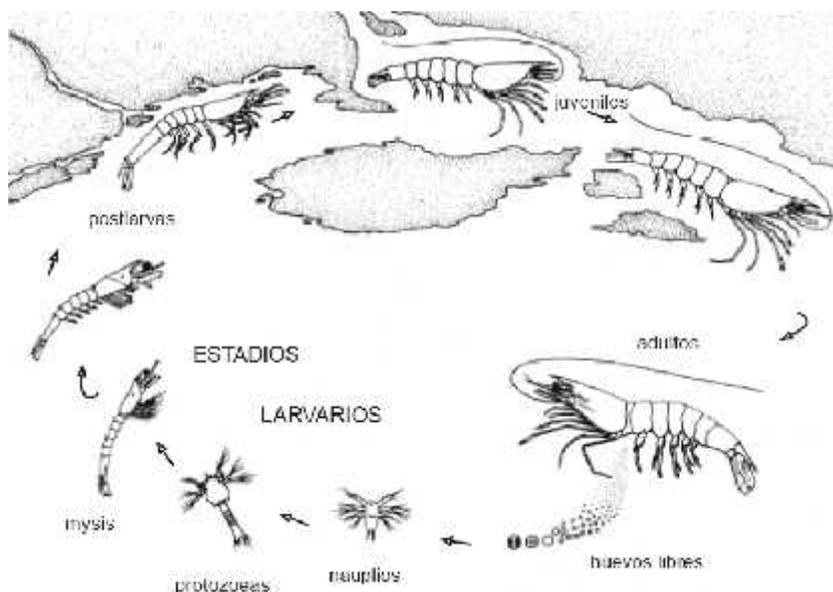
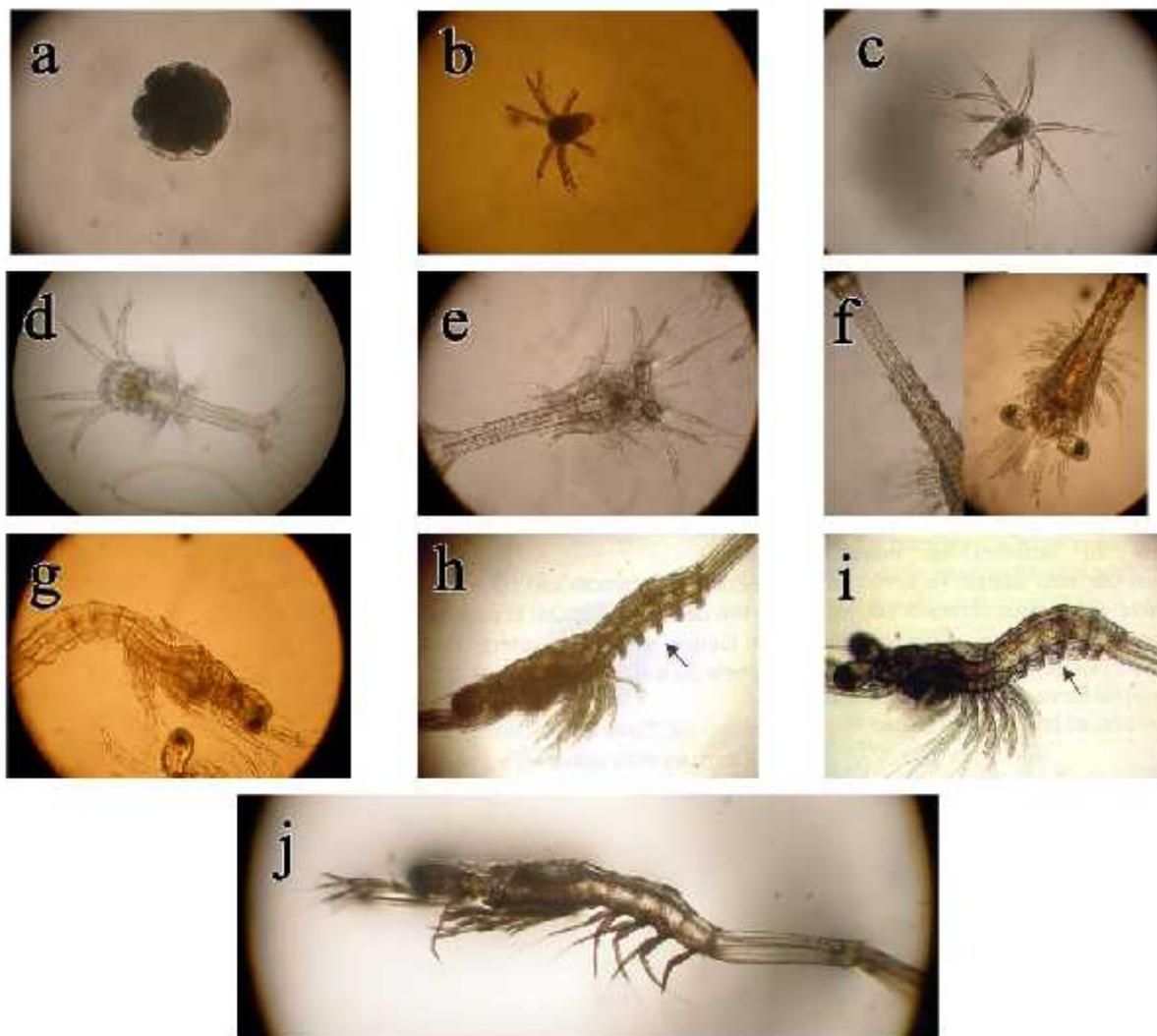


figura. 1 Ciclo de desarrollo de especies de Penaeidae con fase de crecimiento en aguas costeras (Hendrickx, 1995).



a. Huevo
 b. Nauplio I
 c. Nauplio V
 d. Zoea I
 e. Zoea II
 f. Zoea III
 g. Mysis I
 h. Mysis II
 i. Mysis III
 j. Postlarva desarrollada

figura. 2 Estadíos larvales de *Litopenaeus vannamei* (Mysis II y III tomadas de Hsien-Tsang y Aguillón, 2006)

Las postlarvas invaden las aguas costeras salobres, abandonando su modo de vida planctónico y pasando a formar parte del bentos (vida asociada a los fondos) en las zonas litorales someras. En estos fondos, ricos en alimentos, atraviesan una fase de crecimiento acelerado, alcanzando rápidamente el estadio juvenil, y a medida que aumenta su talla, van regresando

gradualmente a las bocas de las lagunas o de los estuarios donde se convierten en sub-adultos. Poco después, estos camarones migran mar afuera, siguiendo su proceso de crecimiento, para finalmente alcanzar los lugares de reproducción; allí el ciclo reinicia con las hembras maduras liberando los huevos. La mayoría de los camarones presentes en los fondos de reproducción tienen menos de un año de edad (Hendrickx, 1995).

2.2 ANATOMÍA DE *Litopenaeus vannamei*.

Posee un rostro moderadamente largo, con 7 a 10 dientes dorsales y 2 a 4 dientes ventrales. Coloración verdosa pálida, translúcida; por transparencia destaca una mancha naranja en el caparazón, correspondiente a la zona gástrica. Hasta 23 cm de longitud (ICTIO.TERM, 2010).

El caparazón es conocido como la cabeza mientras que el abdomen, como cola. En el caparazón se contiene la cabeza y órganos vitales incluyendo el estómago. La cresta en lo alto de la cabeza y el rostrum que en muchas otras especies se extiende por delante de la cabeza son estructuras importantes al momento de diferenciar especies (figura 3). El abdomen está dividido en seis segmentos, el último de estos recibe el nombre de telson, una estructura puntiaguda.

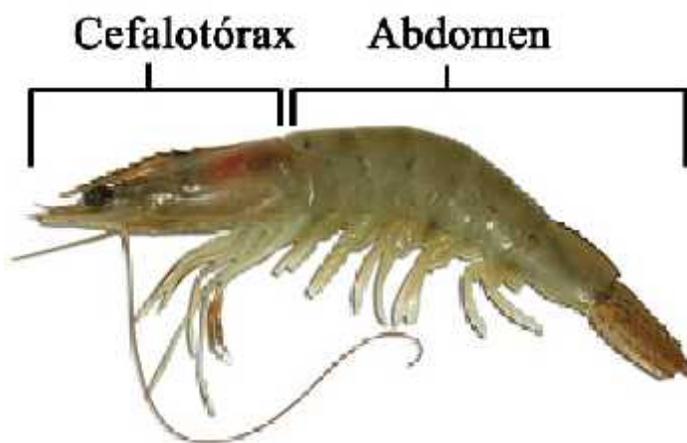


figura. 3 Partes en que se divide el cuerpo del camarón (Adaptado de A. M. Arias, 2005)

La frecuencia de muda del exoesqueleto va a variar entre especies, tamaño y edad del camarón. Sin embargo los jóvenes, mudan de dos a tres veces al día, mientras que los juveniles, según temperatura, mudan en un intervalo de 3-25 días. Los adultos mudan una vez cada uno o dos años (Wickins y Lee, 2002).

2.3 HABITOS DE ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS DE *L. vannamei*

Según un estudio presentado por Gaxiola, 2003 en la I Jornada Iberoamericana de Nutrición en Acuicultura 2003, El ciclo de vida del camarón, como la mayoría de los invertebrados, indica estadios larvales leicitróficos (nauplios) y planciotróficos (Protozoa y Mysis). (Pechenik, 1999). La planctotrofia corresponde a un estado de desarrollo pelágico y de alimentación libre, y la leicitrofía a un estado libre pelágico sin alimentación (Poulin *et al.*, 2001).

Hay evidencia de que la cantidad de alimento planctónico disponible durante este período crítico puede limitar la talla de las poblaciones anuales en los crustáceos decápodos en el ambiente natural (Anger & Dawris, 1981). El ambiente pelágico a diferencia del bentos, provee de menores nichos para las larvas de crustáceos, así que a pesar de la amplia variedad de formas larvales, las estrategias de alimentación están concentradas en los niveles tróficos inferiores del fito y zooplancton; así la producción de grandes números de huevos tempranamente liberados, aún si se presenta la leicitrofía, invariablemente surgen larvas de pequeño tamaño, las cuales en el caso de los penaoideos, la talla circunscribe la alimentación inicialmente al fitoplancton (Le Vay *et al.*, 2001). Las larvas de crustáceos usan ya sea fitoplancton sólo o una combinación de fito-zooplancton como principales fuentes de alimentos (Jones *et al.*, 1997). Según Le Vay *et al.* en 2001, la estrategia de alimentación de las larvas de los crustáceos penaoideos se inicia con la herbivoría (zoeas), y en Mysis se adquiere el hábito omnívoro, sin perder el hábito herbívoro, y de postlarva 1 a 14 el hábito omnívoro se carga hacia la carnivoría (zooplanton), aunque en esto difiere con Lovett y Felder (1990) que señalan para los camarones peneidos la permanencia de un hábito filtrador hasta entrada la fase postlarval.

2.3.1 Características morfológicas del tracto digestivo de las larvas de camarón

a) Nauplios (NI a NV): Los nauplios aparecen en forma libre (planctónica). Su principal característica es la ausencia de somitos torácicos, solamente poseen apéndices cefálicos, que le sirven para la locomoción (anténulas, antenas y mandíbula). No hay esta actividad alimenticia, y solamente poseen un ojo medio (el "ojo naupliar") (Anger, 2001).

Cinemática del tubo digestivo: Simoes en 1993, reporta un ano abierto por el cual se producen ondas antiperistálticas (entrada de agua anal), lo cual sugiere que los tejidos interiores de esta región del tubo digestivo pueden estar en contacto con el ambiente y por consiguiente, puede estar presente microflora contenida en la columna de agua.

b) Zoea (I a III): Las maxílulas y las maxilas son ya funcionales e interviene en el proceso de alimentación, presentando setas para ramonear presas y numerosos órganos quimio y mecanorreceptores ayudando a la selección del alimento. Los apéndices pleonales están ausentes o rudimentarios.

Cinemática del tubo digestivo: En esta se caracteriza por la aparición de ondas antiperistálticas (ingestión anal) que consisten en contracciones del recto. Se presenta una actividad muscular por ondas peristálticas y antiperistálticas ocasionales que viajan a través del esófago y se continúan en la cámara cardíaca y pilórica (Gaxiola 2003).

c) Mysis: (decapodita): La fase decapodita está caracterizada por la existencia de los apéndices natatorios pleonales, mientras que los cefálicos y los torácicos asumen funciones como parte de la boca.

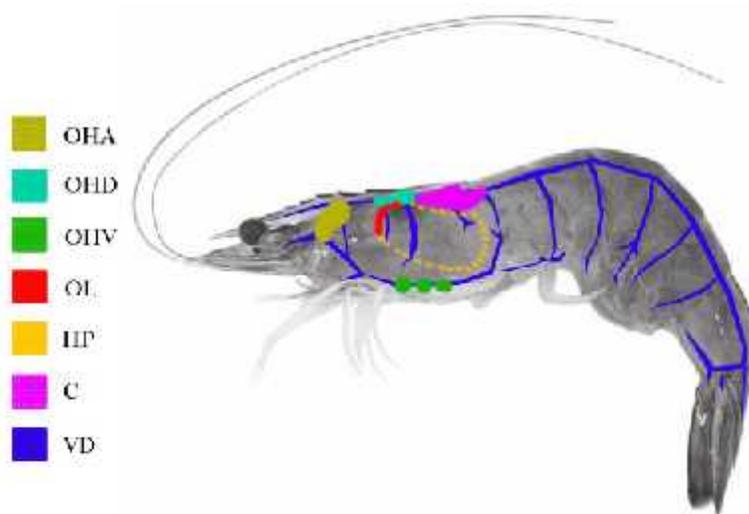
Cinemática del tubo digestivo: Ondas que parecen como contracciones (Gaxiola 2003).

2.4 INMUNOLOGÍA DEL CAMARÓN

Según el programa CYTED Red II-D Vannamei ³ en 2009, la primera línea de defensa de estos animales es proporcionada por la presencia de un caparazón externo rígido o exoesqueleto, que funciona como una barrera físico-química protectora. Además de ello, todo el tracto digestivo de estos animales, que es la principal vía de entrada de los microorganismos, también está revestido por una capa quitinosa y aún ofrece un ambiente ácido y lleno de enzimas, capaz de inactivar y digerir la mayoría de los microorganismos que no son parte de su microbiota natural. Cuando estas barreras son traspasadas, no siendo suficiente para impedir la penetración de los patógenos, se desencadenan en el hospedero una serie de reacciones inmunológicas complejas con el objetivo de neutralizar y eliminar los agentes invasores.

³ Programa Iberoamericano Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Área de Agroalimentación.

A ejemplo de otros invertebrados, los crustáceos disponen de un sistema inmune innato, diferente de los vertebrados que además de esto, tienen también un sistema inmune adaptativo (figura 4). El sistema inmune innato de los crustáceos filogenéticamente más antiguo, es encontrado en todos los organismos multicelulares, incluyendo invertebrados y plantas, mientras que el sistema inmune adaptativo sólo se encuentra en los vertebrados. La ausencia de este en los invertebrados inviabiliza cualquier tentativa de desarrollo de vacunas, en su concepto clásico de la palabra, disminuyendo así de manera sustancial, la posibilidad de la prevención y control de infecciones en los crustáceos.



C: corazón;

HP: hepatopáncreas;

OHA: órgano hematopoyético

antenal;

OHD: órgano hematopoyético dorsal;

OHV: órgano hematopoyético ventral;

OL: órgano linfoide;

VD: vaso dorsal

figura. 4 Sistema circulatorio abierto/semi-abierto de camarón y órganos asociados.
(Adaptado de Bachère *et al.*, 2004, imagen retomada de Loebmann *et al.*, 2010)

El sistema circulatorio de los crustáceos es de tipo abierto o semi-abierto, por donde transita un tejido fluido denominado hemolinfa, correspondiente a la sangre de los vertebrados. En la hemolinfa son transportados continuamente nutrientes, excretas, oxígeno, hormonas y otras moléculas importantes para los diferentes órganos de esos animales. Contiene además todos los componentes del sistema inmunológico.

La hemolinfa está compuesta por una fracción celular, representada por las células circulantes o hemocitos y por una fracción líquida constituida por el plasma que contiene diferentes factores humorales. Las respuestas inmunocelulares y humorales actúan de forma integrada en los crustáceos, protegiéndolos contra la invasión de microorganismos y parásitos, garantizando así su integridad corporal y homeostática (CYTED 2009).

2.5 MANEJO DE REPRODUCTORES

2.5.1 Nutrición de los reproductores

Una buena dieta y un protocolo de alimentación de los reproductores son factores claves en la producción de nauplios de buena calidad.

La preparación de los alimentos debe ser llevada a cabo mediante el uso de buenos estándares de higiene. Los utensilios (cuchillos, cuadros, mezcladores, peletizadores, etc.) se tienen que mantener limpios, y antes de su uso, ser lavados con una solución de yodo-PVP (yodopovidona o polivinil pirrolidona) (20 ppm) y aclarados con agua limpia.

Cuando se usan dietas frescas como calamares, poliquetos, Artemia, krill, mejillones, ostras, almejas, etc., se tienen que intentar que el alimento sea lo más fresco posible. Para asegurar que el alimento fresco no es un riesgo para la bioseguridad, se debe pedir un certificado en el momento de la compra de que esté libre de: Virus del Síndrome de Taura (TSV), Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) y Virus de la cabeza amarilla (YHV) mediante el análisis la Reacción de la cadena de polimesa (PCR). Así mismo, las dietas deben ser esterilizadas o pasteurizadas (recomendadas) para inactivar cualquier virus, siempre que esto no afecte la palatabilidad o calidad nutricional del alimento. Lo ideal sería que los diferentes tipos de alimentos congelados fueran almacenados en congeladores separados (Lightner, 1996).

2.5.2 Examen sanitario de los reproductores

A parte de diagnóstico sanitario general, los reproductores seleccionados para la maduración se deben someter a una revisión de Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV), Virus del Síndrome de Taura (TSV) y Virus de la cabeza amarilla (YHV).

Cuando exista un número elevado de reproductores, los test se deben realizar en lotes de 10 individuos procedentes de diferentes grupos de reproductores. Se debe llevar a cabo un muestreo mínimo de 150 animales por cada grupo de 1,000 camarones.

Cuando son seleccionados para programas genéticos, se realiza un diagnóstico de enfermedades más riguroso, para asegurar la no existencia de patógenos. Aunque el test PCR se debe efectuar sobre los reproductores a su llegada durante la cuarentena, compensa repetir este test (por lo menos para WSSV) después del desove. Esto es debido a que existen evidencias de que los reproductores con un test PCR negativo para WSSV durante la cuarentena pueden dar positivo si son analizados seguidamente a una situación de estrés como la del desove (Brock y Main, 1994).

2.5.3 Desove

El desove debe tener lugar en una sala separada del área de maduración con el objeto de mantenerla limpia y de posibilitar el lavado y desinfección diarios de los tanques sin molestar a los reproductores.

Las salas de desove deben tener una infraestructura apropiada y suficiente para el nivel requerido de reproducción de nauplios.

El desove se debe llevar a cabo de forma individual, esto reducirá el riesgo de transferencia horizontal de enfermedades entre hembras. Ha sido demostrado que los tejidos exudados durante el desove y las heces, pueden contener altos niveles de algunos virus (Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa, Enfermedad del Parvocirus Hepatopancreático, Enfermedad de Baculovirus *penaei*, Baculovirus tipo *P. monodon*, etc) que pueden infectar a hembras sanas durante el desove colectivo. Si este desove colectivo se lleva a cabo, el número de hembras por tanque debe de ser el más bajo posible para limitar la cantidad de hembras expuestas a infecciones potenciales (ejemplo Una hembra por cada 300 litros de agua) (Lightner, 1996).

2.5.4 Desinfección de los reproductores

Después de retirar las hembras que hayan desovado de los tanques correspondientes, estas deben ser inmersas en yodo-PVP (20 ppm/15 segundos) antes de devolverlas al tanque de origen (Jahncke *et al*, 2001).

2.6 MANEJO SANITARIO DE LARVAS DE *Litopenaeus vannamei*

2.6.1 Lavado de nauplios

Los nauplios cosechados deben lavarse minuciosamente en agua filtrada y esterilizada y volverlos a sumergir en una solución de yodo durante 1- 3 min. Inmediatamente a continuación, son lavados en agua de mar limpia. Esto puede ser efectivo para retirar sedimentos y organismos del fouling que no son más que algas o protozoarios que atacan normalmente el exoesqueleto de la cabeza y el cuerpo, y especialmente alrededor de las branquias de las larvas, cuando la calidad del agua es baja, debiendo actuar de forma rápida para evitar mortalidades. Los organismos de fouling también pueden acarrear bacterias, contribuyendo a la transmisión de enfermedades virales (Jahncke *et al*, 2001).

2.6.2 Selección de nauplios

Como los nauplios presentan una fuerte fototaxis positiva, aquellos que están sanos, pueden ser cosechados usando una luz para atraerlos hasta la superficie del agua. Aquellos que permanezcan en el fondo del tanque son descartados, reduciendo el porcentaje de nauplios débiles y deformes.

Si el 95% o más de las larvas se mueven claramente hacia la luz, el lote se considera bueno, intermedio si el 70% o más responden, y pobre si menos del 70% se dirige hacia la luz. Los lotes pobres pueden ser descartados, dependiendo de los criterios de selección de cada laboratorio (Jahncke *et al*, 2001).

Según la FAO en 2004, hay muchos factores involucrados en el manejo sanitario de las larvas en el laboratorio. Para producir una elevada cantidad de larvas de alta calidad, es preciso mantener un estricto control de todos éstos, a lo largo de todo el ciclo de cría de la

larva. En el cuadro 1 son expresados algunos de los factores más comunes que afectan al estado sanitario de la larva durante el ciclo de su cultivo.

Cuadro. 1 Algunos factores que afectan al estado sanitario de las larvas y sus posibles medidas de control

FACTOR	EFECTOS	MEDIDAS DE CONTROL	ESTÁNDAR
Densidad de siembra excesiva	Estrés, canibalismo, baja calidad del agua	Reducir la densidad de siembra	100 a 250 nauplios/litro
Baja calidad del agua de mar(A) o agua de estanques(B)	Mortalidades, muda tardía, deformidades	Mejorar la calidad del agua por filtración, cloración y/o esterilización (A). incrementar la tasa de renovación del agua(B)	Filtro <5µm. Carbón activado Cloración(10ppm) seguida de neutralización Ozono y UV 20-100% renovación de agua por día
Períodos largos de siembra	Incremento de las tasas de infección en las últimas larvas sembradas	Limitar el número de días de siembra en laboratorio	3-4 días por unidad
Dieta pobre (calidad y/o frecuencia)	Canibalismo, desnutrición, fouling epibionte, baja calidad del agua	Programa de alimentación apropiado, chequeos frecuentes en el consumo de alimento y la calidad del agua	Alimentar cada 2 ó 4 horas hasta la saciedad con dietas de alta calidad
Calidad y/o cantidad de algas	Mortalidad en estadio zoea, fouling de larvas	Recuentos rutinarios y controles de calidad	Chaetoceros o Thalassiosira 80000 a 130000 células/ml
Nauplios de Artemia	Fuente de bacterias con incremento de la mortalidad	Desinfección de los nauplios de artemia	Hipoclorito 20 ppm de ingrediente activo

FAO, 2004

2.6.3 Evaluación general de las condiciones de las larvas

Es habitualmente realizada por la mañana, las larvas de cada tanque deben ser inspeccionadas de dos a cuatro veces cada día. Inicialmente se hace una inspección visual de la larva, de las condiciones del agua y de la comida. Se puede tomar una muestra de larvas con un vaso de precipitado e inspeccionarlas a simple vista. Se hacen observaciones sobre el estadio de la larva, salud, actividad, comportamiento y abundancia de comida y heces en el agua. También se deben guardar registros de los parámetros de calidad del agua y de la cantidad de comida en el tanque (FAO, 2004).

2.6.3.1 Observaciones de Nivel 1

Cuadro 2. Resumen de las evaluaciones de Nivel 1 del estado sanitario de la larva

CRITERIO	PUNTUACIÓN	ESTADIO	OBSERVACIONES
Actividad natatoria Activa (>95%) Intermedia (70-95%) Débil (en el fondo; <70%)	10 5 0	Todos los estadios	Observaciones diarias(2-4x)
Fototaxis Positiva (>95%) Intermedia (70-95%) Negativa (<70%)	10 5 0	Zoea	Observaciones diarias(2-4x)
Hilos fecales Presente (90-100%) Intermedio (70-90%) Ausente (<70%)	10 5 0	Zoea	Observaciones diarias(2-4x)
Luminiscencia Ausente Presente (<10%) Abundante (>10%)	10 5 0	Mysis	Observación nocturna en estanque
Homogeneidad del estadio Alto (80-100%) Intermedio (70-80%) Bajo (<70%)	10 5 0	Todos los estadios	Observaciones diarias(2-4x)
Contenido intestinal Lleno (100%) Medio lleno (50%) Vacío (<20%)	10 5 0	Mysis	Observaciones diarias(2-4x)

FAO, 2004

2.6.3.2 Observaciones de Nivel 2

Las observaciones de nivel 2 están basadas en el examen microscópico y de montaje en fresco. Se debe prestar especial atención: al estado del hepatopáncreas y los contenidos intestinales, necrosis y deformidades de los miembros, organismos del fouling y la presencia de baculovirus en las heces o hepatopáncreas de las larvas de los estadios superiores.

Cuadro 3. Resumen de las observaciones del Nivel 2 del estado sanitario de las larvas.

CRITERIO	PUNTUACIÓN	ESTADIO	OBSERVACIONES
Hepatopancreas y contenido intestinal Vacuolas digestivas y/o intestino lleno (>90%) Moderadamente lleno (70-90%) Vacío (<70%)	10 5 0	Zoea	Montaje en fresco (40x)
Necrosis Ausencia Alguna (<15%) Infección severa (>15%)	10 5 0	Zoea	Montaje en fresco, se buscan lesiones en el cuerpo y miembros de lar larvas (40x)
Deformidades Ausencia Alguna (<10%) Abundante (>10%)	10 5 0	Nauplio	Montaje en fresco, se buscan torceduras, falta de miembros y mal formaciones en general (40x)
Fouling epibionte Ausencia Pocos colonizados temporal o permanente (<15%) Abundantes colonizados temporal o permanentemente (>15%)	10 5 0	Zoea	Montaje fresco, microorganismos que colonizan el exoesqueleto de cabeza y cola, principalmente la zona de las branquias (40x)
Baculovirus Ausencia Alguna (<10%) Abundante (>10%)	10 5 0	Zoea	Montaje de hepatopáncreas entero/aplastado (con tinción de verde de Malaquita para Monodon baculovirus) o hilos fecales de larvas más grandes. Uso de microscopio de luz de alta potencia.

Adaptado de FAO, 2004

2.6.3.3 Observaciones de Nivel 3

Las observaciones de Nivel 3 consisten en la utilización de técnicas moleculares e inmunodiagnósticos y no son normalmente requeridas hasta que las postlarvas no están preparadas para ser transferidas a las instalaciones de engorde (Cuadro 4). Las técnicas de PCR y/o dot-blot son las más comunes para realizar tests de la mayoría de los patógenos virales. No obstante, se recomienda el PCR por ser más sensible que el dot-blot (FAO, 2004).

Cuadro. 4 Resumen de la evaluación de la calidad de las postlarvas usando procedimientos de Nivel 3.

ANÁLISIS	OBSERVACIONES	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA	PUNTUACIÓN
PCR	WSSV/YHV	Negativa	10
	IHHNV	Negativa	10
	TSV	Negativa	10

FAO, 2004

2.7 CULTIVO DE LARVAS DE *Litopenaeus vannamei*

Según la FAO en 2004, se tienen en cuenta los siguientes parámetros para el cultivo de las larvas de camarón:

2.7.1 Densidad de siembra

Un exceso en la densidad de siembra puede aumentar el estrés y en posteriores etapas, puede degenerar en canibalismo y disminución de la calidad del agua, especialmente cuando las tasas de supervivencia son altas. En general, las densidades de siembra para los nauplios deber encontrarse en un rango de 100-250 nauplios/litro de agua (100 000-250 000 por tonelada). Se usan densidades menores si las larvas van a crecer hasta el tamaño de cosecha en el mismo tanque, mientras que se puede aumentar la densidad si se utiliza un sistema de dos tanques. En este último sistema, las larvas son cultivadas generalmente en tanques cónicos o «V» o también en tanques de fondo plano o «U», a altas densidades hasta el estadio PL4-5 y posteriormente transferidos a tanques planos para los siguientes estadios bentónicos, reduciendo la densidad hasta los 100 PL/litro.

Una baja supervivencia puede reducir la densidad de larvas en el tanque hasta un nivel donde el coste por alimentación deje de ser rentable (debido a que los tanques de cría de larvas son alimentados según el volumen de agua más que por el número de larvas) (FAO, 2004).

2.7.2 Calidad del agua

La calidad del agua tiene un impacto fundamental en la salud y rendimiento de los lotes de larvas. Una baja calidad del agua puede acarrear una baja supervivencia y crecimiento, retraso en la muda/estadio, incremento del fouling epibionte y deformidades. El agua para la cría de larvas debe ser filtrada a unos 5 μm y desinfectada con cloro, ozono y/o UV.

La calidad del agua se mantiene si existe una aireación suficiente que impida que la comida sobrante y las heces se asienten en el fondo del tanque (normalmente se requieren de tanques con el fondo en ángulo). El sifonado regular del tanque previene la formación de un sedimento anaerobio en el fondo (FAO, 2004).

Existen además factores que influyen en el buen desarrollo de las larvas denominadas variables abióticas: temperatura, oxígeno disuelto, salinidad según Cantón-Machín et al. (2010). Estas deben de mantenerse dentro de rangos para que la cría se lleve sin problemas: las temperaturas deben ser mantenidas entre 28 y 32 $^{\circ}\text{C}$ y la salinidad por encima de 30‰, por lo menos hasta que se alcanza la etapa de postlarvas. Los niveles de oxígeno disuelto se deben mantener lo más cercanos a la saturación (6,2 ppm a 30 $^{\circ}\text{C}$) o al menos por encima de 5 ppm. Se debe mantener un pH en tono a 8. La sobrealimentación es una de las causas más comunes del deterioro de la calidad del agua y debe ser evitada en lo posible (FAO, 2004)

2.7.3 Período de siembra

Cada unidad independiente de tanques de cría en el laboratorio o, preferiblemente todo el laboratorio, debería sembrarse con nauplios en el menor período de tiempo posible, normalmente limitado a tres o cuatro días. Prolongar dicho período, resulta con frecuencia en un incremento de la incidencia de enfermedades en las últimas larvas sembradas, presumiblemente por contaminación bacteriana desde los tanques más antiguos a los más recientes. Este fenómeno está asociado frecuentemente con el llamado «síndrome zoea-2», en el que los estadios zoea 1 tardío y el zoea 2 temprano dejan de comer y sufren unas altas mortalidades asociadas a problemas bacteriológicos. Este problema puede ser controlado reduciendo el tiempo de siembra a menos de cuatro días, usando probióticos y manteniendo siempre una buena limpieza de todas las zonas del laboratorio (FAO, 2004).

2.7.4 Nutrición y alimentación

La cantidad, calidad y manejo del alimento pueden tener un impacto muy importante en la salud de la larva y su supervivencia. No proveer de suficiente comida de la calidad correcta puede retrasar el crecimiento e incrementar el estrés, la mortalidad, el canibalismo, las deformidades y el nivel de fouling epibionte. Esto es especialmente cierto cuando una parte importante de la dieta es artificial. Cuando se usan dietas formuladas como complemento de las vivas, es importante dosificarlas en intervalos frecuentes y en pequeñas cantidades. Además, éstas deben ser de alta calidad, tener el tamaño apropiado y no ser contaminantes. Como guía, los tamaños de partículas deben ser entre 10-50 µm para zoea, 100-200 µm para mysis, y 200-300 µm para los primeros estadios postlarvarios. Una frecuencia de alimentación de entre dos y cuatro horas se considera generalmente suficiente (FAO, 2004).

2.7.5 Selección de las postlarvas para la siembra

Muchos factores afectan a la calidad de las PL. Pueden tener un impacto en la calidad de las postlarvas producidas por el laboratorio: la calidad y cantidad de alimento, mudas, calidad de agua (temperatura, salinidad, amonio, sólidos en suspensión, heces), el uso de antibióticos, enfermedades y prácticas de manejo deficientes. Estos factores pueden ser regulados mediante buenas prácticas en el laboratorio, y esto tendrá un importante impacto en la calidad de las postlarvas producidas.

Como se ha mencionado anteriormente, el plan de producción de larvas debe estar enfocado a la producción de animales de la máxima calidad posible, lo cual está directamente relacionado con el posterior rendimiento en la fase de engorde. Es por tanto, en esta fase donde la calidad de la postlarva es de la mayor importancia.

Es de mucha importancia en esta etapa tomar en cuenta los diferentes niveles ya antes mencionados (FAO, 2004).

2.7.6 Evaluación de riesgos para la siembra

Al igual que en la evaluación de la calidad de las larvas, se debe realizar una tabla resumen de los tres niveles de calidad de las postlarvas y de los puntos del sistema empleado (usando algunos o todos los indicadores anteriores, dependiendo de las circunstancias).

Se pueden usar los siguientes criterios:

Las postlarvas tienen que pasar la evaluación de Nivel 3:

Las postlarvas tienen que dar negativo en el PCR o dot-blot para YHV, IHNV, WSSV y TSV.

En el supuesto de que las postlarvas pasen la evaluación de Nivel 3, se puede usar la siguiente guía para el Nivel 2:

Una puntuación superior a 100 representa un bajo riesgo de problemas severos de enfermedad, y por tanto, se recomienda.

Una puntuación de 65-100 representa un riesgo moderado de problemas severos de enfermedad

Una puntuación menor de 65 representa un alto riesgo de problemas severos de enfermedad, y por tanto, no se recomienda

En el supuesto de que los animales pasen la evaluación de Nivel 2, se puede usar la siguiente guía para el Nivel 1:

Una puntuación mayor de 30 representa un bajo riesgo de problemas severos de enfermedad, y por tanto, se recomienda.

Una puntuación de 20-30 representa un riesgo moderado de problemas severos de enfermedad.

Una puntuación menor de 20 representa un alto riesgo de problemas severos de enfermedad, y por tanto, no se recomienda (FAO, 2004).

2.8 ENFERMEDADES DEL CAMARÓN MARINO *L. vannamei*

2.8.1 Enfermedades virales comunes

Según Pantoja y Litghtner en 2008, existen diferentes enfermedades virales que afectan la camaricultura del mundo, en el cuadro 5 se presentan resumidas las de importancia en todo el continente Americano.

A continuación se muestran las que afectan principalmente a *Litopenaeus vannamei*:

2.8.1.1 Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (White spot syndrome virus, WSSV)

Nombre de la enfermedad: En la literatura (principalmente la referencia de los primeros reportes de esta enfermedad) se hace mención a por lo menos tres “virus” dentro del complejo del síndrome de la mancha blanca (WSSV). Hoy en día se sabe que todos son en realidad el mismo agente. Estos son:

HHNBV: “Hypodermal & hematopietic necrosis baculovirus” (baculovirus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica); SEED= “Shrimp Explosive Epidermis Disease” (enfermedad explosiva de la epidermis del camarón); “China virus disease” (enfermedad del virus de la China).

RV-PJ = “Rod-shaped nuclear virus of *Penaeus japonicus*” (virus intranuclear cilíndrico de *Penaeus japonicus*).

SEMBV = “Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus” (baculovirus sistémico del ectodermo y del mesodermo); enfermedad roja; enfermedad de las manchas blancas.

WSBV = “White spot baculovirus” (baculovirus de la mancha blanca); síndrome de la mancha blanca; enfermedad de la mancha blanca.

Hoy en día también se sabe que no se trata realmente de un baculovirus sino de un virus completamente diferente, con características propias y para el cual se ha propuesto la creación de una nueva familia que llevará el nombre de familia Nimaviridae.

Agente: virus de doble cadena de ADN; presenta forma elíptica a cilíndrica, membrana trilaminar y los viriones tienen un tamaño de 80-120 x 250-380 nm. En preparaciones teñidas negativamente, es posible observar la presencia de un apéndice o “cola”. El genoma tiene un tamaño aproximado de 290 kbp, lo cual lo hace uno de los virus más complejos que infectan al camarón.

Signos clínicos de importancia diagnóstica: Se ha reportado que durante la fase aguda de la enfermedad, los camarones tienen a mostrar una reducción en el consumo de alimento, se vuelven letárgicos, la cutícula se desprende fácilmente y presenta manchas blancas (de ahí el nombre dado a la enfermedad) de aproximadamente 0.5 a 2.0 mm de diámetro, las cuales son más conspicuas en la parte interna del caparazón. Es posible que las manchas blancas representen depósitos anormales de sales de calcio en el epitelio cuticular. En muchos casos, como sucede con los penidos americanos, los camarones moribundos presentan una coloración rosada a rojiza (de ahí el nombre de la “enfermedad roja”) debido a la expansión de cromatóforos del epitelio cuticular. En estos casos, la presencia de manchas blancas es limitada o ausente. Las poblaciones de camarón que presentan estos signos clínicos tienden a exhibir altas tasas de mortalidad acumulada, alcanzando hasta el 100% de 2 a 10 después de que se observan los primeros signos (Pantoja y Litghner 2008).

2.8.1.2 Virus del Síndrome de Taura (Taura syndrome virus, TSV)

Nombre de la enfermedad: Virus del Síndrome de Taura (TSV); Síndrome de Taura (TS); enfermedad de Taura; enfermedad de la cola roja.

Agente: Debido a que presenta las siguientes características, el virus del síndrome de Taura ha sido clasificado tentativamente como un miembro de la Familia Picornaviridae: posee una morfología icosaédrica, las partículas tienen un diámetro promedio de 30-32 nanómetros, tienen una densidad de 1.337 g/mL, el tipo de replicación es citoplásmico, los sitios de replicación son Feulgen negativos, contiene ARN de una sola cadena con una longitud de aproximadamente 9kb y la cápside está compuesta de tres proteínas estructurales principales (49, 36.8 y 23 kDa) y dos secundarias (51.5 y 25.5 kDa).

Signos del síndrome de Taura: Este síndrome es muy conocido en la crianza de *L. vannamei* pues se desarrolla en esta fase, ocurre de los 14 a los 40 días después de la

siembra de las postlarvas en los estanques. Por lo tanto, los camarones afectados tienden a ser típicamente juveniles de aproximadamente 0.05 g a menos de 5 g. Los camarones más grandes también pueden ser afectados, especialmente si nunca han sido expuestos al virus. La enfermedad exhibe una fase aguda y otra de recuperación (crónica), las cuales pueden distinguirse a simple vista.

Fase Peraguda/aguda: en los camarones moribundos, durante la fase peraguda de la enfermedad, los signos observables a simple vista incluyen expansión de los cromatóforos rojos, lo cual le imparte al camarón una coloración general que va de rosada a rojiza y a los urópodos una coloración roja (de ahí el nombre de la enfermedad de la cola roja). Los animales en la fase peraguda tienden a morir durante la ecdisis (proceso de muda). En estos animales, cuando se examina con más detenimiento el epitelio cuticular, por ejemplo de un apéndice (en la punta de los urópodos o de los pleópodos, por ejemplo), es posible observar evidencia de necrosis multifocal del epitelio. Los camarones que muestran estos signos peragudos, generalmente también tienen la cutícula suave, el intestino vacío y se encuentran en el estadio “D” del ciclo de muda (ecdisis). Los animales con infección peraguda severa mueren típicamente durante la ecdisis, lo cual sugiere que el proceso de muda es una parte importante de la patogénesis del síndrome de Taura.

Fase crónica/recuperación: en los estanques, cantidades bajas o moderadas de camarón tienden a presentar lesiones multifocales melanizadas del tipo de la enfermedad de la concha. Los camarones en esta fase de la enfermedad pueden o no presentar su cutícula blanda y expansión de los cromatóforos rojos. Es posible observar a tales camarones comportándose y alimentándose normalmente.

Estos camarones son sobrevivientes de la etapa peraguda o aguda de la enfermedad, los cuales al haber mudado exitosamente muestran las lesiones melanizadas en vías de recuperación. Aunque una epizootia de síndrome de Taura puede resultar en mortandades acumuladas que van del 80% al 90% de la población en un estanque, los sobrevivientes típicamente muestran supervivencias de 60% o más al tiempo de la cosecha. (Pantoja y Litghner 2008)

2.8.1.3 Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (**Infectious hypodermic and hematopietic necrosis virus, IHHNV**)

Nombre de la enfermedad: Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (enfermedad IHHN); síndrome de la deformidad y enanismo (runt deformity síndrome o RDS); virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV).

Agente: IHHNV es un pequeño parvovirus (diámetro promedio de 22nm) constituido por una cadena sencilla de ADN.

Signos clínicos: es típicamente una enfermedad de tipo crónico. El síndrome de las enfermedades y el enanismo (RDS) que afecta a esta especie ha sido ligado a IHHNV. Típicamente los juveniles afectados por RDS exhiben rostros doblados o deformes, antenas arrugadas, caparazón áspero o rugoso y otras deformidades. Las poblaciones de juveniles con RDS exhiben típicamente una distribución de tallas relativamente amplia con una proporción de tallas pequeñas (enanos) mucho mayor de lo normal. El coeficiente de variación (CV= la desviación estándar dividida entre el promedio de diferentes grupos de tallas dentro de una población dada) de una población con RDS es típicamente mayor de 30% y puede incluso llegar al 50%, mientras que en poblaciones juveniles libres de IHHNV (y por lo tanto RDS) los CV's son de entre 10% y 30% (Pantoja y Litghner 2008).

2.8.1.4 Virus del síndrome de la cabeza amarilla (**Yellow head syndrome virus, YHV**)

Nombre: enfermedad de la cabeza amarilla, enfermedad (YH) o enfermedad de *P. monodon*.

Agente: virus de la cabeza amarilla (YHV). Antes los investigadores consideraban al virus un baculovirus, pero luego de una caracterización detallada, ya no es considerado como uno que no contiene cdADN (cadena doble de ADN), sino csARN (cadena sencilla de ARN). El virus de la cabeza amarilla es un virus de ARN de cadena sencilla que tiene forma cilíndrica, presenta una envoltura y es de replicación citoplásmica. Los viriones tienen forma cilíndrica y varían en tamaño en un rango de 150nm a 200nm de longitud por 40nm a 50nm de ancho. Las estructuras que posiblemente sean las nucleocápsides (yo formas

aberrantes de nucleocápsides) miden aproximadamente 15nm de diámetro con longitudes variables de hasta aproximadamente 800nm de largo.

Síntomas: aunque la enfermedad es de importancia para cultivos intensivos de cultivo de *P. monodon*, se ha demostrado experimentalmente que YHV puede infectar en los estadios juveniles de *P. vannamei*, observándose relativa resistencia en los estadios ya de postlarva.

Existen ciertos signos clínicos característicos que pueden observarse en *P. monodon* cuando está infectado: durante varios días, los juveniles y subadultos (especialmente durante los 50-70 días de cultivo) en estanques intensivos de cultivo, muestran un incremento anormal y abrupto en el consumo de alimento. Posteriormente, los animales dejan de alimentarse completamente y dentro de un plazo de un día es posible observar algunos camarones moribundos nadando lentamente cerca de la superficie en las orillas de los estanques. Estos camarones moribundos pueden llegar a exhibir una coloración amarillenta del cefalotórax. El número de camarones mostrando signos similares incrementa dramáticamente en el segundo día y para el tercero, después de haber cesado de alimentarse, comienza una mortalidad masiva, resultando típicamente en la pérdida de todo el estanque. Los camarones moribundos pueden llegar a presentar con frecuencia uno o más de los siguientes signos: palidez corporal generalizada en combinación con una coloración amarillenta del cefalotórax; branquias blanquecinas o de color amarillo pálido a café; hepatopáncreas de color amarillo pálido (Pantoja y Litghner 2008).

2.8.2 Enfermedades bacterianas en la larvicultura

Los problemas ocasionados por bacterias en los sistemas de cultivo larvario han sido considerados como los principales causantes de mortalidades. Uno de los principales patógenos que se encuentran en este tipo de sistemas son las bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, registradas en casi todos los lugares donde se cultivan larvas (Lightner, 1993, Lightner y Redman, 1998). Sin embargo, es necesario recordar que, hasta el momento, las infecciones que se han presentado en la larvicultura son ocasionadas por bacterias oportunistas que infectan a las larvas cuando se han debilitado por algún otro factor biótico o abiótico. Básicamente, se pueden diferenciar dos enfermedades causadas

por este género: la enfermedad causada por bacterias luminiscentes y la enfermedad de "bolitas blancas" (Gomez-Gil *et al*, 2001).

Las bacterias del género *Vibrio*, son consideradas como oportunistas, localizadas principalmente en el tracto digestivo, branquias y cutícula de camarones penaeidos y ocasionalmente en hemolinfa, ya que en presencia de otros factores estresantes, pueden desencadenar el desarrollo de infecciones en los organismos tales como vibriosis, hepatopáncreas edematoso y necrótico con un alto grado de vacuolización en las células B en larvicultura y engorda.

Este tipo de bacterias causa infecciones letales al interactuar con factores nutricionales, bióticos, abióticos, genéticos e inmunológicos. Las especies causantes de altas mortalidades en las granjas camaronícolas son: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, y *Photobacterium damsela* y las especies que tienen cepas patógenas reportadas en los laboratorios causantes de mortalidades en larvas y postlarvas son: *V. harveyi*, *V. splendidus* y *Vibrio sp*. Aunque también son reportadas pero de manera ocasional en laboratorios y granjas de camarón *Photobacterium damsela*, *V. fluvialis* y *Vibrio sp* (CYTED, 2009).

2.8.2.1 Bacterias luminiscentes

Esta enfermedad ha sido responsable de reducciones de hasta un 70% en la productividad de laboratorios. Durante los episodios de alta mortalidad se han aislado las especies principalmente *Vibrio harveyi* y *V. splendidus*, sin embargo, la identificación de bacterias al ser realizada puede ser deficiente.

Signos clínicos. Las larvas infectadas por este tipo de bacterias presentan una colonización masiva en los apéndices y en el inicio del tracto digestivo y región oral.

Posteriormente, conforme la infección avanza, las bacterias van colonizando el intestino medio y el hepatopáncreas para terminar en una septicemia generalizada (Lightner 1993). Un análisis mediante microscopía óptica revela densos cúmulos de bacterias en el hemocele de larvas moribundas (Lavilla-Pitogo, 1995). En la noche se pueden apreciar las larvas con luminiscencia causada por este grupo de bacterias, pero es necesario observar si la luminiscencia está en las larvas o adherida a partículas, y no en el agua.

Diagnóstico. Para el diagnóstico de esta enfermedad, es necesario aislar la bacteria responsable a partir de larvas moribundas que presenten un cuadro clínico característico. El aislamiento se realiza al sembrar en agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) un macerado de larvas previamente desinfectadas en su exterior. Una gran abundancia de colonias luminiscentes, cercana al 100% y preferentemente de color verde, es indicativo de esta enfermedad.

La identificación de las bacterias responsables no es tan importante, ya que existen virtualmente decenas, sino es que cientos de cepas de una misma especie, y cada una de ellas, puede tener factores de virulencia distintos. Así, es natural que una cepa de *V. harveyi* sea prácticamente inocua para los camarones y otra cepa sea altamente patógena. Hasta el momento no hay una forma confiable de conocer la cepa patógena, salvo realizando bioensayos, mismos que suelen presentar resultados erráticos (Gomez-Gil *et al.*, 2001).

Tratamiento. Al ser este tipo de infección de origen bacteriano, su tratamiento se realiza mediante el empleo de antibióticos, con la previa realización de antibiogramas para su selección. Se ha observado la rápida formación de resistencia de las bacterias luminiscentes a diversos antibióticos empleados. En 1990 la eficacia de varios tratamientos antibióticos demostró ser deficiente (Baticados *et al.*, 1990), siendo cloramfenicol y algunos nitrofuranos relativamente eficaces, aunque actualmente el uso de estos está prohibidos por la FDA (Food and Drug Administration).

2.8.2.2 Bolitas blancas

En el lumen o la luz de los túbulos del hepatopáncreas, se ha observado la presencia de pequeñas formaciones blancas, que han sido llamadas “bolitas blancas”, dichas bolitas son células descamadas del hepatopáncreas o hepatocitos hipertrofiados y redondeados que se ven como formaciones esféricas. Esas células a menudo llegan a ser vistas en el tracto digestivo. Se piensa que las bolitas son una reacción a la presencia de toxinas bacterianas (principalmente de *Vibrio* sp.) y de manera menos común, al efecto de metales pesados.

Muchos laboratorios de producción de postlarvas han detectado casos de la enfermedad conocida como síndrome de Zoea II en donde han sido observadas “bolitas blancas”. *Vibrio alginolyticus* ha sido registrado en las larvas con el síndrome de Zoea II y mientras que *V. alginolyticus* y *V. harveyi* han sido asociados al síndrome de “bolitas blancas”. Este

síndrome se ha relacionado con el desarrollo de luminiscencia, con reducción de la tasa de alimentación, nado lento, reducida respuesta de escape y altos porcentajes de mortalidad (Gomez-Gil *et al*, 2001).

2.8.2.3 Bacterias filamentosas (*Leucothrix mucor*)

Son organismos Gram-negativos, estrictamente aeróbicos, constituidos por largos filamentos no ramificados compuestos de pequeñas células ovoides o cilíndricas fuertemente adheridas a substratos vivos o inertes. Esta bacteria de longitud variable y dos micrómetros de diámetro, no penetra en la cutícula del crustáceo. Estos organismos se fijan principalmente en la cutícula, branquias, pleópodos y periópodos de las larvas, juveniles y adultos. Estos organismos en grandes cantidades llegan a generar dificultades en la respiración, alimentación, locomoción, muda, reproducción y provocan la muerte de larvas, postlarvas, juveniles y adultos.

Las bacterias filamentosas, causan altas mortalidades principalmente en larvas y postlarvas que se enredan en los filamentos, haciendo difícil su movimiento.

Signos clínicos: En estados medios y avanzados, las branquias se observan de color café claro a oscuro. En estado avanzado impiden el intercambio gaseoso provocando con esto la muerte del tejido (necrosis multifocal), intestino inflamado y en algunos casos, dejan de comer y se observa el intestino vacío con infección bacteriana.

Diagnóstico y control: Para detectar la presencia de las bacterias filamentosas por análisis en fresco, se toman muestras de branquias, cutícula, región oral y pleópodos. Se observan al microscopio compuesto con objetivos de 40x y 60x los filamentos de diversos tamaños de *L. mucor*.

Por histopatología con tinción de hematoxilina-eosina, en branquias, cutícula y apéndices, se observan las formas bien definidas de *L. mucor*, con presencia de melanización y necrosis. En algunos organismos con intestino inflamado se observa gran infiltración de hemocitos. Para el control se requiere mantener una buena calidad de agua de cultivo con excelente producción de fitoplancton para que dichas poblaciones compitan por los nutrientes disponibles con *L. mucor* (CYTED, 2009).

Cuadro 5. Enfermedades de mayor importancia en la camaronicultura de las Américas. (Pantoja y Lightner, 2008)

Enfermedad de origen viral	Enfermedades de origen bacteriano/fúngico	Otras enfermedades
WSSV	Vibriosis: - sistémica/entérica - vibriosis larvaria NHP (Necrotizing hepatopancreatitis disease) Espiroplasmosis	Epicomensales: -Leucothrix mucor -Protozoarios peritrichidos Gregarinidos
TSV		
BP (<i>Baculovirus penaei</i> disease)		
YHV (Yellow head virus disease)		
IHHNV		Microsporidiosis
HVP (Hepatopancreatic parvovirus disease)	Micosis larvaria	Desbalances nutricionales
IMNV (Infectious myonecrosis virus disease)	fusariosis	Síndromes tóxicos
PvNV		Síndromes ambientales

2.9 PROBLEMAS ASOCIADOS AL USO DE ANTIBIOTICOS

El empleo de antibióticos durante la producción y elaboración, pero principalmente su uso profiláctico y terapéutico, han sido las bases para el tratamiento de enfermedades bacterianas en la acuicultura, pero estos no han sido usados de forma responsable, por lo que el control de su empleo no genera la garantía debida de prevención de riesgos para los seres humanos. El uso irresponsable en todos los sectores de producción ha sido ya planteado por diferentes Gobiernos, la FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), denotando la importancia del riesgo potencial para la salud pública. El riesgo existe cuando se consumen antibióticos en dosis no especificadas e ingeridos no intencionalmente como residuos en los tejidos animales, lo que evita la posibilidad de cuantificar cuánto se ha ingerido de cierto antibiótico o poder vigilar

la cantidad consumida, llevando a problemas directos como la anemia aplásica, que se dice estar asociada con el cloramfenicol. Además cabe mencionar que el consumo no intencionado provoca el desarrollo de resistencia de bacterias patógenas para los seres humanos. Al reconocer estos efectos, directos e indirectos en la salud humana, ha dado lugar a prohibiciones del uso de algunos antibióticos en la producción de alimentos de origen animal, especialmente de aquellos antibióticos de los que no es posible determinarse niveles inocuos de residuo (FAO, 2002)

Según la FDA, 2002, los siguientes medicamentos están prohibidos en el uso de cría de animales en los Estados Unidos:

- Cloramfenicol
- Clembuterol
- Dietilstilbestrol (DES)
- Dimetridazol
- Ipronidazol
- Otros nitroimidazoles
- Furazolidona, nitrofurazona, otros nitrofuranos
- Fluoroquinolones
- Glicopéptidos
- Medicamentos de sulfamida en vacuno lactante (excepto el uso aprobado de sulfadimetoxina, sulfabromometacina y sulfaetoxipiridacina)

Según Toledo *et al.*, 2007, se mencionan diversos problemas que pueden causar los antibióticos u otros químicos relacionados:

2.9.1 Desarrollo de la resistencia a los antibióticos

Las bacterias pueden desarrollar rápidamente resistencia a los antibióticos por lo que la rotación de estos compuestos para el tratamiento de infecciones bacterianas es altamente recomendable. La creación a la resistencia bacteriana tiene 2 efectos. El primero de ellos se refiere a la viabilidad del proceso de cultivo en las granjas ya que disminuye la población bacteriana durante el tratamiento, pero cuando ese termina aumenta su concentración, rebasando los niveles pretratamiento, además las bacterias que en ocasiones han creado

resistencia, salen de la granja a través de los efluentes y el segundo a las implicaciones en la salud humana (Sánchez, D. 2003).

2.9.2 Persistencia de los residuos en el ambiente

La persistencia depende del tipo de compuesto y de las condiciones ambientales presentes. Algunos antibióticos tienen una vida media menos a un día pero hay otros como las oxitetraciclinas que pueden resistir por 6 meses. Es difícil establecer la naturaleza y severidad de los efectos de las sustancias químicas en el ambiente, ya que los resultados de laboratorio donde se simulan condiciones reales no siempre concuerdan con las condiciones en campo (Toledo *et al.*, 2007).

2.9.3 Efectos en la comunidad microbiana

El uso continuo de antibióticos puede llegar a afectar la composición de la flora bacteriana. Un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana puede llegar a interferir en el ciclo de algunos nutrientes. En un estudio donde se realizaron mediciones de abundancia bacteriana y presencia de antibióticos, se observó que en 2 días de aplicar alimento medicado, la abundancia de bacterias disminuyó a una tercera parte de la inicial; la tasa tardó 2 meses en recuperar los niveles de tratamiento (Toledo *et al.*, 2007).

2.9.4 Impacto en la acuicultura

El uso de sustancias químicas en la acuicultura puede afectar negativamente a granja y laboratorios (Toledo *et al.*, 2007).

2.9.5 Efectos en la salud humana

Existen pocos estudios acerca de la eliminación de antibióticos en el tejido de los organismos. Información de especies tropicales acerca de la persistencia de medicamentos, indica que esta puede ser de horas a días e incluso semanas. Los riesgos a la salud humana al consumir estos animales pueden incluir alergias, desórdenes neurosensoriales (kanamisina), aplasia de la médula ósea (cloramfenicol), alergias (eritromicina), desórdenes renales y alergias (sufas y trimetropim).

No cabe duda que al usar sustancias químicas en la acuicultura tiene desventajas y se deben buscar opciones viables como el uso de técnicas alternativas como lo son los probióticos para atacar las infecciones en las especies (Toledo *et al.*, 2007).

Anteriormente en la Estación se utilizaban los siguientes medicamentos y químicos para prevención y tratamiento en las larvas (Meléndez, R.)⁴:

Cuadro 6. Antibióticos y reactivos empleados en Los Cóbanos

	Nombre	Dosis por tonelada de agua
Reactivo	Verde de malaquita	0.001mg
	Formalina*	1-20 partes por millón
	Yodo*	1-2 partes por millón
Antibiótico	Sulfalamine	0.5mg – 1gr
	Oxcitetraciclina	0.1 – 1gr
	Furazolidone	1 – 5gr

*Aún utilizados.

2.10 PROBIÓTICOS

El aumento en la resistencia microbiana en cuanto al uso de antibióticos, su efecto al medioambiente y el control más estricto de diversas autoridades, ha disminuido el uso de estos en la acuicultura. En respuesta a esta nueva dinámica, se ha manejado la idea de utilizar microorganismos benéficos o amigables como medida para disminuir y/o eliminar las enfermedades, aumentar la sobrevivencia y mejorar el crecimiento de las larvas juveniles y adultas, a este tipo de productos se les denomina probióticos (Aguirre y Asencio 2003).

Según Aguirre y Asencio este tipo de productos se utilizaron inicialmente en la producción pecuaria. Sin embargo en la última década estos se han empezado a utilizar en algunas especies acuáticas como lo son la trucha, el salmón, camarón, ostión etc. Pudiendo resolver

⁴ Meléndez R., 30 de agosto de 2012. Antibióticos usados en Larvicultura (entrevista). Sonsonate, El Salvador.

algunos problemas que generalmente se presentan en los laboratorios de producción de larvas y en las granjas de cultivo.

En acuicultura, los probióticos son usados por adición al agua de crianza o por la introducción de cepas seleccionadas dentro del tracto digestivo del predador vía alimento inerte (pellets secos) o vía alimento vivo (rotíferos, artemia) (Mahious y Ollevier, 2005). Esta última vía es llamada bioencapsulación que es un proceso mediante el cual un organismo vivo incorpora un determinado producto o agente bioencapsulante vía oral, de esta forma, dicho organismo se convierte a los efectos prácticos en una cápsula viva (Castro et al., 2005).

2.10.1 Origen

El término describe todo aquellos elementos como bacterias, microalgas que pueden ser suministrados en la dietas, directos en el medio o al interior del organismo como probióticos (Aguirre, 2003).

En Bulgaria existía un increíble número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. La razón para esa extraordinaria longevidad no podía ser tampoco la calidad de sus servicios médicos. Pero, lo que era evidente era que los búlgaros consumían grandes cantidades de yogur, que contiene bacterias fermentantes lácticas. Metchnikoff fue un zoólogo y microbiólogo ruso (1845-1916) el cual le llamo la atención la situación y logró aislar la bacteria responsable de la producción del yogur y la utilizó para sus investigaciones. Era el inicio oficial de la Probiótica.

Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto que la dieta puede proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue la primera persona en desarrollar un preparado terapéutico utilizando lactobacilo en forma de cápsula para ingerir oralmente denominado Lactobacillin.

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de Probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación gástrica. Esta palabra se deriva de dos vocablos, del latín “pro” que significa por o en favor de, y del griego “bios” que quiere decir vida.

Esta definición fue modificada y se redefinió el término de probióticos como microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal. En 1989 R. Fuller definió a los Probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino".

Y en 1998 el ILSI (International Life Science Institute, de la Unión Europea) en Bruselas definió a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales. Afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo. Proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de enfermedad.

2.10.2 Modo de acción de los probióticos

Se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos. Los mecanismos como estimulación de la inmunidad y producción de enzimas digestivas para la degradación de nutrientes (Fuller, 1989; Wang *et al.*), tendrán una intervención directa en el huésped.

Los probióticos actúan de la siguiente manera:

2.10.2.1 Exclusión competitiva

Es un proceso natural que se realiza entre dos o más especies que compiten entre sí por alimento, nichos ecológicos entre otros. Este es un principio que explotan los especialistas en probióticos, dado que al proporcionar un microorganismo benéfico (probiótico) al medio donde se encuentran las larvas, juveniles o adultos se ve disminuida la proporción de bacterias patógenas que pueden presentarse, sin mencionar además la capacidad que poseen los probióticos para competir por espacio de crecimiento en el medio y en las superficies sólidas del cultivo.

Este punto ha sido considerado de gran importancia según Fuller, 1989; Wang et al. y Gatesoupe, 1999, pues sostienen que ésta sustitución se lograría por la producción de compuestos antibacteriales, competición por nutrientes o por sitios de adhesión.

2.10.2.2 Producción de antibióticos

Existen algunos probióticos que trabajan en base a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas. Por ejemplo se ha demostrado que algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* producen antibióticos como acidophilis, lactolin y acidolin, este último ha sido investigado y se ha observado que tiene una alta actividad contra bacterias enteropatógenas como pueden ser *Escherichia coli*, *Salmonella typhimuriun*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

2.10.2.3 Absorción de nutrientes

Cuando se iniciaron los estudios sobre la flora bacterianas que existen en el tracto gastrointestinal, y al comprobar que ellos juegan un papel muy importante en la digestión, absorción de los nutrientes, en la salud del huésped y que además tenían otras actividades funcionales dentro del organismo, se vio la importancia de que fueran los microorganismos benéficos los que proliferan en el tracto gastrointestinal, existen algunas especies en donde se observa que el tiempo que el alimento pasa en el tracto gastrointestinal es tan bajo, que los microorganismos tienen poca oportunidad de actuar sobre él; por tal motivo deben ser seleccionado cuidadosamente. Es importante tomar en cuenta que el tracto gastrointestinal de algunos organismos acuáticos mantiene un equilibrio entre organismos benéficos que normalmente coloniza y viven en su epitelio intestinal y los organismos patógenos.

Cuando el organismo es joven es altamente deseable que los microorganismos que primero se establezcan sean benéficos.

2.10.2.4 Inmunoestimulación

La estimulación temprana del sistema inmunológico, es otro de los factores sobre el cual actúan algunos probióticos. Cuando el sistema inmunológico está bien desarrollado, los problemas de enfermedades bacterianas se ven restringidas, sin embargo el estrés, en todas

sus formas, puede disminuir la respuesta inmune de los organismos, aumentando las probabilidades de contraer enfermedad.

2.10.2.5 Disminución de enfermedades

La propiedad de poder disminuir o eliminar la incidencia de algunos grupos bacterianos, y por consiguiente algunas enfermedades que comúnmente se presentan los organismos acuáticos, es uno de los principales propósitos por la cual trabajan los probióticos, quienes actúan principalmente contra el género *Vibrio* y alguna otra bacteria patógena u oportunista (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*). Cabe recordar que los laboratorios de producción de larvas, utilizan microalgas y artemia como alimentos (Gullian, 2001).

2.10.3 Ventajas del uso de probióticos

Según la revista FeedMix Vol.15 no.1 (2007), existen muchos aspectos positivos al uso de probióticos. Los probióticos cuando se aplica a través del alimento (a nivel de granja o en la planta de alimentos), viene siendo evaluada en el engorde de camarón (*Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* y *Penaeus monodon*) en Asia, la región Pacífico y Latinoamérica. La aplicación de estas bacterias (concentración de 1×10^7 a 1.5×10^8 UFC/g de alimento según las condiciones de crianza) en asociación con una adecuada gestión de estanques, ha conducido a beneficios marcados para los productores:

Crecimiento más rápido: Científicos de IFREMER⁵ mostraron que, en experimentos controlados con replicas, hubo un significativo incremento en la tasa de crecimiento cuando la cepa de *Bacillus* fue mezclada con el alimento, antes de ser proporcionado al camarón (Moriarty *et al.*, 2006). Similares mejoras en las tasas de crecimiento fueron registradas con *L. vannamei* bajo condiciones comercial en Ecuador y Brasil, en un período 6 meses es decir un ciclo de engorde.

⁵ IFREMER: Instituto Francés de investigación para la Exploración del Mar.

Alta supervivencia: La aplicación de *Bacillus* conduce a un incremento en la tasa de supervivencia en todas las especies estudiadas. En una prueba realizada con *L. vannamei* en Ecuador (7 estanques con un área total de 96 ha), la tasa de supervivencia se incrementó en 62%. En Vietnam (VinhHauAquaculture Co., Ltd., VinhLoi - BacLieu), la misma combinación de probióticos con nombre comercial Sanolife PRO-1 y PRO-2 en el alimento y PRO-W en el agua, junto con una adecuada gestión de la calidad del agua y un seguimiento del nivel de salud de los animales, condujo a una cosecha de biomasa 100% mayor y a una tasa de supervivencia 10% mayor en comparación con los estanques control.

Mejor tasa de conversión del alimento: Para las tres especies evaluadas en las tres regiones, se registró una marcada mejora en el factor de conversión en una relación.

Animales grandes en la cosecha: En una prueba realizada con *P. monodon* en India (Andrah Pradesh), la aplicación de *Bacillus* sp. condujo a animales con un peso promedio mayor durante la cosecha. En los estanques tratados, el 25% de la biomasa fueron animales grandes (34 g). Una combinación de una mayor supervivencia con animales más grandes conduce a una mayor biomasa y, más importante, junto con un eficiente uso del alimento, a mayores ingresos para los productores. En todas estas pruebas, la ganancia neta fue mayor cuando se usaron los probiótico.

Mejoran la calidad del agua: Algunos probióticos son utilizados en el agua ya sea al inicio de la inclusión de agua en un tanque o cuando se requiera controlar una alza de materia orgánica superior a 50 ppm de materia orgánica o niveles de amoníaco mayores a 2 ppm. Una elevada proporción de amoníaco sube el pH del agua de una piscina por encima de 8 y 8.5 dando lugar a un crecimiento excesivo de bacterias tipo *Vibrio*, las cuales infectan al camarón, especialmente en su tiempo de muda. Estas infecciones oportunistas conducen a un deterioro de la capacidad inmunológica, infecciones por otros agentes, incluso el virus de la mancha blanca y a incrementos acentuados de mortalidad. Es por ello que las bacterias usadas como probióticos han sido usadas con éxito. Los probióticos en el agua hacen que haya un crecimiento limitado de *Vibrio*, *Aeromonas* además de otros patógenos y que exista una reducción de nitritos, amoníaco y pH.

Mejoran la digestión de alimentos: los probióticos favorecen en su mayor parte a la digestión de las proteínas. Se sabe que las moléculas de las proteínas son difíciles de digerir: con el aporte de las bacterias probióticas, las proteínas ingeridas se transforman, gracias a los enzimas proteásicas de los probióticos, en moléculas más pequeñas (polipéptidos y luego aminoácidos) y por eso más digeribles.

Inhiben los microbios patogénicos: El conjunto de bacterias que vive en el intestino, la flora o microbiota intestinal, es muy vulnerable a determinadas condiciones (alimentación, estrés, medicamentos, infecciones, edad, clima) Según definición de la FAO los probióticos cuando se ingieren en cantidad suficiente, mejoran el balance de la flora intestinal y tienen efectos beneficiosos. Las acciones que ejercen los probióticos pueden resumirse en: protección contra microorganismos ya que posee un efecto inmunomodulador en el organismo, es decir, que contribuyen a regular el sistema inmune, defendiendo al organismo de una amplia variedad de agentes patógenos que pueden ocasionar diferentes enfermedades (Europa Press, 2010).

2.10.4 Selección de cepas para probióticos

De acuerdo con Gomez *et al.*, (1998a) en muchas ocasiones el proceso de selección utilizado, es de connotación empírica y con limitada evidencia científica, y esto compromete en gran parte los resultados.

Es importante que las bacterias a utilizar cumplan ciertos requisitos. El potencial de colonización, competencia por los sitios de adhesión, capacidad de incremento de la inmunidad, son características sustanciales que deben ser consideradas en la selección (Gatesoupe 1999; Gomez *et al.*, 2000).

Como se mencionaba anteriormente, estas bacterias deben de ser totalmente inócuas para el animal, dentro del huésped, deben estar presentes en gran número como células viables, y ser capaces de sobrevivir dentro del órgano colonizado. Estas no deben afectar el crecimiento ni inducir resistencia a antibióticos que comprometan la terapia (Fuller, 1989).

Comercialmente, deben ser estables a la hora de almacenarse y permitir su producción en grandes volúmenes.

La experimentación a escala comercial es definitiva, por ello no debemos conformarnos con mejorar sólo la supervivencia, si no también tener en cuenta que el crecimiento y la ganancia de peso no se vean afectados.

La flora normal del animal es de manera innata, una defensa natural para el hospedero, sin embargo este concepto ha llevado a controversias en la selección de los géneros probióticos para el camarón, ya que entre ellos se encuentran especies patógenas potenciales (*Vibrio* sp.) (Lightner, 1983; Monhey *et al.*, 1994).

La mayoría de los intentos en aislar cepas probióticas, han sido seleccionando bacterias del medio de cultivo de crustáceos (Nogami & Maeda, 1992; Direkbusarakom *et al.*, 1997; Tanasomwang *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998). Otros investigadores han recurrido al aislamiento de bacterias presentes en el intestino de diferentes especies de peneidos (Wang *et al.*, fide; Rengpipat *et al.*, 2000).

Dentro de las bacterias aisladas, la mayoría corresponden al género *Vibrio*. Se ha reportado el uso de las siguientes especies: *Vibrio alginolyticus* (Griffith, 1995; Garriques & Arévalo, 1995), *Vibrio fluvialis*, *Vibrio campbellii* (Wang *et al.*, fide), sin embargo se han utilizado con éxito cepas de *Bacillus* sp. (Moriarty, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998, Rengpipat *et al.*, 2000) y *Thalassobacter utilis* (Maeda & Liao, 1992).

Basado en Ramírez en 2005, bacterias de origen láctico pueden ser utilizadas de igual forma como probióticos, pues estas fueron encontradas en el intestino del langostino *Litopenaeus vannamei* (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *Pediococcus parvulus*). En un estudio hecho por Reyes *et al.* en 2008, al emplear la cepa de *Lactobacillus casei* como probiótico, mostró en la sexta semana de crianza del camarón de río *Cryphiops caementarius*, el porcentaje de sobrevivencia fue más alto (36.13%) a comparación de sus otros dos tratamientos: aplicando otra bacteria como probiótico (*S. cerevisiae* con un 24.71%) y el control (22.54%). Esta tendencia perduró hasta los 75 días cuando las larvas tratadas con *L. casei* murieron debido a una enfermedad bacteriana (bacilos Gram negativos y en estadio megalopa I), aunque de igual forma, estas larvas mostraron más resistencia, pues las tratadas con *S. cerevisiae* (en estadio megalopa II) y control (estadio zoea 12) murieron a las 62 días y 50 días, respectivamente de la misma enfermedad.

Si bien Gomez *et al.*, (1998b) demostró la existencia de una diversidad de especies de Vibrios en el hepatopáncreas de camarones sanos de la especie *Litopenaeus vannamei*, actualmente no existen reportes de haber utilizado ningún aislado del hepatopáncreas como probiótico.

2.10.4.1 Colonización

Fuller (1989), lo define como: proceso por el cual los microorganismos ingresan en el huésped y se mantienen viables, siendo aquellos de rápido crecimiento los que presentan mayor habilidad de penetración.

El concepto de colonización ha sido bien definido en la literatura, sin embargo poco se ha probado experimentalmente en camarones.

Este mismo autor menciona que la supervivencia del probiótico dentro del huésped, no sólo va a depender de su viabilidad y adaptación a las condiciones del órgano colonizado, sino que en muchas ocasiones, los microorganismos deben resistir los mecanismos antibacteriales, enzimáticos y otros procesos que dificultan su llegada a los órganos blanco (intestino). Si bien lograr la colonización es el primer paso del proceso, existe otro desafío que las cepas probióticas deben enfrentar y del cual depende su permanencia en el hospedero. La capacidad de adherirse a las células colonizadas y multiplicarse es un aspecto importante a considerar, de esta forma el probiótico logra formar parte del animal a través de un efecto antagónico. Conocer el tiempo de adherencia, es básico en el establecimiento de frecuencias de administración del inóculo bacteriano en los sistemas de cultivo. Así, aquellas bacterias que se adhieren a las células hospedero, pueden administrarse a intervalos más prolongados que aquellas que no se adhieren, pues deben de ser administradas de manera continua.

La propiedad antagónica ha sido utilizada por varios investigadores en la confrontación patógeno-probiótico. De esta forma, se han realizado pruebas *in vitro* para la selección de cepas probióticas utilizando bacterias extraídas del medio acuático del intestino de

camarón, y probando su efecto antagónico frente a patógenos de crustáceos (Tanasomwang *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998), e incluso de peces (Austin *et al.*, 1995).

La selección de bacterias benéficas como posibles probióticos no está basado en pruebas de antagonismo *in vitro*. Varios autores, han utilizado los porcentajes de supervivencia logrados en el cultivo como parámetro de decisión, así se evalúa la relación patógenos-probióticos en el agua.

Los primeros trabajos corresponden a Maeda & Liao en 1992, quienes utilizaron una cepa de *Thalassobacter utilis* en larvicultura de *Penaeus monodon*, obteniendo aumento de la supervivencia y disminución en el número de colonias de *V. anguillarum* y *Haliphthoros* sp. en el agua. Iguales resultados en supervivencia fueron reportados para larvas de *P. vannamei* en laboratorios de producción de Ecuador (Griffith, 1995; Garriques & Arévalo, 1995), considerando también el concepto de sustitución de especies bacterianas.

Como método de identificación, se han utilizado pruebas bioquímicas (Rengpipat *et al.*, 1998; Rengpipat *et al.*, 2000) y técnicas de identificación antigénica determinando porcentajes de colonización (San Miguel, 1996; Zherdmant, 1996).

2.10.4.2 Estimulación de la respuesta inmune

La estimulación del sistema inmune por la utilización de cepas probióticas ha sido reportado por Famularo *et al.*, (1997) y Gatesoupe (1999) como una característica a considerar en la selección de las bacterias.

La inmunoestimulación, es una alternativa para mantener el sistema de defensa activo, aumentando así la resistencia a virus o controlando poblaciones bacterianas patógenas, que puedan afectar la salud del hospedero.

En los camarones, varios compuestos microbiales se han presentado como principales estimulantes de las funciones celulares, entre ellos β -glucanos (BG), lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglucanos (PG). Estos compuestos pueden activar directamente funciones celulares, aunque la participación de las proteínas del plasma mejora la eficiencia de la respuesta inmune (Vargas-Albores *et al.*, 1998).

Los BG están presentes en la pared celular de levaduras y hongos, los LPS son los principales componentes de la pared celular de las bacterias Gram (-) siendo considerados por ciertos investigadores, herramientas potenciales en la prevención de enfermedades (Newman, 1996). Los PG proceden de la pared celular de bacterias Gram (+) y han sido objeto de investigaciones para evaluar la potencia de su administración, contra la vibriosis y contra el virus de la mancha blanca (Itami *et al.*, 1998).

La mayoría de trabajos para probar el efecto inmunoestimulante han sido realizando bacterina de Vibrios (Sung *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1998), o compuestos extraídos de la pared celular de bacterias y levaduras (Sung *et al.*, 1994; Song & Hsieht, 1994), pero son pocos los trabajos que han estudiado el efecto de administrar bacterias probióticas sobre la estimulación del sistema inmune del camarón.

2.10.5 Probióticos en acuicultura

Una de las dificultades encontradas en la producción intensiva de huevos y larvas de invertebrados, ha sido la pobre sobrevivencia y crecimiento a nivel larvario, atribuida al ataque oportunista de bacterias (Skjermo y Vadstein, 1999; Alabi, 2000), por lo que se procura el mantenimiento de baja carga bacteriana por diferentes protocolos de desinfección del agua de cultivo, tanto químicos (glutaraldehído, cloramfenicol, florfenicol flumequina, trimetrofrim, sulfadiazina), como físicos (filtración, irradiación luz ultravioleta, ozonación). Los anteriores métodos de desinfección o esterilización parcial pueden reducir o eliminar las bacterias en el agua de los cultivos; sin embargo, estos métodos pueden alterar el equilibrio entre las comunidades microbianas, favoreciendo la proliferación de bacterias oportunistas o el desarrollo impredecible de comunidades bacterianas que difieren de aquellas normalmente encontradas en agua de mar normal (Alabi, 2000).

El uso rutinario de antibióticos durante la crianza de larvas de peces y otros organismos marinos se plantea no aconsejable, ya que puede aumentar el riesgo de promover la resistencia al antibiótico y adversamente pueda influir en la microflora autóctona de la larva (Hansen y Olafsen, 1999; Alabi, 2000), además de los efectos adversos al medio ambiente y salud humana (Lambert, 1999). Al respecto, la Unión Europea ha regulado y prohibido el empleo de éstos en organismos para consumo humano (Torkildsen, 1999).

El empleo de probióticos ha demostrado ventajas en la producción controlada de organismos acuáticos en diversas etapas de su desarrollo larval y juvenil, por lo que la búsqueda de nuevos probióticos más eficaces sería un recurso potencial en la acuicultura marina.

La investigación de probióticos en la acuicultura se encuentra aún en sus primeras fases de crecimiento, por lo que mucho trabajo al respecto es necesario. Los principales grupos bacterianos que se han probado como probióticos en cultivo de peneidos, cangrejos, moluscos (ostión) y peces principalmente marinos, han sido *Vibrios*, *Pseudomonas*, *Bacilos*, *Levaduras* y *Lactobacilos*.

El conocimiento sobre la utilización de probióticos en la acuicultura es un campo sobre el cual se requiere aun demasiada investigación, a fin de contar con ellos como una herramienta que solucione las grandes tasas de mortalidad en los primeros estadios del desarrollo larvario de peces, crustáceos y moluscos, por causa de bacterias oportunistas (Alabi 2000).

Nimrat y Vuthiphandchai (2011) de la Burapha University de Tailandia, hicieron un estudio de 12 productos probióticos comerciales usados en la cría de camarones del mismo país, el objetivo era determinar la calidad de los productos probióticos empleados en el cultivo de camarones tailandés en base a dos criterios: la aproximación de la información en las etiquetas de los productos con respecto al número y tipos de microorganismos, y la aceptabilidad del número de microorganismos probióticos en los productos. Nimrat y Vuthiphandchai concluyeron que únicamente 2 de los 12 productos evaluados, contenían los criterios correctos, además, algunos de los productos comerciales que probaron, tienen una alta capacidad para la producción de amilasa, proteasa y lipasa; sin embargo, ninguno mostró actividad inhibitoria in vitro contra *V. harveyi*. Aunque su estudio al ser realizado en condiciones in vitro, la efectividad de probióticos en situaciones relevantes a la acuicultura, no concuerdan a las condiciones in vitro.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre los meses de enero y marzo de 2012, donde la fase de capacitación de manejo y protocolos empleados en la Estación comprendió del 3 al 16 de enero y del 7 al 20 de febrero y, la fase experimental del 21 de febrero al 9 de marzo.

3.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio fue de tipo descriptivo, experimental, relacional y explicativo a través del cual se determinó la influencia del uso de probióticos en la sobrevivencia del ciclo larval de *Litopenaeus vannamei* y su importancia económica.

3.2 ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación se llevó a cabo en la Estación de Maricultura Los Cóbano, dependencia del Centro de Desarrollo Pesquero, Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicada en el municipio de Acajutla, departamento de Sonsonate, El Salvador. La estación se encuentra ubicada entre los 13°32'40.61''N y 89°49'23.70''O, con una elevación de 4 msnm (figura A-4 y figura A-5).

3.3 POBLACIÓN

La población experimental estuvo conformada por 3.6 millones de larvas de *Litopenaeus vannamei* procedentes de la misma Estación.

3.4 METODOLOGÍA DE CAMPO

3.4.1 Tratamiento del agua de mar

Se utilizó un equipo de bombeo consistente en dos bombas, una con capacidad de 15 HP ubicada a 10m fuera de la puntera del mar y otra de 5HP con las que se extrajo el agua del mar.

Las pilas donde se recibió el agua, fueron lavadas previamente con ácido clorhídrico diluído para retirar materiales extraños (polvo, hojas secas, etc.) pues están a la intemperie. El agua bombeada se distribuyó a una batería de 10 pilas dividida en dos secciones. La primera sección consta de 6 pilas, 4 de ellas con dimensiones de 2x10m y 1.2m de

profundidad, y 2 de 2x5m y 1.2m de profundidad; la segunda sección tiene 4 pilas de 1.8x10m y 1.36m profundidad. Todas las pilas tienen capacidad de 20 toneladas donde se recolectó temporalmente el agua y se aplicó el siguiente tratamiento:

El agua pasó a través de un tubo de 4 pulgadas de diámetro para ser recibida en las pilas ya descritas. Al final de la tubería, cada pila cuenta con una válvula de paso donde se sujetaron filtros de doble plancton (1 micra de diámetro) para no dar paso a materiales extraños. Luego se aplicó 2-2.5gr de cloro por tonelada de agua y dejó reposar de 30 minutos a una hora, seguidamente se aplicó 1.5-2gr de tiosulfato por tonelada de agua y se dejó reposar 10 minutos para aplicar luego 5 partes por tonelada de EDTA para hacer que los metales pesados se sedimenten.

Antes de introducir el agua a los reservorios ubicados dentro del laboratorio, se hizo la prueba con un reactivo llamado OTO Test para detectar residuos de cloro en el agua. Este contiene ortotolidine <0.1% y ácido clorhídrico 3.7%. Se colocó una muestra de 5ml de agua ya tratada en un tubo y se agregaron 5 gotas del reactivo. A los lados de la prueba presenta una escala de colores que indican la cantidad de cloro existente en el agua (figura 5).



fig. 5 Kit de OTO Test

Luego de la prueba de OTO test, el agua pasó a través de un filtro industrial de arena. Esta arena es especial, pues tiene la función de absorber las partículas extrañas que aún quedaron en el agua por medio de sifón filtrando el agua nuevamente. En la válvula de las pilas de reservorio, se colocó un filtro de doble plancton para realizar el último filtrado antes de depositar el agua en las mismas.

3.4.2 Desinfección de material de laboratorio

Antes de comenzar el ciclo larval, todo el material y equipo a utilizar (tuberías, mangueras, cubetas, recipientes plásticos, mallas y otros) fue sometido a un proceso de limpieza y desinfección.

En las tuberías de oxígeno y agua, se utilizaron 200gr de cloro diluido en 20 Lts de agua potable, a lo cual se agregó un litro de formalina. Esta solución circula por el interior de la tubería por bombeo, luego se deja reposar por dos horas, se enjuaga una vez con agua de mar tratada y se deja reposar 10 días.

Para la desinfección de los demás materiales, se utilizó un recipiente de 2 toneladas de capacidad, se emplean 300gr de cloro diluidos en suficiente agua potable para que cubriera los materiales. Se dejó reposando 3 días en esta dilución, luego se lavó con agua de mar tratada, posteriormente se dejaron al sol durante dos días y procediendo a guardar hasta que fueron utilizados.

De igual forma las pilas de tratamiento de agua y las usadas para sembrar y desarrollar a las larvas durante el ciclo son desinfectadas con ácido muriático diluido (1 ½ Lts de ácido en 10-20 Lts de agua salada tratada), cepilladas y enjuagadas con suficiente agua mar tratada para retirar el residuo de ácido, pudiendo ser utilizadas inmediatamente.

3.4.3 Cultivo de microalgas

Las microalgas son un grupo variado de plantas microscópicas de diversas formas, tamaños, que viven en el medio acuático. Estas se encuentran naturalmente en rocas, flotado en el agua u otros materiales.

Las microalgas aportan diversos nutrientes como proteínas, vitaminas, fibra cruda y aminoácidos a la larva de camarón. Se empleó en la investigación las del género *Chaetoceros gracilis* pues son la base para la alimentación y producción de larvas de camarón marino.

Según FAO (1989), los recipientes de cultivo más comúnmente usados son de materiales no tóxicos como las cajas de petri, erlenmeyer, matraces ferenback o garrafas, adecuados para cultivos de laboratorio.

Para cultivos a gran escala los recipientes de plástico, madera y concreto son los más recomendables, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales, siendo los sistemas más económicos.

La cristalería que se utilizó (beaker, erlenmeyer, probetas, agitador, etc.) pasó por un proceso de desinfección con ácido muriático diluído, agua tratada y agua potable caliente. No se debe utilizar ningún tipo de jabón o detergente, pues pueden afectar el cultivo de microalgas. Luego de la desinfección del material, se procedió a la preparación de nutrientes para el crecimiento y estabilidad de las microalgas.

Es necesario que para el cultivo se simulen condiciones con diferentes medios en el laboratorio, estas son soluciones que nutren el agua de mar previamente tratada. Las fórmulas se clasifican en 4 según su composición:

Solución 1: Nitratos (nitrato de sodio y fosfato de sodio)

Solución 2: Metasilicatos (metasilicato de sodio)

Solución 3: Metales traza (cloruro férrico, EDTA, cloruro de magnesio, cloruro de cobalto, sulfato de zinc, sulfato de cobre, molibdato de sodio)

Solución 4: vitaminas (tiamina, cianocobalamina y biotiamina)

Una vez preparadas se colocaron en un autoclave a 121°C durante 40 minutos.

3.4.3.1 Pre-masivo 1

En un erlenmeyer de 1000ml se colocaron 500ml de agua tratada (filtrada, clorada y esterilizada con rayos UV), se adicionó 1ml de cada solución nutritiva y se inoculó un aproximado de 10 a 100ml de microalgas. La cantidad de microalgas que se inocule dependerá de la demanda o urgencia que se necesite.

Luego de cultivadas, se mantuvieron con luz artificial (lámparas fluorescentes) las 24 horas y se agitaron manualmente de 2-3 veces al día para evitar la sedimentación de algas muertas. A medida se multiplicaban las algas en el medio líquido formado por las soluciones nutritivas, fue necesario cultivarlas en recipientes de mayor capacidad.

3.4.3.2 Pre-masivo 2

Para este proceso se utilizaron recipientes de plástico con una capacidad de 19.5 Lts previamente desinfectados (enjuagados con agua de mar tratada y esterilizada, luego se aplicó ácido clorhídrico diluído y se dejó secar al aire libre). Al cultivo se le agregaron de 13 a 15 Lts de agua tratada y esterilizada, se fertilizó con 19 cc de cada una de las soluciones nutritivas, además se inoculó con 3-5 Lts de microalgas para cada recipiente. Se dejó crecer durante 2-3 días a luz solar directa y con aireación constante (figura 6).

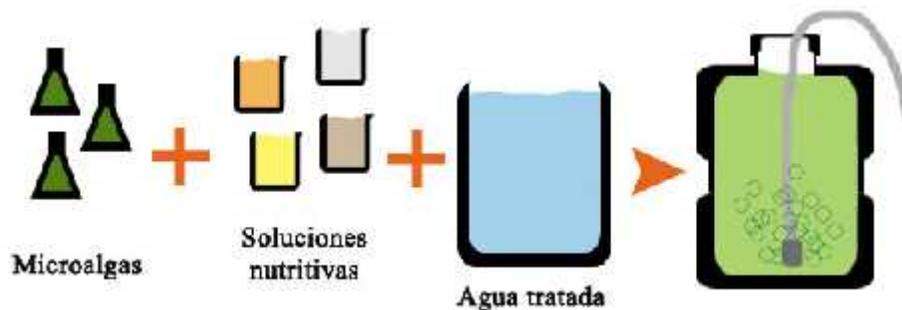


figura. 6 Esquema de premasivo 2 en cultivo de microalgas

3.4.3.3 Masivo

Primero se desinfectó el tanque de fibra de vidrio donde se cultivó el alga. Este tiene 2m de diámetro, 0.8m de profundidad y capacidad de 2 toneladas. Se utilizó agua de mar tratada y esterilizada por un filtro de rayos UV, se llenó hasta una tonelada para luego inocular 48.75 litros de microalgas. Seguidamente se fertilizó con una solución que contenía metasilicato de sodio, fosfato de sodio, urea, vitamina C y B1. Se dejó incubar 24 horas para luego subir el nivel del recipiente hasta 2 toneladas y se utilizó 24 horas después en las pilas de levantamiento larvario (figura 7).

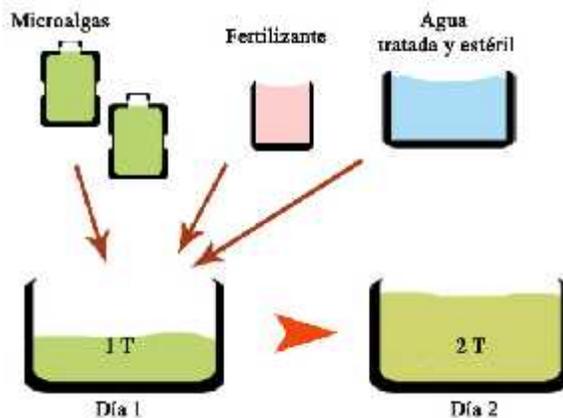
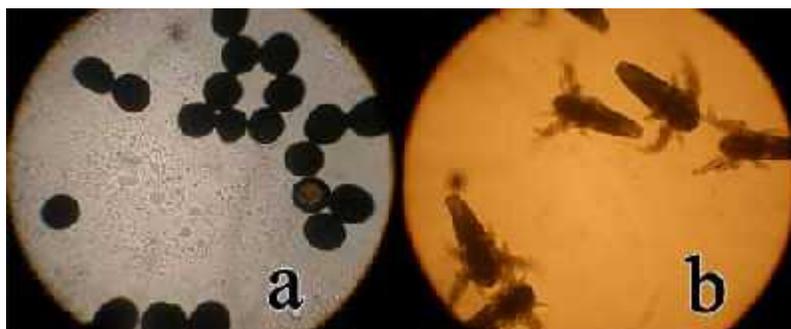


figura. 7 Inoculación de cultivo pre-masivo a cultivo masivo

3.4.4 Obtención de nauplios de artemia.

Desde la fase donde las larvas pasan a mysis, se agregaron a su dieta nauplios de *Artemia salina*. Estas se obtuvieron de cistos empacados al vacío procedente de Taiwan, cuya eficiencia de eclosion es de un 90%, lo que equivale a 280,000 artemias.

Los cistos pasaron por un proceso de descapsulación, consistente en hacer eclosionar a la artemia. (figura 8)



a. Cistos

b. Artemia descapsulada 24 horas después

figura. 8 Eclosión de artemia

Para esta, fue necesario mantener ciertas características: T° = temperatura ambiente, salinidad = 30 ups, tiempo de 24 horas, oxígeno a saturación (100%).

Para la descapsulación, se colocaron los cistos en un lumpen, se utilizó 50gr de cloro por cada 100gr de artemia y agua dulce para desinfección y se dejó reposar 30 segundos. Luego, se procedió a lavar con agua salada tratada durante de 5-10 minutos para quitar residuos de cloro. Seguidamente, se llenó la incubadora (previamente desinfectada con ácido muriático y agua salada tratada) hasta 250 litros de agua de mar tratada y se añadieron los cistos para dejar incubar por 24 horas con aireadores y sin tapar (figura 9).



figura. 9 Incubadoras de nauplios de artemia, en la parte superior tubería de aireación.

Pasado este tiempo, se retiraron los aireadores y se taparon las incubadoras dejando reposar de 10-15 minutos, de esta forma la cáscara de los cistos flotará y la artemia por su naturaleza, irá al fondo buscando la luz (el fondo de la incubadora es translúcido). En la base de la incubadora se encuentra una válvula, bajo esta se colocó un guacal con un cuadrante (un cuadro hecho de tubos PVC de 1.27cm) y sobre este un lumpen donde se recibieron las artemias eclosionadas.

Al tener el lumpen lleno, se lavó la masa de artemias con agua salobre para quitar cualquier tipo de residuo. La artemia puede guardarse para congelar (se escurre y se coloca en una bolsa de 5lbs y se deja congelando durante 24 horas) o, puede darse viva (se coloca en un recipiente de 19 Lts con aireadores hasta ser suministrada). En la fase de mysis 1 hasta PL 1

se ofreció la artemia congelada ya que están desarrollando su instinto de caza (la actividad natatoria de la artemia es más rápida que el de la larva).

3.4.5 Levantamiento larvario de la población experimental en el laboratorio.

Los nauplios se obtuvieron de reproductores criados en la misma Estación luego de un aclimatamiento de 15 días en el área de maduración. En las hembras se realizó la técnica de ablación ocular (figura 10) y se esperó una semana para empezar a cosechar el nauplio.



figura. 10 Ablación ocular en la hembra de *Litopenaeus vannamei*.

En la etapa de levantamiento larvario se realizaron los siguientes procesos:

3.4.5.1 Desinfección

Se desinfectó la tubería de aireación que va en el fondo de la pila dejándose reposar con ácido clorhídrico diluído, luego se enjuagó con agua de mar tratada y se armó.

3.4.5.2 Control de la temperatura

Se colocó un calentador de agua de 69cm de largo y 2.5cm de diámetro y, un termómetro de 43cm de largo y 1cm de diámetro, ambos ubicados dentro de la pila y suspendidos cerca de las esquinas sobre un tubo de PVC de 2.54cm, teniendo el cuidado de que no rozaran la pared ni el fondo de esta.

El termómetro y el calentador están conectados a una caja reguladora de la temperatura, el primero controla la temperatura del medio acuático de la pila y el segundo, se encarga de irradiar calor en el medio acuático. Cuando la temperatura que se marca en la caja es menor, el termómetro envía la señal para que el calentador se encienda y llegue a la temperatura deseada, caso contrario, el termómetro envía la señal para que la caja apague el calentador.

Se colocó un segundo termómetro (de alcohol) de 30cm de largo al otro extremo de la pila suspendido en el agua. Este se usó para rectificar la temperatura en el medio acuático durante todo el experimento y tomar datos aproximadamente a las 9pm.

3.4.5.3 Preparación del material a utilizar por pila

Se mantuvo durante el experimento un recipiente plástico de color blanco opaco para revisar larvas, un beaker de 500ml para examinar las observaciones del nivel 1 de las larvas, un rociador con alcohol para desinfectar manos y material, dos filtros para recambio de agua, dos mangueras para recambio de agua, 2 tubos de PVC para llenado luego del recambio (regadera hecha con un tubo agujerado de 4m de largo y 1 ½ pulgadas de diámetro), dos mangueras de fibra de vidrio de 5.08cm de diámetro conectadas a un tubo de PVC agujerado del mismo diámetro para recambio, un limpiador de paredes, una cubeta, una tabla para anotación de datos (Cuadro A-2), plásticos para cubrir las pilas y un lugar de observación de las larvas (hecho de madera, forrado con material oscuro para poder observar la larva día y noche con ayuda de un foco ahorrativo).

3.4.5.4 Pilas

Se utilizaron cuatro pilas de concreto de forma rectangular, cubiertas con pintura epóxica de color blanco, de dimensiones de 2m de ancho y 4m de largo, una profundidad de 2m, con capacidad para 10 toneladas de agua y, una forma cóncava en el fondo para facilitar la limpieza.

Cada pila cuenta con un sistema propio de aireación formado por tuberías de PVC sujetadas con abrazaderas atornilladas en el concreto del fondo y previamente desinfectados antes del llenado, esto promueve un constante movimiento del agua que se obtiene de la forma de

bombeo antes descrita. El agua que se utilizó para el llenado de las pilas era transportada por tubos de PVC de 7.62cm ubicados en el borde de cada pila cerca de la pared del laboratorio. Para distribuirla de manera uniforme, se utilizaron las regaderas.

Cuando se recibieron los nauplios, las pilas se llenaron con agua de mar tratada hasta 6 toneladas con una salinidad de 30 Unidades Practicas de Salinidad (UPS).

3.4.5.5 Siembra de nauplios

Los nauplios eclosionados, son transportados en una cubeta de capacidad de 10 Lts desde la sala de maduración, hasta la pila donde se sembraron. Se realizó el conteo de nauplios sembrados en las pilas.

3.4.5.6 Manejo de las larvas

- **Mantenimiento de la temperatura:** Se cubrieron las pilas con plásticos previamente desinfectados con ácido clorhídrico diluído (2 litros de ácido en 20 litros de agua salada) ya que la cobertura contribuya a mantener la temperatura del medio. La cobertura plástica se mantuvo las 24 horas del ciclo larval desde la siembra hasta que esta mudó a Zoea 1, luego durante el ciclo se taparon sólo por la tarde y noche. Cuando la larva alcanza el estadio de Postlarva 2 (PL 2), se retiró la cobertura pues en esta etapa resiste más a los cambios de temperatura.

- **Nivel del agua, recambio y sifoneo:** Al tercer día luego de la siembra, se subió el nivel de las pilas hasta una capacidad de 10 toneladas.

Para el recambio de agua de las pilas, se introdujo a la pila el filtro para recambio y dentro de este, la manguera de recambio. Por medio de sifón se extraía el agua hasta cierto nivel considerando además si el medio se encontraba muy sucio, el agua extraída se eliminaba en el desagüe ubicado al centro del laboratorio para ser colectada en la laguna de oxidación.

El recambio del medio acuático de las larvas se hizo cuando se observaron partículas gruesas de alga adheridas a las paredes de las pilas y una cantidad considerable de heces en el medio (Cuadro A-4). Este recambio se hizo al principio una vez al día, cuando la larva estaba en un estadio de Mysis, se realizó un recambio por la mañana y tarde. Luego de

terminados los recambios y antes de subir el nivel de la pila, se utilizó el limpiador de paredes para retirar excesos de suciedad adheridos a la pared. Este limpiador se desinfectaba previamente enjuagándolo con agua potable caliente, y después de usado se enjuagaba con agua salada tratada.

Cuando se observaba una capa de sedimento en el fondo de las pilas, se procedía a sifonear por medio de una tubería de pvc. Al final de esta se colocaba un cuadrante, un lumpen y un recipiente para recibir el material sifoneado, de esta forma se capturaban larvas que pudiesen escapar. Cuando se realiza el sifoneo es necesario que el agua entrante a la pila sea constante y no se aglomeren las larvas en poca agua; además, la tubería de aireación debe cerrarse antes y durante el sifoneo para favorecerlo.

3.4.5.7 Alimentación:

Cuadro 7. Esquema de alimentación en el ciclo larval de *Litopenaeus vannamei*

ALIMENTO VIVO	MICROALGA		ESTADÍO	CANTIDAD (Lts) ¹	No. DE VECES / DÍA	
			Nauplio 5	1000	1	
			Zoea I a III	500		
			Mysis I a III	200-500		
			Postlarva 1 a 6	200-500		
ALIMENTO VIVO	ARTEMIA	ESTADIO	CANTIDAD (g)	No. DE VECES / DÍA	RACIÓN	
		Zoea III	5	4 ²	Congelada ³	
		Mysis I a III	10-15			
		Postlarva 1	20			
		Postlarva 2 a 6	25-80		Viva ⁴	
ALIMENTO ARTIFICIAL	MIX 1	ESTADÍO	CANTIDAD (g)	No. DE VECES / DÍA	DILUSIÓN ⁶ (Lts)	DIÁMETRO DEL TAMIZ ⁷ (Mesh)
		Zoea III	5	2 ⁵	5-10	150
		Mysis I a III	8-10	4 ⁸		56
	Postlarva 1	10	56			
	Postlarva 2 a 4	10-15	56			
	Postlarva 5-6	15-25	Sin tamizar			

¹Las cantidades de microalgas se mantenían siempre que hubiera disponibilidad en la Estación. La cantidad proporcionada depende del estadio en que se encuentra la larva, en este caso, los primeros estadios necesitan mayor cantidad ya que es su alimentación principal

²Horario: 3:00am, 9:00 am, 3:00pm y 9:00pm.

³Disuelto en 10 litros de agua de mar tratada.

⁴Disuelto en 19 litros de agua de mar tratada.

⁵Horario: 12am y 12pm.

⁶En agua salada tratada.

⁷El alimento se tamizaba antes de diluirlo. 150 Mesh equivalente a 108 micrómetros.

⁸Horario: 6am, 12pm, 6pm y 12am.

El Mix brindado a las larvas está formado por componentes esenciales para la nutrición en el ciclo de levantamiento. Este se divide en dos: mix 1 brindado hasta PL 1, y mix 2 brindado desde PL 2 en adelante.

El alimento era diluído, desde Zoea hasta Postlarva 2-4 pues su presentación era en polvo, en un máximo de 10 Lts de agua salada tratada para proporcionar a las larvas aplicando directamente en las pilas. Al llegar al estadio de PL5, el alimento se daba al voleo (figura A-1).

3.4.5.8 Limpieza y desinfección de las pilas de Tratamiento control

Aplicación de formalina y yodo: se aplicaron 50ml de formalina en la pila 4 pues se observó presencia de *Pseudomona* sp., también 50ml a cada una de las pilas testigos luego de realizar sifoneo. Se añadieron 5ml de yodo a cada una de las pilas testigo luego de tomar muestras para enviar a laboratorio.

3.4.6 Preparación y aplicación del probiótico

El producto que se utilizó se mantuvo almacenado durante todo el experimento bajo temperatura de refrigeración (4°C-10°C) en su empaque original (figura A-3).

Antes de manipular los materiales empleados para la preparación del probiótico, se desinfectaron las manos con agua y jabón y luego se utilizó alcohol gel o líquido.

La preparación de materiales se realizó en las instalaciones del laboratorio de microalgas en condiciones asépticas. Los materiales utilizados para la dilución del probiótico, se desinfectaron con alcohol antes y después de la aplicación del producto.

Utilizando un frasco previamente esterilizado, se pesó el probiótico en una balanza semianalítica (figura 11).



figura. 11. Preparación de la cantidad de probiótico a utilizar por tratamiento

Al tener el peso requerido según el estadio de la larva (Cuadro 8), se tapó inmediatamente y se trasladó al laboratorio de levantamiento larvario junto con los demás materiales (cubeta, plástico para cubrir la cubeta, manguera para aireación, etc.).

Cuadro 8. Gramos de probiótico utilizados en el ciclo larvario

ESTADÍO	DÍAS PROMEDIO POR ESTADÍO	Probiótico	TOTAL DE PROBIÓTICO g/MILLON/ DÍA
		(g / 100,000 larvas sembradas)	
NAUPLIO	2	5,0	50
ZOEA	4	4,0	40
MYSIS	4	3,0	30
PL1 -PL4	4	3,0	30

Tomando en cuenta que la presentación del probiótico es en forma de polvo, se procedió a la dilución en 10 litros de agua salada tratada en una cubeta de la misma capacidad, aplicando poco a poco el producto a la vez que se mezclaba con una pieza de tubo de PVC (figura 12).



figura. 12 Dilución del probiótico

Posteriormente se cubrió la cubeta con plástico transparente para evitar contaminación, además se colocó una manguera para mantener una aireación continua.

Se dejó reposar durante 2 horas para facilitar la incubación del complejo de bacterias que conforman el probiótico. (figura 13)



figura.13 Incubación del probiótico en el laboratorio de levantamiento larvario

Para aplicarlo en las pilas de levantamiento larvario, nuevamente se desinfectaron las manos, homogeneizando la dilución con un recipiente plástico para luego tomarlo y esparcirlo en la pila de manera uniforme. El probiótico se aplicó cada 24 horas durante las noches, desde el día de la siembra del nauplio hasta que se cosechó de las pilas de levantamiento larvario.

Hay que considerar que al utilizar productos probióticos, la dosificación aplicada está fundamentada en: la densidad de siembra, parámetros del agua y el tamaño de la pila.

El producto comercial recomienda una dosis de 5gr por cada 100,000 larvas o por cada 1000 litros de agua del estanque, reducirla o mantenerla es opcional de acuerdo a las condiciones mencionadas anteriormente. Las dosis utilizadas en el experimento se adaptaron a las condiciones existentes en el laboratorio, variando según el estadio de la larva.

3.5 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

3.5.1 Factor en estudio

Aplicación de probiótico diariamente en el medio acuático de larvas hasta ser cosechadas de las pilas de levantamiento larvario

3.5.2 Descripción de los tratamientos

En el estudio se utilizaron dos tratamientos:

T0: testigo o control (tratamiento rutinario dado a las larvas en la Estación de Los Cóbano). En el cual comúnmente se utiliza yodo y formalina si existiesen algunos inconvenientes en la salud de la larva.

T1: Aplicación del probiótico en el ciclo larval. La cantidad a utilizar fue variable acorde al estadio, y los parámetros del agua.

3.5.3 Diseño estadístico

La prueba utilizada fue T de Student con parcelas pareadas de igual o diferente número de observaciones, ya que se ajusta más a la naturaleza del experimento y facilita tanto el manejo de los tratamientos, como la medición de las variables. Además, la prueba estadística es recomendada para casos de evaluación de dos tratamientos como sucede en esta investigación.

Para realizar este tipo de prueba, era necesario contar con un mínimo de 6 grupos para recolección de datos, en el experimento estos grupos se sustituyeron por muestreos hechos a ambos tratamientos para la obtención de datos.

3.5.4 Número de repeticiones

Las repeticiones físicas fueron 2 para cada tratamiento: las del tratamiento probiótico se denominaron T1R1 y T1R2, mientras que las del testigo fueron T0R1 y T0R2.

En todas las pilas se realizaron 3 muestreos de sobrevivencia en la etapa de Zoea a Mysis, de Mysis a Postlarva y el día de la cosecha larval para obtener un aproximado de 36 repeticiones en el tiempo; 1 prueba de PCR el día de la cosecha larval, medición de temperatura y salinidad del medio acuático diariamente durante el experimento, y 1 prueba microbiológica (hisopado y análisis de agua) al final del experimento, por repetición en cada uno de los casos.

Los muestreos de sobrevivencia se realizaron en los estadíos ya antes mencionados, ya que las larvas con la mejor capacidad son las que logran mudar al siguiente estadio, además que son momentos clave donde las larvas se ven susceptibles a posibles ataques de patógenos oportunistas. El resto de pruebas se realizaron en el día 18 cuando las larvas se cosecharon de las pilas de levantamiento.

3.5.5 Modelo estadístico

Se define por la siguiente expresión algebraica:

Para igual número de observaciones: $|T_c| = \frac{\mu X_1 - \mu X_2}{\sqrt{\frac{X_{12} + X_{22}}{n(n-1)}}}$

$$X_{12} = \frac{X_{12}}{n} - \frac{(X_{12})^2}{n}$$

$$X_{22} = \frac{X_{22}}{n} - \frac{(X_{22})^2}{n}$$

Para diferente número de observaciones: $|T_c| = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{n_1 + n_2}{(n_1 + n_2 - 2)} \left(\frac{X_{12} + X_{22}}{n_1 + n_2} \right)}}$

Prueba de hipótesis : Si $|t_c| > t$ tablas con nivel de significancia α y $2(n-1)$ G.L, entonces se rechaza H_0 .

Donde:

μ_{X1} y μ_{X2} = media de cada tratamiento

X_{12} = suma de cuadrados para la muestra X_1

X_{22} = suma de cuadrados para la muestra X_2

$n-1$ = grados de libertad.

G.L: $n_1 + n_2 - 2$ = cálculo de grados de libertad para diferente número de observaciones

G.L: $2(n-1)$ = cálculo de grados de libertad para igual número de observaciones

$|T_c|$ = valor absoluto de t calculado, este se tomará de la tabla del Cuadro A-4.

n = muestra.

H_0 = hipótesis nula.

α = nivel de significancia.

3.5.6 Nivel de significancia

Se tomó el 5% por existir condiciones homogéneas en la investigación.

3.5.7 Plano de distribución del tratamiento

El arreglo espacial de los tratamientos en el laboratorio de levantamiento larvario fue el siguiente:

1. Pilas de cultivo
2. Pilas de reservorio de agua
3. Desagüe del laboratorio

T0: Marcado con asterisco rojo

T1: Marcado con x verde

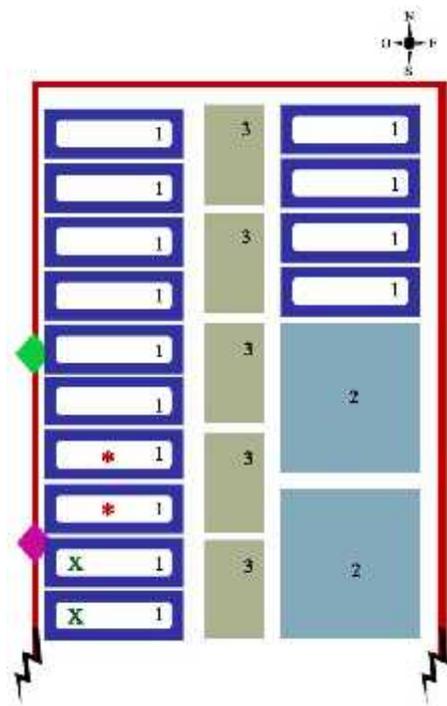


figura. 14 Distribución de los tratamientos en la Estación de Los Cóbano

Tanto T0 como T1 se manejaron en pilas adyacentes debido a que al momento de realizar el experimento, en la Estación no había disponibilidad de pilas lejanas porque todas ya estaban siendo usadas para un ciclo. Por esta razón se decidió esperar a que las pilas correlativas de la 1 a la 4 quedaran libres para comenzar un nuevo ciclo y aquí, implementar el uso del producto probiótico.

3.5.8 Variables y parámetros a evaluar

Cuadro 9. Variables del experimento

Variable independiente	Variable dependiente
X = Probiótico	Y1 = Porcentaje de sobrevivencia (por método volumétrico) Y4 = Análisis microbiológico (patógenos en el ambiente acuático) Y5 = PCR (resistencia de sobrevivientes)
Parámetros	Temperatura Salinidad.

3.6 METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA

3.6.1 Sobrevivencia

Se hizo uso del método volumétrico de conteo empleado en la Estación: consiste en la toma de 4 muestras en diferentes puntos representativos de la pila a una profundidad aproximada de 50cm bajo la superficie del medio acuático. Para el muestreo se utilizó un beaker de 250ml depositándolas en un recipiente de fondo blanco opaco (utilizado para revisión de larvas) para hacer un total de 1000ml. Con la ayuda de un recipiente más pequeño también de fondo blanco opaco, se procede a contar las larvas vivas regresándolas a la pila de donde se extrajeron. Con el número de larvas contadas, se hace un estimado del total mediante una regla de tres simple para lograr una equivalencia de mililitros a la capacidad total de cada pila de cultivo (10,000 litros de agua) (Anexo 2).

Los muestreos se realizaron 3 veces durante todo el ciclo larval, estos se distribuyeron en:

- Primer muestreo: muda de Zoea a Mysis.
- Segundo muestreo: muda de Mysis a Postlarva.

- Tercer muestreo: día de la cosecha de las larvas de las pilas de levantamiento.

En cada uno de los muestreos realizados, se hicieron de 2 a 3 conteos, siendo un total de 12 y un aproximado de 36 conteos en toda la investigación.

3.6.2 Microbiología del agua

Para el análisis bacteriológico del agua se realizaron prácticas de limpieza para evitar la alteración de los resultados del examen, este procedimiento se hizo en ambos tratamientos, el día de la cosecha de las larvas:

3.6.2.1 Desinfección de manos

Se lavaron las manos hasta el codo con agua y jabón, posteriormente se secaron con papel toalla y se roció una solución desinfectante viricida compuesta de ácidos orgánicos, biocidas orgánicos, compuestos peroxigenados y surfactantes. Posteriormente se colocaron guantes de látex y sobre estos, se roció nuevamente con la misma solución.

3.6.2.2 Recolección de muestras

Los frascos usados para la colección de muestras, estaban previamente esterilizados en autoclave. El material utilizado para la toma de muestras se desinfectó con la solución viricida en cada ocasión. (figura 15)



figura. 15 Frascos estériles para la recolección de muestra de agua

Las muestras de agua fueron recolectadas en las instalaciones del laboratorio de levantamiento larvario. Para evitar que las larvas ingresaran al frasco, se colocó un filtro con una malla de 50 mesh en la pila, dentro de este se introdujo una manguera de fibra de vidrio para extraer el agua por sifoneo. Se tomaron 250cc de agua en cada frasco para ambos tratamientos (figura 16). Se taparon inmediatamente luego de obtenida la muestra con una tapa de rosca, la cual se cubrió con un papel atado con una cinta de nylon igualmente esterilizados en autoclave para su protección.



figura. 16 Toma de muestra de agua

Para identificar cada muestra, se numeraron los frascos según tratamiento, luego se transportaron dentro de una hielera a una temperatura de refrigeración, entre 4°C a 10°C, para su posterior análisis en los laboratorios de la División de Sanidad Animal y Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería (Cuadro A-10, A-11 y A12).

3.6.3 Microbiología del medio acuático

Al igual que con el análisis de agua, las muestras fueron manipuladas con las manos previamente desinfectadas, utilizando guantes y rociadas con solución viricida.

Después de la cosecha de larvas, se tomaron muestras de las paredes y el fondo de las pilas vacías, utilizando hisopos esterilizados previamente en autoclave. Para llegar al fondo de las pilas, se usó una escalera, tomando la muestra e introduciendo el hisopo en el medio de transporte (figura 17): una bolsa estéril y con viñeta para identificar la muestra.



figura. 17 Toma de hisopado de pared

Todas las muestras se mantuvieron en refrigeración de igual forma que las de agua y se enviaron a los laboratorios del Ministerio de Agricultura (Cuadro A-9).

3.6.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los materiales utilizados se desinfectaron de la misma manera que para los análisis microbiológicos.

Con un lumpen de malla de 50 mesh se colectaron las larvas, con un hisopo previamente esterilizado se tomaron los especímenes y se depositaron aproximadamente 100gr en un tubo de ensayo conteniendo una solución de alcohol y, se identificaron las diferentes muestras tomadas en ambos tratamientos (figura 18).



figura. 18 Introducción de larvas en tubo para análisis de PCR

Se mantuvieron en temperatura de refrigeración y enviaron a los laboratorios de División de Sanidad Animal y Vegetal del MAG, solicitando las pruebas de Virus de la cabeza amarilla (YHV), virus de taura (TSV) y virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) (Cuadro A-13).

3.6.5 Condición general de las larvas

Se inspeccionaron las larvas según estipula la FAO en 2004 en el Documento Técnico de Pesca 450 (Cuadro A-5).

3.6.5.1 Actividad natatoria

Con un recipiente plástico de fondo blanco opaco, se tomaban muestras de cada tratamiento de 3 a 4 veces al día para observar la velocidad y capacidad de nado de las larvas durante todo el experimento.

3.6.5.2 Contenido intestinal

Luego de brindar el alimento, se observaba el cuerpo de la larva, que al ser traslúcido, se distinguía fácilmente su intestino lleno, característico de estar alimentándose. Se observaban al menos una vez al día durante todo el experimento.

3.6.5.3 Fototaxis

Esta observación se hizo únicamente en el estadio de Nauplio hasta Zoea II-III, tomando muestras de larvas con ayuda de un beaker de 250ml que se colocaba en una cámara negra donde se instaló al fondo un foco fluorescente. Las larvas que mostraban una fototaxis positiva, subían en busca de la fuente de luz (Anexo 4).

3.6.5.4 Hilo fecal

Como en el caso de la actividad natatoria, se tomaban muestras de larvas para observar la presencia de hilo fecal adherido a la cola de las larvas. Se revisaban usualmente por las mañanas durante todo el experimento (Anexo 4).

3.6.5.5 Luminiscencia

Se favorece la observación de esta condición durante la noche, en total oscuridad del laboratorio. En ambos tratamientos se observaban las pilas en busca de luminiscencia, pero durante el experimento no se detectó (Anexo 4).

3.6.5.6 Homogeneidad del estadio

Se tomaban muestras de larvas durante las mañanas durante todo el estudio para evaluar la relación del cambio de los estadios larvales.

3.6.5.7 Necrosis

Se observaban larvas al microscopio en busca de lesiones en el cuerpo de la larva y extremidades (Anexo 4, figura A-2).

3.6.5.8 Deformidades

Al microscopio se observaban las larvas en busca de mal formaciones como torsiones o falta de miembros durante los primeros estadios larvales.

3.6.5.9 Fouling epibionte

Se observaba el cuerpo de la larva al microscopio en busca de prominencias anormales causadas por la adhesión de microorganismos en el cuerpo de la larva.

3.6.6 Toma de parámetros físico químicos del agua

3.6.6.1 Temperatura

La temperatura fue tomada una vez al día en ambos tratamientos por medio de un termómetro de alcohol. Cada pila contaba con un termómetro que permaneció en estas durante todo el experimento.

3.6.6.2 Salinidad

El porcentaje de salinidad del medio acuático de las larvas fue medido con un salinómetro refractómetro manual, una vez al día en cada pila durante todo el experimento.

3.7 ANÁLISIS ECONÓMICO

Para evaluar nuevas tecnologías propuestas en una investigación, se hace necesario acompañar los análisis estadísticos con un análisis económico.

Este se realizó bajo la metodología propuesta por el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT, 1988), el cual consiste en un análisis de presupuesto parcial; para lo cual se hará uso del presupuesto general de la investigación.

3.7.1 Presupuesto parcial

Este se encaminó a obtener los costos y beneficios de los tratamientos alternativos, tomando en cuenta el rendimiento y ajuste de tratamientos.

3.7.1.1 Rendimiento

Se midió por el número de individuos que sobrevivieron para ambos tratamientos al final del ciclo.

3.7.1.2 Ajuste de tratamientos

El valor del rendimiento se midió de cada pila reducido en un porcentaje estimado así:

a. 5% por el uso de agua directa del mar: El uso de agua marina previamente tratada permite que microorganismos patógenos no logren entrar a la fase larvaria.

b. 3% de medición de parámetros físico-químicos: Al estar en laboratorio, los parámetros son medidos más eficientemente por ser una fase delicada en el ciclo productivo del camarón.

c. 2% de manejo: La revisión y alimentación están sujetas a un riguroso horario según estado larvario, por ello la crianza está más controlada a otras explotaciones comerciales.

En total el ajuste consistirá en una reducción del 10% en el rendimiento medio.

3.7.1.3 Beneficios brutos de campo

Se usaron los rendimientos ajustados como se mencionaban anteriormente y se multiplicó el precio de campo, que son los costos de kilogramo del probiótico.

3.7.1.4 Costos que varían por tratamiento

Costo del probiótico que se usará. Al final estos se sumaron para obtener el total de estos.

3.7.1.5 Beneficios netos

Se calculó restando el total de los costos que varían respecto al beneficio bruto de campo para cada tratamiento de la investigación.

Al final de la investigación se realizó un análisis de la relación costo-beneficio tomando en cuenta todos los datos de los ingresos, costos y beneficios.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Sobrevivencia larval.

En ambos tratamientos se realizaron tres conteos volumétricos de sobrevivencia larval.

Cada conteo correspondía a un estadio específico de las larvas:

SV1, conteo realizado en las cuatro pilas el día en que las larvas fueron “sembradas”;

SV2, conteo realizado en las cuatro pilas cuando las larvas estaban en estadio de Mysis I, y

SV3, conteo realizado en las cuatro pilas, el día en que las larvas fueron cosechadas.

Los datos obtenidos de los 12 conteos, se compararon entre sí mediante el pareo de datos entre tratamientos. Los pareos obtenidos de los tres muestreos y ambos tratamientos fueron 15 en total (Cuadro A-6).

Los resultados alcanzados en el análisis de esta variable permiten afirmar que la aplicación del probiótico experimentado, alcanzó una sobrevivencia del 42% contra un 30% de sobrevivencia del tratamiento testigo. Estadísticamente los tratamientos en estudio produjeron efectos diferentes en la sobrevivencia de larvas de camarón marino *Litopenaeus vannamei* ($P < 0.05$), respecto a un promedio del 61.63% de sobrevivencia obtenidos en la Estación de ciclos anteriores y un 50.35% de ciclos siguientes al experimento.

La sobrevivencia que los especialistas en el área dan como aceptable es variable, sosteniendo que una sobrevivencia del 75% en adecuadas condiciones de laboratorio y nutrición basada en alimento artificial y vivo es razonable. Si la alimentación es sólo a base de microalgas aunque las condiciones del laboratorio no sean muy adecuadas, podría aceptarse un 50%; pero si las condiciones de laboratorio no son muy adecuadas y hace falta microalgas en los primeros estadios larvales, su sobrevivencia decae hasta un 25% (Navarrete, 2012)⁶ (Cuadro 10).

La mayoría de los insumos (las microalgas y los nauplios de *Artemia*) y las propias larvas de *Litopenaeus vannamei* son fuentes de variación natural, por tratarse de materiales biológicos. A estas posibles variaciones de origen biológico, se suman las rutinas de manejo estandarizadas, comúnmente usadas en los laboratorios de larvicultura a nivel

⁶ Navarrete M., 16 de mayo de 2012. Sobrevivencia Larval en laboratorio (entrevista). San Salvador, El Salvador.

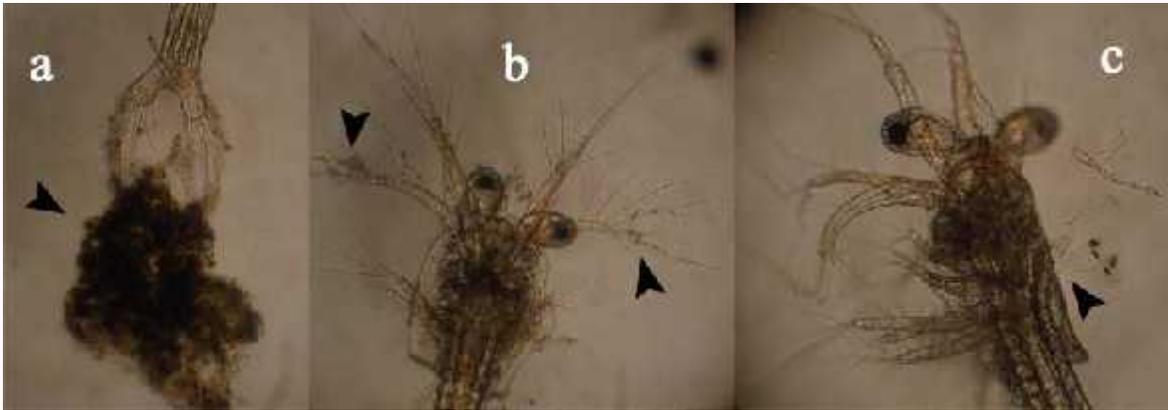
mundial. Si uno o más de estos eslabones falla puede tener graves repercusiones en la sobrevivencia larval. (Bray y Laurence, Fast y Lester, 1992).

Cuadro 10. Promedio de sobrevivencia durante el ciclo

TRATAMIENTO Y REPETICIÓN	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA			PROMEDIO DE SOBREVIVENCIA POR TRATAMIENTO
	PRIMER MUESTREO	SEGUNDO MUESTREO	TERCER MUESTREO	
T1R1	37.77%	33.7%	26.77%	42%
T1R2	81.48%	76%	56.52%	
T0R1	59.36%	53.4%	34.73%	30%
T0R2	41.8%	37.62%	24.42%	

Al retomar el tercer escenario planteado por Lic. Navarrete, M en 2012 y aclarar las condiciones particulares que sucedieron en el laboratorio, tales como: falta de microalgas y desperfectos en la bomba para realizar recambios adecuados, las larvas tratadas con probiótico mostraban en el estadio de Zoea un hilo fecal más largo que las del tratamiento testigo, signo de consumir más alimento (microalgas), por lo que se decidió comenzar a brindar alimento artificial, y a su vez, empezar a realizar recambios de agua.

En el momento en que los recambios formaban parte importante de la rutina, la bomba que extrae el agua de mar, sufrió desperfectos, imposibilitando los recambios de agua donde se desarrollaba el camarón durante la fase larval de Zoea I a Mysis II. Durante dos días consecutivos, en el medio no se eliminaron desechos producidos por las larvas, además las microalgas al tener un ambiente favorable para la replicación, crecieron excesivamente, llegando a colonizar el exoesqueleto de las larvas (denominado fouling epibionte) (figura 19), sumando a esto que el hilo fecal al ser largo, se enredaba en su cola, haciéndolas más lentas y evitando su muda.



a. Heces y microalgas adheridas a la cola.

b. Microalgas adheridas en apéndices.

c. Filamentos adheridos en el cuerpo.

fig. 19 Fouling observado a 40x en larvas tratadas con probiótico.

Además de esto, otro factor que influyó en la sobrevivencia fue la mala calidad y falta de microalgas para brindar a las larvas al entrar al estadio de Mysis, pues las microalgas de masivo cayeron, provocando la falta de estas en la Estación. Para solucionar esto, en la Estación se filtró una cepa usada anteriormente porque estaba contaminada, pero no pudo lograrse la réplica con rapidez, por esta razón la aplicación de microalgas en las pilas del experimento fue irregular desde este momento.

Una baja calidad del agua y de microalgas pueden desencadenar una disminución en la sobrevivencia y crecimiento, retraso en la muda o estadio, deformidades e incremento del fouling epibionte. Está demostrado que en el estadio de Zoea se han asociado altas mortalidades con la calidad de alga que se brinda y una insuficiente concentración de la misma puede producir una falta de las reservas necesarias para completar su muda a Mysis (FAO, 2004).

Lightner en 1985 menciona que la “enfermedad de las branquias” o fouling disease, es ocasionada por bacterias filamentosas, diatomeas o ciliados peritrichidos. Entre los más frecuentes y comúnmente reportados como causa de fouling a *Zoothamnium*, *Epistylis* y *Lagenophrys*, señalándolos como causa de problemas en la locomoción, alimentación, respiración y muda. A esto se suman las bacterias *Leucothrix* sp. y *Thiothrix* sp. encontradas en un estudio colombiano como agentes causales de fouling, reportándolas como bacterias

epicomensales encontradas en branquias, apéndices, superficie corporal y causantes de muerte en larvas y postlarvas por hipoxia, según Newmark y Vallejo en 1995.

En 2006, Hsien-Tsang y Aguillón mencionan que en el estadio de Zoea I, un hilo fecal que llega a ser 6 veces más largo que la longitud de las larvas, es indicio a que son organismos fuertes.

En un estudio hecho por Alfonso et al en 1996, demostraron que la sobrevivencia de *P. schmitti* al llegar a Postlarva fue significativa al emplear productos comerciales probióticos empleados normalmente en *P. vannamei*, inclusive existe la posibilidad de utilizarse como tratamiento preventivo a enfermedades que sufren las larvas en los primeros estadios, como la del síndrome de descamación del epitelio del tracto digestivo que se manifiesta en Protozoa II.

A pesar de la baja sobrevivencia en todas las pilas, las del tratamiento probiótico resistieron un 12% más los acontecimientos ocurridos durante la investigación, demostrando lo mencionado por Aguirre y Ascencio en 2003, que el empleo de probióticos como alternativa, puede aumentar la sobrevivencia y mejorar el crecimiento de las larvas juveniles y adultas. (figura 20). De igual manera, el porcentaje de sobrevivencia logrado en el experimento es bastante aceptable y comparable a los resultados obtenidos por Reyes et al en 2008, pues uno de sus tratamientos donde se utilizaba la cepa de *Lactobacillus casei*, logró una sobrevivencia del 36.13%, mayor al otro tratamiento donde se utilizó *Saccharomices cerevisiae* que logró un 24.71% de sobrevivencia. Mientras que el testigo utilizado solo obtuvo un 22.54% de sobrevivencia.

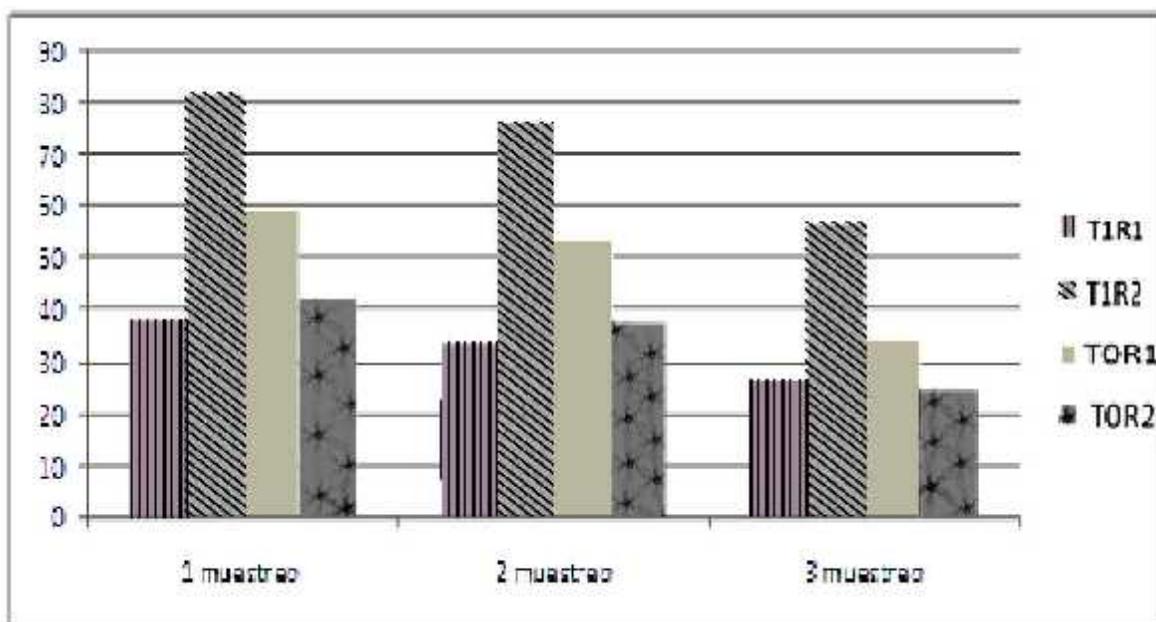


figura 20. Muestreros de sobrevivencia por tratamientos.

4.2 Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros físicos más importantes que debe mantenerse en el medio acuático donde se desarrolla el camarón marino, pues al ser un animal de sangre fría, existe una mayor dependencia de estos a la temperatura del ambiente, ya que una variación en la temperatura repercute en sus procesos metabólicos y de reproducción, según menciona Castelló en 1993.

Se agruparon los datos obtenidos en dos grupos de 8 días cada uno: primera semana y segunda semana. De los 32 datos obtenidos por tratamiento al final del experimento, se compararon entre ambos tratamientos para saber si hubo alguna variación. Del pareo de los datos de T_1 con T_0 , resultaron 12 pruebas de T donde se comparan T_1R_1 , T_1R_2 , T_0R_1 y T_0R_2 entre sí (Cuadro A-7). Estadísticamente los tratamientos manifestaron efectos diferentes ($P < 0.05$), reportándose las menores temperaturas en el tratamiento probiótico, y las mayores en el tratamiento control.

Sin embargo, en T_1R_1 comparado con T_0R_2 en la primera semana y T_1R_1 contra T_1R_2 de la segunda semana, se observó variación, debido probablemente a que el calentador mantenido en T_1R_1 presentó desperfectos de funcionamiento, manifestando una diferencia de temperatura aproximadamente de 1°C .

En T_1R_2 contra T_0R_2 , se observó variación de temperatura probablemente a una estratificación termal de las pilas, esto se da por que el calor penetra por la superficie del agua y calienta la capa superficial más rápido que la del fondo. Como la densidad del agua (peso por unidad de volumen) disminuye conforme aumenta su temperatura sobre los 4°C , la capa superficial puede ser tan caliente y ligera que no se mezcla con la más fría del fondo. Esta separación de las capas del agua produce la estratificación termal. La estratificación tiene a menudo un patrón diario: durante el día la temperatura del agua aumenta y se forma una capa cálida, durante la noche la temperatura de la capa superficial disminuye a la misma que la del agua del fondo, por lo que las capas se mezclan.

Existen leves variaciones en las comparaciones de T_1 y T_0 , pero estas no afectaron el desarrollo larval del camarón pues se mantiene dentro de los rangos normales, tal como sostiene Brock y Main, 1994 quienes confirman que los intervalos óptimos para la cría de camarón oscilan entre 23°C a 30°C , pero en 2004, FAO hace un énfasis que la temperatura para larvicultura debe ser mantenida entre 28°C y 32°C . En el cuadro 4 se muestran los promedios de temperatura registrados en la investigación.

La pila con mayor temperatura promedio en el experimento fue T_0R_1 con 31°C mientras que la pila que se mantuvo con una temperatura menor fue T_1R_1 con 29.4°C de promedio. (Cuadro 11).

Cuadro 11. Promedio de temperatura en ambos tratamientos durante el experimento

TRATAMIENTO	T° PRIMERA SEMANA	T° SEGUNDA SEMANA	T° PROMEDIO DURANTE TODO EL EXPERIMENTO
T_1R_1	29.9°C	29°C	29.4°C
T_1R_2	30.5°C	29.8°C	30.2°C
T_0R_1	31°C	31°C	31°C
T_0R_2	30°C	30.4°C	30.2°C

La temperatura promedio durante todo el experimento de T_1 fue de $29.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en T_0 de $30.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 21).

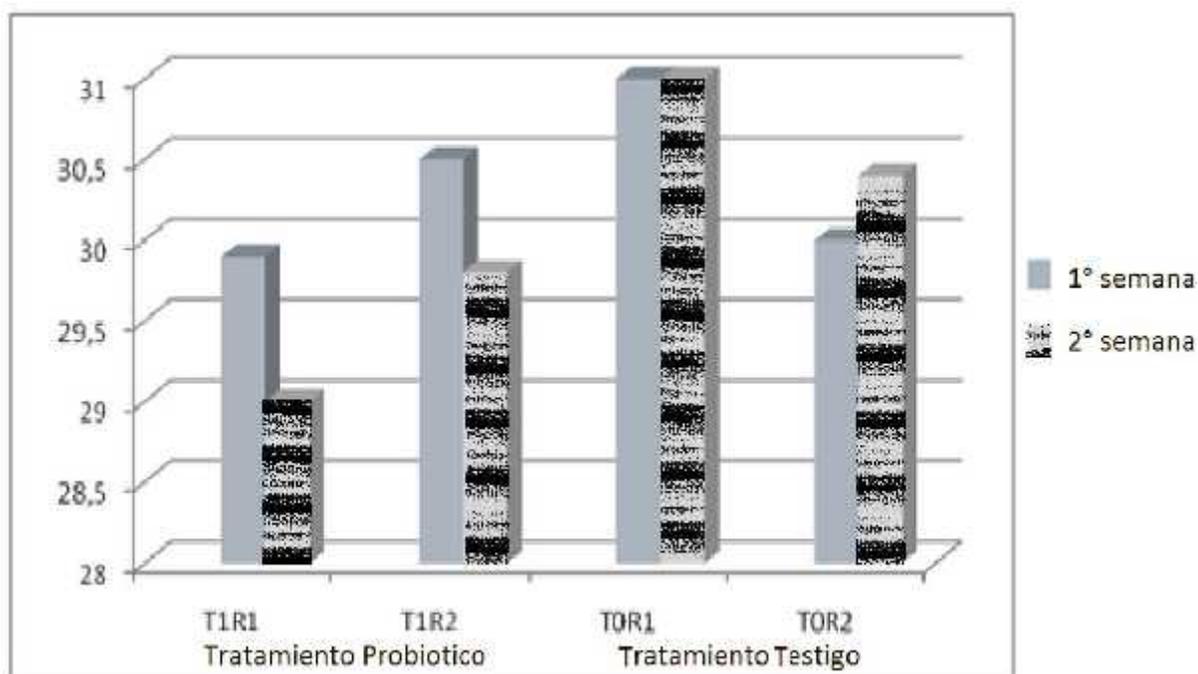


figura 21. Muestras de temperatura para los tratamientos en estudio, realizados durante la investigación.

4.3 Salinidad

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, es la especie de camarón preferidos en la acuicultura por su notable capacidad para crecer con eficacia y sobrevivir a salinidades altas o bajas. La alta tolerancia de *L. vannamei* a diversas salinidades hacen que esta especie sea un excelente candidato para cultivarlo en diversos países del mundo (Lucas, A., 2009).

Por lo general cada etapa del desarrollo tiene un rango óptimo de salinidad para su normal desarrollo; así, las larvas se desarrollan a salinidades entre 28 y 35 ‰ mientras que las postlarvas tienen una tolerancia más amplia a los cambios de estas variables, así por ejemplo postlarvas de camarones del golfo de México pueden tolerar amplias fluctuaciones de salinidad y temperatura, según Zein-Eldin en 1969.

De igual forma que con la temperatura, se obtuvieron 32 datos por tratamiento. Se hicieron dos grupos correspondientes a la primera semana y segunda semana, y se parearon todos los datos entre T₁R₁, T₁R₂, T₀R₁ y T₀R₂ obteniendo 12 pareos. (Cuadro A-8).

Estadísticamente la salinidad en los tratamientos en estudio produjeron efectos iguales, es decir que las salinidades se comportaron de igual manera para T₁ y T₀, exceptuando las comparaciones de la T₁R₁ contra T₀R₂, T₁R₂ contra T₀R₁ y T₁R₂ contra T₀R₂ medidas en la primera semana del experimento producto de un cambio momentáneo en la salinidad del mar. Sin embargo el rango de salinidad estaba dentro de los parámetros por lo que no se percibió ningún problema.

Durante el experimento se hizo variar la salinidad del medio acuático de 1-2 ups en dos momentos: Mysis II-III, en ambos tratamientos, y Postlarva 5 únicamente en T₁.

Se añadió ½ tonelada agua dulce tratada a cada pila para promover la muda de las larvas, ya que en estos estadíos la actividad de las larvas se había vuelto lenta y el tiempo de muda se había prolongado, posiblemente a los acontecimientos ya descritos anteriormente en la variable de sobrevivencia.

La pila que presento menos salinidad fue T₁R₁ de tratamiento probiotico con una salinidad media de 33 ups mientras que la de mayor salinidad fue T₀R₂ con una salinidad promedio de 34 ups (figura 22).

Las salinidades en el experimento se mantuvieron entre 32.9 y 34 ups, cumpliendo con los rangos establecidos por FAO en 2004 que establece que la salinidad debe de mantenerse mayor a 30 ups en larvicultura, así pueden obtenerse Postlarvas de buena calidad (Cuadro 12).

Cuadro 12. Promedio de salinidad en ambos tratamientos

TRATAMIENTO	T° PRIMERA SEMANA	T° SEGUNDA SEMANA	PROMEDIO DURANTE TODO EL EXPERIMENTO
T ₁ R ₁	33.3ups	33.8ups	33.5ups
T ₁ R ₂	32.9ups	33.1ups	33ups
T ₀ R ₁	34.4ups	34ups	34.3ups
T ₀ R ₂	34.8ups	34.1ups	34ups

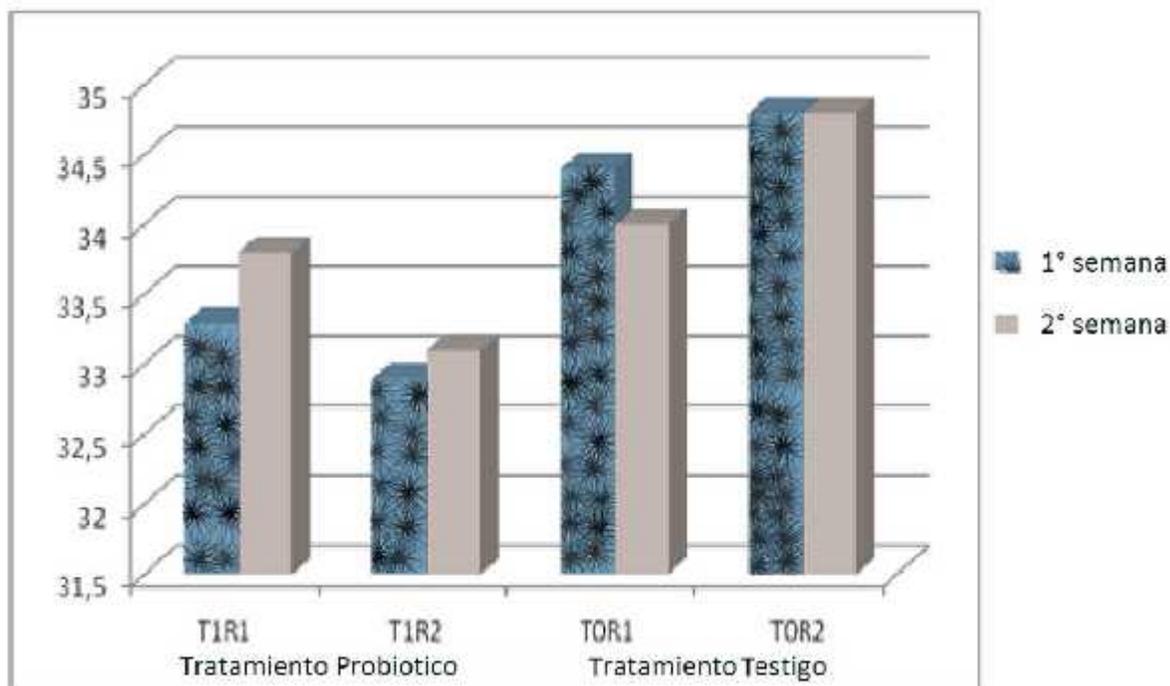


figura 22. Muestreos de salinidad para los tratamientos en estudio, realizados durante la investigación.

4.4 Análisis microbiológico

4.4.1 Agua

Se realizó una prueba microbiológica del agua de cada una de las pilas al final del experimento para saber si existía presencia de *Vibrio* sp., *Salmonella* sp., *E. coli* y *Clostridium* sp., bacterias que pueden afectar a la larva durante su desarrollo.

Según FAO en 2004, en el análisis del agua debe haber ausencia de patógenos y no debe existir luminiscencia. Mientras que en las especificaciones establecidas en la Norma Salvadoreña Obligatoria 2009, menciona que el recuento total de mesófilos aerobios en el análisis del agua, el rango permitido es <1.1 NMP/100ml tal como se muestra en el cuadro 13.

Cuadro 13. Determinación de bacterias en el agua de los tratamientos

Tratamiento	DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIONES	RESULTADO
T1R1	Bacterias coliformes totales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Bacterias coliformes fecales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	<i>Escherichia coli</i>	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Recuento total de mesófilos aerobios	100 UFC/ml	270 UFC/ml
	Bacterias patógenas	Ausencia	Ausencia de Vibrio Sp.
T1R2	Bacterias coliformes totales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Bacterias coliformes fecales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	<i>Escherichia coli</i>	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Recuento total de mesófilos aerobios	100 UFC/ml	340 UFC/ml
	Bacterias patógenas	Ausencia	Ausencia de Vibrio Sp.
T0R1	Bacterias coliformes totales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Bacterias coliformes fecales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	<i>Escherichia coli</i>	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Recuento total de mesófilos aerobios	100 UFC/ml	DNPC
	Bacterias patógenas	Ausencia	Ausencia de Vibrio Sp.
T0R2	Bacterias coliformes totales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Bacterias coliformes fecales	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	<i>Escherichia coli</i>	<1.1 NMP/100ml	<1.1 NMP/100ml
	Recuento total de mesofilos aerobios	100 UFC/ml	270 UFC/ml
	Bacterias patógenas	Ausencia	Ausencia de Vibrio Sp.

Tomando en cuenta los siguientes datos durante el experimento tanto en las pilas de tratamiento probiótico como en las pilas de tratamiento testigo se detectó ausencia de *Vibrio sp.*, consecuentemente se observó ausencia de luminiscencia al realizar las observaciones de nivel 1 estipuladas por la FAO en 2004.

Una de las bacterias encontradas en el análisis fue *Escherichia coli* tanto en el tratamiento probiótico como en las testigo, sin embargo en ambos casos no presentó amenaza pues se encontraba dentro del rango permitido que es <1.1 NMP/100ml.

Al analizar el recuento total de mesófilos aerobios según el recuento de bacterias heterótrofas del control ambiental, en las pilas con tratamiento probiótico se encontraron un promedio de 340 UFC/ 100ml mientras que en el tratamiento testigo el resultado promedio fue demasiado numeroso para contarse (DNPC).

Esto demuestra la Exclusión competitiva como mecanismo de acción de los probióticos ya que al proporcionar un microorganismo benéfico (probiótico) al medio donde se encuentran las larvas, juveniles o adultos se ve disminuida la proporción de bacterias patógenas que pueden presentarse, sin mencionar además la capacidad que poseen los probióticos para competir por espacio de crecimiento en el medio y en las superficies sólidas del cultivo. Este punto ha sido considerado de gran importancia según Fuller, 1989; Wang *et al.* y Gatesoupe, 1999, pues sostienen que ésta sustitución se lograría por la producción de compuestos antibacteriales, competición por nutrientes o por sitios de adhesión.

Cabe mencionar que la cuantificación de este grupo microbiano permite estimar de forma general la carga microbiana presente en una muestra, si bien no aporta datos concretos sobre el tipo de especies predominantes, su conocimiento siempre es interesante, ya que su valor es reflejo de la calidad sanitaria. Sin embargo, según la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería en 2010, sostiene que los datos derivados del recuento de la microbiota aerobia mesófila no deben ser considerados como parámetros absolutos en cuanto a su valor indicador, ya que un resultado elevado no ha de ir necesariamente unido a la presencia de microorganismos patógenos o toxinas ni, por el contrario, un bajo recuento en el número de colonias de estas características se relaciona siempre con la ausencia de microbiota patógena. Por tanto, y considerando las reservas anteriormente comentadas, es necesario siempre determinar la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos y extraer las conclusiones adecuadas de dicha información, sin que ello signifique obviar otros análisis de mayor especificidad y valía.

4.4.2 Hisopado

Según Garriques y Arévalo en 1995, mencionan la existencia de teorías que explican el papel de los probióticos en los sistemas acuícolas cuando cepas seleccionadas de bacterias

beneficiosas son inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura, entre las cuales el mecanismo de acción de exclusión competitiva, en el presente experimento tuvo mayor relevancia. Ya que al agregar un microorganismo benéfico al medio acuático donde se encuentran las larvas se ve disminuida la proporción de bacterias patógenas que pueden presentarse, además la capacidad que poseen los probióticos para competir por espacio de crecimiento en el medio y en las superficies solidas del cultivo (Fuller, 1989; Wang *et al.* y Gatesoupe, 1999).

En el análisis bacteriológico de las paredes y el fondo del recinto para determinar la cantidad de bacterias patógenas presentes, se solicitó al Laboratorio de la División Vegetal y Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería, el aislamiento de las bacterias *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium sp.* y *Vibrio sp.*, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 14. Resultados del análisis de hisopados.

TRATAMIENTOS	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Clostridium sp.</i>	<i>Vibrio sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Rango de presencia</i>
T1R1	Negativo	Negativo	Negativo	se aisló	Dentro de lo normal
T1R2	Negativo	Negativo	Negativo	se aisló	Dentro de lo normal
T0R1	Negativo	Negativo	Negativo	se aisló	Dentro de lo normal
T0R2	Negativo	Negativo	Negativo	se aisló	Dentro de lo normal

Como podemos observar en la tabla anterior, la única bacteria que se aisló fue *E. coli*.

La presencia de *E. coli* en el hisopado pudo deberse a factores tanto de manejo como de la flora normal del camarón marino. La bacteria *E. coli* es una bacteria común del tracto digestivo del hombre y de animales de sangre caliente. La mayoría de cepas que se encuentra en el intestino pueden causar daño al incrementarse los niveles normales de la población que forma parte de la flora intestinal. De la misma manera, la calidad del agua es esencial, no solamente para cubrir los requerimientos físicos y químicos de la especie de camarón que se va a cultivar, sino también para asegurarse de que no hay contaminación del agua, esta puede aislar bacterias debido a un inadecuado tratamiento de aguas o a la mala manipulación de la misma (Chávez M.; Higuera I., 2003).

Sin embargo en el análisis la presencia de *E. coli* se mantuvo dentro de los rangos normales <1.1 NMP.

4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las enfermedades solicitadas para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa fueron Virus de la Cabeza Amarilla (YHV), Virus de Taura (TSV), Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa (IHHNV) y Virus de Mancha Blanca (WSSV) para ambos tratamientos.

Para este experimento se tenía planificado realizar 3 análisis de PCR coincidiendo con las fechas de los conteos de sobrevivencia, sin embargo sólo se realizó un análisis al final de la investigación para tres de las enfermedades planteadas: YHV, IHHNV y TSV, debido a la falta de disponibilidad de materiales (kit para WSSV) en el laboratorio del Ministerio de Agricultura y Ganadería, responsable de dichas pruebas.

En uno de los resultados se observa la presencia positiva de IHHNV en T1R2 (tratada con probiótico), como puede verse en el cuadro 15. Las posibles razones por las que se obtuvo este resultado son variadas, entre estas un manejo inadecuado de las hembras grávidas, que según Lightner, 1996 sostiene que los tejidos exudados durante el desove de hembras hacinadas y sus heces, pueden contener altos niveles de virus (IHHNV, Enfermedad de parvovirus hepatopancreática (HVP), Enfermedad de baculovirus penaei (BP), Baculovirus tipo *P. monodon* (MBV), etc.) e infectar hembras sanas. Cabe mencionar que estas hembras grávidas durante el desove, por falta de recursos en el laboratorio, se manejaban en grupos de hasta cuatro reproductoras por barril de 150 Lts de agua, considerándose una cantidad inadecuada, siendo el mismo Lightner quien menciona, deberían ser de 300 Lts de agua por hembra.

Otra de las causas de enfermedad pudo ser la contaminación del alimento vivo para reproductores por medio de los utensilios empleados para alimentar, por lo que Lightner en 1996 sostiene que todo el equipo utilizado para alimentación de reproductores debe estar en condiciones asépticas antes, durante y después de su manipulación. Además el alimento fresco

brindado a los reproductores debe estar certificado libre de las enfermedades víricas TSV, WSSV y YHV mediante técnicas especializadas de laboratorio para no ser un riesgo en la bioseguridad del lugar. No obstante, en la Estación no se cuenta con una infraestructura adecuada para la preparación del alimento, además la higiene no es apropiada pues no se utilizan soluciones adecuadas para la desinfección de cuchillos, redes, recipientes, etc.

Un inadecuado diseño de la infraestructura del área de reproductores podría haber desencadenado también una contaminación, debido a que en la Estación no existe un aislamiento definido entre el área de maduración y de levantamiento larvario, además algunos equipos como bombas sumergibles y otros materiales como mangueras son compartidos entre ambas salas. Según FAO, 2004, menciona que trabajadores del laboratorio deben permanecer en sus áreas específicas de trabajo y no autorizar su libre tránsito a otras áreas no asignadas, además todos los materiales y equipos deben ser de uso exclusivo para cada sala, y no salir de ella o ser usados en otro lugar.

Así también según Microbial, 2009, no se deben descartar los errores humanos a la hora de la toma de muestra e incluso a la hora de la realización del PCR produciendo un “falso positivo” por las siguientes razones:

4.5.1 Debido a la muestra

Una situación que puede dar lugar a un resultado falso positivo es la presencia en la muestra de ADN libre o de células muertas o irreversiblemente dañadas, ya que la PCR no es capaz de distinguirlo de las células vivas. El crecimiento exponencial de estas bacterias y los límites de detección de los métodos basados en PCR hacen que los resultados falsos positivos debido a células muertas en la muestra sean mínimos y se den únicamente en aquellos casos en que el contenido de ADN libre o de células muertas en la muestra sea muy elevado.

4.5.2 Falsos positivos debidos al sistema de detección de PCR (primers y sondas)

Las causas de estos falsos positivos hay que buscarlas en primers y sondas pobremente diseñados que no ofrecen la exclusividad que deberían. Como consecuencia se obtienen reacciones cruzadas que aparecen como positivas en las curvas de fluorescencia o en los “final call” y que no son otra cosa que reacciones “de baja eficiencia” debidas al fallo de uno o más nucleótidos.

Cuadro 15. Resultados del análisis de PCR en las pilas de tratamiento

TRATAMIENTO	IHHNV	YHV	TSV
T1R1	Negativo	Negativo	Negativo
T1R2	Positivo	Negativo	Negativo
T0R1	Negativo	Negativo	Negativo

4.6 ANÁLISIS ECONÓMICO

Toda investigación debe acompañarse de un análisis económico que nos permite considerar la mejor tecnología en base a sus costos y beneficios netos. Para la investigación el análisis presentó los siguientes resultados (Anexo 3):

Cuadro 16. Análisis de presupuesto parcial*.

<i>ITEM</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>
RENDIMIENTO MEDIO (cantidad de larvas)	540,000	756,000
RENDIMIENTO AJUSTADO (10%, cantidad de larvas)	486,000	680,400
Beneficio Bruto**	\$1944	\$2721.6
COSTOS VARIABLES		
Flake	\$1.74	\$1.74
Calamar	\$0.50	\$0.50
BP	\$4.33	\$4.33
Espirulina	\$1.37	\$1.37
Artemia	\$6.00	\$6.00
Probiotico	\$0.00	\$28.38
Nauplio***	\$900	\$900
Costo total	\$913.94	\$942.32
Beneficio Neto	\$1,030.06	\$1779.28

*: Con precios establecidos para El Salvador, abril 2012.

** : Precio de larva para venta \$0.004 por CENDEPESCA y la Estación.

***: Precio unitario de nauplio \$0.0005, brindado por la Estación de Maricultura de Los Cóbanos.

Como se observa en el cuadro 19 del presupuesto parcial, las larvas de T₁ claramente presenta un mayor beneficio neto el cual, logra superar al testigo por una diferencia de \$749.22, mostrando que el ingreso puede ser mayor al emplear probióticos en el ciclo larvario. Esto confirma lo dicho por Alabi (2000), los probióticos son una herramienta que soluciona las grandes tasas de mortalidad en los primeros estadios del desarrollo larvario de crustáceos, por causa de bacterias oportunistas.

5. CONCLUSIONES

- El uso de probióticos durante el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei* tiende a prescindir de la aplicación de químicos empleados para la prevención y tratamiento de enfermedades del camarón marino, como yodo o formalina, haciendo de estos una alternativa amigable al medio ambiente y al consumidor final, contribuyendo a garantizar la inocuidad de este alimento.
- Los resultados alcanzados en el análisis de la sobrevivencia larval permiten afirmar que el tratamiento con probiótico alcanzó una sobrevivencia del 42%, contra un 30% de sobrevivencia del tratamiento testigo.
- Los parámetros temperatura y salinidad en ambos tratamientos no presentaron significancia estadística, manteniéndose dentro de los rangos normales, descartando ambas como posibles intermediarios en la sobrevivencia larval.
- Los análisis microbiológicos de los tratamientos en estudio muestran la ausencia de patógenos recurrentes en camaricultura durante el levantamiento larvario, esto concuerda con las pruebas hechas a las larvas al final del ciclo, descartando agentes patógenos como causa de baja sobrevivencia.
- El análisis de Reacción de la Cadena de Polimerasa mostró ser positivo a la enfermedad de Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, lo que indica la presencia del virus únicamente en una de las repeticiones del tratamiento probiótico.
- En la evaluación económica el beneficio neto del tratamiento probiótico superó en \$749.22 al tratamiento testigo, ya que se obtuvo de beneficio neto \$1,030.06 y \$1,779.28 en el tratamiento testigo y con probiótico respectivamente. Por lo tanto se considera que en el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei* puede reducir los costos de producción al prescindir de sustancias químicas como formalina para tratamiento de enfermedades.

6. RECOMENDACIONES

- Aplicar probióticos en el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei*, ya que promueven su desarrollo en condiciones saludables disminuyendo los costos de producción de esta etapa al reducir la utilización de otros tratamientos de elevados costos.
- Continuar investigando el uso de probióticos en camaricultura para generar más información en el país, evaluando su comportamiento en estanques de engorde de camarón y con diferentes tipos de probióticos.
- Para evitar contaminación iatrogénica se recomienda que las instalaciones de maduración se encuentren separadas del laboratorio de levantamiento larvario e implementar un área de cuarentena adecuada para los reproductores, evitando posibles infecciones y contagios.
- Poner en práctica los estándares de higiene al momento de preparar el alimento fresco de los reproductores, manteniendo en su debido orden e higiene todo el material utilizado para no contaminar con patógenos el área de maduración.
- Es aconsejable que las hembras grávidas cuenten con un lugar aislado del área de maduración para el desove, evitando ambientes de estrés en los reproductores.
- Es necesario que cada zona del laboratorio donde se crían las larvas y reproductores, de igual manera para cada una de las pilas cuente con equipo de uso exclusivo para evitar contaminación cruzada.
- Para reducir la contaminación, se sugiere individualiza el personal que labora en cada área del laboratorio.
- Para evitar infecciones víricas de los nauplios, es necesario seguir el manejo adecuado de las hembras grávidas para la desova y, hacer muestreos regulares de los reproductores para establecer la presencia o no de estas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aguirre, G.; F. Ascencio.** 2003. Probióticos, herramienta alternativa para los acuicultores. Enfoque acuícola 2(5) MX. Pág. 48
2. **Alabi, A. O.** 2000. “The use of probiotics techniques for controlling bacterial diseases in marine invertebrates hatcheries”. Journal of Shellfish Research, p. 65-100
3. **Alfonso, E.; Beltrame, E.; Andreatta, E. R.; Lemos, A.; Quaresma, J.** 1996. Uso de bacterias beneficiosas en la larvicultura del camarón *Penaeus schmitti*. [Cuba] [citado 29 de junio del 2012] [en línea] disponible en: <http://www.alken-murray.com/shrimp6s.htm>
4. **Anger, K.; Dawris R.R.** 1981, Influence of starvation on the larval development of *Hyas araneus* (Decapoda). Helgolander Heeresuntersuchungen 34:287-311.
5. **Anger, K.** 2001. The biology of crustacean. En Vronk, R (ed). Crustacean issues, 14. AA Balkena Publishers, Amsterdam, 407 pp.
6. **Arias, A. M.; de la Torre M.; Fijo, M. I.** 2005. ICTIO.TERM. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Cádiz y Huelva 2010. [citado 20 de mayo del 2011] Disponible en World Wide Web: http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=235
7. **Austin, B.; Stuckey, L.F.; Robertson, P.A.; Effendi, I.** 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Journal of Fish Diseases, 18: 93-96.
8. **Baticados, M.C.L.; Lavilla-Pitogo, C.R.; Cruz-Lacierda, E.R.; Pena, L.D.; Sunaz, N.A.** 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Diseases of Aquatic Organisms, 9 (2): 133-139.

9. **Bachère, E.; Guegen, Y.; González, M.; De Lorgeril, J.; Gamier, J.; Romestand, B.** 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198: 149-168.
10. **Balcázar, J.L.** 2006. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>): 877-881.
11. **Bray L.; Fast L,** 1992. Effect of transport, reception, acclimation and sowing of nauplii *Litopenaeus vannamei* upon larvae culture survival. INVERMAR [en línea] boletín informativo n°30 [citado 15 junio del 2012] disponible en: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/quincenal/bquinc143.pdf>
12. **Brock, J.A.; Main, K.L.** 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. 241 p.
13. **Cantón-Machín, M; Delgado-Miranda, G; Hernández-Farriñas, T.** 2010. REDVET. Disponibilidad alimentaria del camarón Rosado (*Farfantepenaeus notialis*), en zonas de cría del golfo de Ana María, Sureste de Cuba. 11(7) p. 4 [en línea]. Junio 2007. [Cuba 2007]. [Citado 17 de agosto del 2012] Disponible en world wide web: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070710/071001.pdf>
14. **Castelló Orvay, F.** 1993. Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción. [citado 20 de junio del 2012] Barcelona, España. P. 600-601 [en línea] disponible en:http://books.google.com/sv/books?id=hjwMNMgh1cQC&lpg=PA599&ots=3lePnfHD_K&dq=calidad%20de%20agua%20en%20acuicultura&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=true
15. **Castro, G.; J. Castro; T. Castro; A. Estrada; V. García.** 2005. Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. Ecuador. Pág. 39- 57

16. **Chávez-Sánchez M.C.; I. Higuera-Ciapara.** 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) [Por encargo de SENASICA], A.C. México. pp. 30-31.
17. **CIMMYT.** 1988. Formulación de recomendaciones a partir de datos Agronómicos: Manual Metodológico de Evaluación Económica. México, D.F. P 13-25.
18. **Cuéllar-Anjel, J.** 2002. Técnicas para el diagnóstico de enfermedades en camarones. Libro de resúmenes del 4to Congreso Panameño de Medicina Veterinaria. Los Santos, República de Panamá
19. **CYTED.** 2009. Área de Agroalimentación RED II-D: Red Vannamei. Guía Técnica – Patología e Inmunología de camarones Penaeidos. [citado 3 de mayo del 2011] Panamá [en línea] Disponible en World Wide Web: http://www.aquafeed.com/documents/1307935450_1.pdf
20. **Direkbusarakom, S.; Yoshimizu, M.; Ezura, Y.; Ruangpan, L.; Danayadol, Y.** 1997. *Vibrio* spp. the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogens viruses. Journal Marine Biotechnology, 6: 266-267.
21. **Escuela Politécnica Superior Universidad de Almería (UAL).** 2010. Cuaderno de prácticas de microbiología de productos, España. P. 18
22. **Europa Press.** 2010. “Los probióticos benefician al sistema inmune y defiende al organismo de una "amplia variedad" de patógenos” España (en línea) enero 2010 (citado 18 julio del 2011) disponible en <http://www.hoysalud.es/articulo.php?id=1284>

23. **Famularo, G.; Moretti, S.; Marcellini, S.; De Simone, C.** 1997. Stimulation of immunity by probiotics. In: Fuller, R. (ed.) Probiotics 2. Applications and practical aspects. Chapman & Hall, Chapter 6,137-161.
24. **FAO.** 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. [En línea] [citado 10 de junio del 2010]. Disponible en World Wide Web: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>
25. **FAO.** 2002. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Parte 2 Temas de interés para los pescadores y acuicultores. [en línea] [citado 20 de agosto del 2012] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y7300s/y7300s00.htm#TopOfPage>
26. **FAO, Servicio de Recursos de Aguas Continentales y Acuicultura.** 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. [en línea]. Roma [citado 26 de abril del 2011]. Disponible en ASCII: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5040s/y5040s00.pdf>
27. **FDA.** 2002. Animal & Veterinay: Reminder—Extra-Label Use Of Fluoroquinolones Prohibited [citado 20 de agosto del 2012] United States [en línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm129354.htm>
28. **FDA.** 2008. Enhanced Aquaculture and Seafood Inspection - Report to Congress. [citado 24 de octubre del 2011] United States [en línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/SeafoodRegulatoryProgram/ucm150954.htm>
29. **Feedmix.** 2007. Agri & Horti world, Probiotics gain more interest. 15(1): 18 [en línea]. Septiembre 2007. [Netherlands, Europa 2007]. [Citado 25 de junio del 2011] Disponible en world wide web: <http://agriworld.blueskies-is.nl/feedmix/coverstories.asp>

30. **Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. AFRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
31. **Garriques, D.; Arevalo, G.** 1995. An Evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: BROWDY C.L. & HOPKINS, J.S. (eds.) *Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 53-59.
32. **Gatesoupe, F.J.** 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
33. **Gaxiola C. G.** 2003. Nutrición de Camarones Peneidos (Aspectos Morfológicos y Bioquímicos). I Jornada Iberoamericana de nutrición en acuicultura. Cartagena de Indias, Colombia.
34. **Gomez-Gill, B.; Roque, A.** 1998a. Selection of Probiotic Bacteria for Use In Aquaculture. In: FLEGEL, T.W. (ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology, Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum* Chiangmai, Thailand, Sección Probiotics and Immunostimulants, p 174.
35. **Gomez-Gill, B.; Tron-Mayén, L.; Roque, A.; Turnbull, J.F.; Inglis, V.; Guerra-Flores, A.L.** 1998b. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 163: 1-9.
36. **Gómez-Gil, B.; Roque, A.; Turnbull, J. F.** 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 2000. P. 259-270.

37. **Gómez-Gill. B.; Roque. A.; Guerra-Flores. A.** 2001. Enfermedades Infecciosas mas Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos en: Camaronicultura y Medio Ambiente. [citado en 10 de junio del 2012] Mazatlán, Sinaloa, México. [en línea] disponible en: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Camaron/Enfermedades%20infecciosas%20mas%20comunes%20en%20la%20camaronicultura%20en%20Mexico%20y%20el%20im pacto%20del%20uso%20de%20antimicrobianos.pdf>
38. **Griffith, D. R. W.** 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: LAVENS, P., JASPERS, E., ROELANTS, I. (eds.), Larvi' 95 – Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Vol. 24, Gent, Belgium, 478 p
39. **Gullian Klanian, M.** 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. [en línea]. Ecuador. 64 p. [citada 10 de julio 2011]. Presentada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral para obtención de grado de Magister en Ciencias Especialidad Acuicultura Marina. Disponible en World Wide Web: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/8682>
40. **Hansen, G.H.; J.A. Olafsen.** 1999. “Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish”. Microb. Ecol. 38(1): 1-26.
41. **Hendrickx, M.E.** 1995. Camarones. In: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E. y Niem, V.H. (Eds.). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Vol. I. Plantas e Invertebrados. F.A.O. Roma, Italia. p. 417-537.
42. **Hendrickx, M.E.** 2001. Cap. 2 Taxonomía, biología y zoogeografía de los peneidos de importancia comercial del Pacífico mexicano. Pp. 25-41. In: Páez-Osuna, F. (ed.). Camaronicultura y Medio Ambiente. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Programa Universitario de Alimentos, El Colegio de Sinaloa.. 519 p.

43. **Hsien-Tsang, Su; Aguilón, C. G.** 2006. Manual de Reproducción y cultivo de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*). CENDEPESCA/Taiwan ICDF. Los Cóbano, El Salvador. Pags. 5-6.
44. **ICTIO.TERM.** 2010. Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Cádiz y Huelva. [Citado 20 de mayo del 2011] [en línea] disponible en World Wide Web: http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=235
45. **Itami, T.; Kubono, K.; Asano, M.; Tokushige, K.; Takeno, N.; Nishimura, H.; Kondo, M.; Takahashi, Y.** 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
46. **Jahncke, M.L.; Browdy, C.L.; Schwarz, M.H.; Segars, A.; Silva, J.L.; Smith, D.C.; Stokes, A.D.** 2001. Preliminary application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) principles as a risk management tool to control exotic viruses at shrimp production and processing facilities. pp. 279–284. In C.L. Browdy and D.E. Jory. (eds.) *The New Wave: Proceedings of the Special Session on Sustai*
47. **Jones D. A.; Yule, A. B.; Holland D. L.** 1997. Larval Nutrition. In: L. R. D’Abramo, D. E. Concklin and D. M. Akiyama, editors. *Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture Vol 6*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. P.353-389
48. **Lambert, C.; O. Bergh; L. Torkildsen; T. Magnusen.** 1999. “Alternative to antibiotic treatment in scallop larval culture: Introduction y first results”. *Books of Abstracts: 12 International Pectinid Workshop*. 5-11 mayo 1999.
49. **Lavilla-Pitogo, C.R.** 1995. Bacterial diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In: Shariff, M., Arthur, J.R. y Subasinghe, R.P. (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture II*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philipines. p. 107-121.

50. **Le Vay, L.; Jones, D. A.; Puello-Cruz, A.; Sangha, R. S.; Ngamphoingsai, C.** 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128 (2001):623-630.
51. **Lightner, D.V.** 1983. Disease of culture penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (ed.), *Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture. Vol.1* CRC. Press. Boca Raton. FL., 289- 320.
52. **Lightner, D.V.** 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: McVey, J.P. (Ed.). *CRC Handbook of Mariculture. Volume I: Crustacean Aquaculture.* CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 393-486.
53. **Lightner, D. V.** 1996. *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases in penaeid shrimp.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, EE. UU.
54. **Lightner, D.V.; Redman, R.M.** 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201-220.
55. **Lightner, D.V.; R.M. Redman.** 1985. A Parvo-like Virus Disease of Penaeid Shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology.* 45,47-53.
56. **Lilly, D.M. and Stillwell, R.H.** 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* February: Vol Vol. 147 no. 3659 pp.747-748 (citado marzo del 2011) disponible en línea: <http://www.sciencemag.org/content/147/3659/747.short>.
57. **Loebmann, D; G. Mai, Ana C; Lee, James T.** 2010. The invasion of five alien species in the Delta do Parnaíba Environmental Protection Area, Northeastern Brazil [citado 20 de junio del 2011] Brasil [en línea] Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442010000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=en

58. **Lovett, D.; D. Felder D.** 1990. Ontogenic change in digestive enzyme of larval and postlarval the white shrimp *Penaeus setiferus* (Decapoda, Penaeidae) Biological Bulletin 178(2): 144-159.
59. **Lucas, A.** 2009. Requisitos para el cultivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, criados en aguas de baja salinidad: el agua modificación y estrategias nutricionales para mejorar la producción [en línea]. E.E.U.U [citado 26 de julio del 2012], disponible en <http://www.royluke@auburn.edu>.
60. **Macouzet.** 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. [citado 20 de junio del 2011] Brasil [en línea] Disponible en: <http://www.chil.com.ua/firms/danone/pdf/029.pdf>
61. **Maeda, M.; Liao, I. C.** 1992. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 21: 25-29.
62. **Mahious, A.S.; F. Ollevier.** 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: Review. 1st. Regional Workshop on techniques for enrichment on live food for used in larviculture. AAARC, Urmia, Irán. 3p.
63. **Microbial.** 2009. Los falsos positivos del PCR : ¿Solamente falsas alarmas?.Revista de estudios Newsletter Microbial, (5): 1-2.
64. **Mohney, L.L.; Lightner, D. V.; Bell, T. A.** 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Bonne (Crustacea:Decapoda). Journal of World Aquaculture Society, 25: 116-125.
65. **Montoya, N.** 2002. Residuos de antibióticos en camarones: límites residuales y detección de fenicoles. CENAIM Informa. [En línea]. Año 2002, n° 54. [citado 12 de agosto del 2011]. Disponible en Internet: <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/8513>

66. **Moriarty, D.J.** 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351-358. OMS. 2005. Manual de Bioseguridad en el laboratorio. [en línea]. Tercera edición. [citado 9 de mayo del 2011] Disponible en World Wide Web: <http://fcm.uncu.edu.ar/joomla/downloads/OMS.pdf>
67. **Newman, G.S.** 1996. Prevention of diseases in commercially reared shrimp with emphasis on the use of immunestimulants. In: Primer Congreso Latinoamericano de camaricultura y exhibición. Panamá.
68. **Newmark-Umbreit, F.; A. Vallejo-Isaza.** 1995. Estudio epizootiológico de *Penaeus vannamei* en tres fincas camaroneras del Caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar.*, 28: 19-41.
69. **Nimrat, S.; V. Vuthiphandchai.** 2011. In vitro evaluation of commercial probiotic products used for marine shrimp cultivation in Thailand. [en línea] Tailandia. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(22), pp. 4643-4650 [citado 28 de octubre del 2011] Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2011/30May/Nimrat%20and%20Vuthiphandchai.pdf>
70. **Nogami, K.; Maeda, M.** 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the Crab *Portunus trituber Culatus*. *Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences*, 49: 2373-2376.
71. **NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA NSO 13.07.01:08.** 2009. AGUA, AGUA POTABLE (Segunda actualización). [citado en 14 de junio del 2012] El Salvador [en línea] disponible en: http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/normas/NORMA_AGUA_POTABLE_2_a.pdf
72. **Pantoja, C. R; Lightner, D. V.** 2008. Capítulo 2 Enfermedades virales. pp. 55-114. En: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei. [citado 25 de mayo del

2011] Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.[en línea] Disponible en World Wide Web: http://www.aquafeed.com/documents/1307935450_1.pdf

73. **Pechenik, J. A.** 1999. On the advantages and disadvantage of larval stages in benthic biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171, 309-321.
74. **Polin, E.; Boletzky, S. V.; Feral, J. P.** 2001. Combined ecological factors permit classification of developmental patterns in benthic marine invertebrates: a discussion note. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257: 109-115.
75. **Ramírez, C.** 2005. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imun. Tese da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial obtenção do Título de Doutor em Processos Biotecnológicos. 153 p.
76. **Rengpipat, S.; Phianphak, W.; Menasveta, P.; Piyatiratitivorakul, S.** 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon*, survival and growth. *Aquaculture*, 167: 301-313.
77. **Rerngpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasaveta, P.** 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture*, 191: 271-288.
78. **Reyes Á., W. E.; Robles C., H.** 2008. Efecto de dos probióticos bioencapsulados en nauplios de *Artemia franciscana* en el mejoramiento del desarrollo larval del camarón de río *Cryphiops caementarius*, EN LABORATORIO [citado 18 de octubre del 2011] Trujillo, Perú [en línea] Disponible en: http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/publicacionez/TESIS_MAESTRIA_UNT.pdf

79. **San Miguel, L.** 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio in vivo de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
80. **Sánchez, D.; Zapata, M.** 2007. “Los probióticos en la acuicultura” revista de estudios Nicovita, Editorial Tumpis, Vol 7, 1º ed. 2007. P. 1-2.
81. **Simoës, N.** 1993. Water quality in the culture of crustacean larvae and postlarvae: effects of microbial environment and use of closed recirculation systems. Ph D. Thesis. University of Wales, Bangor, UK. 199pp.
82. **Skjermo, J.; Vadstein, O.** 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177: 333-343.
83. **Song, Y.L.; Hsieh, Y.T.** 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*. Vol.18 (3), 201-209.
84. **Sung, H.H.; Kou, G.H.; Song, Y.L.** 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) *Fish Pathology*, 29: 11-17.
85. **Sung, H.H.; Yang, Y.L.; Song, Y.L.** 1996. Enhancement of microbicidal activity in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. *J. Crustacean Biology*, 16: 278-284.
86. **Sung, H.H., Chang, H.H., Chang, J.C., Song, Y. L.** 1998. Phenoloxidase activity of haemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal Invertebrate Pathology*, 71(1), 26-33.

87. **Tanasomwang, V.; Nakai, T.; Nishimura, Y.; Muroga, K.** 1998. *Vibrio* - inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. *Fish Pathology*, 33(5), 459-466.
88. **Toledo S., B. W. A.; Duarte R., Pedro José.** 2007. Estudio de *Vibrio alginolyticus* como posible probiótico para control de vibrios patógenos en larvas de camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* en cultivo. San Salvador, El Salvador. P. 104
89. **Torkildsen, L.; O.B. Samuelsen; B.T. Lunestad; O. Bergh,** 1999. “Bacterial problems in cultivation of scallops larvae (*Pecten maximus L*) I: In vitro minimum, inhibitory concentrations of the four antibacterial agents in sea water”. Books of Abstracts: 12 International Pectinid Workshop. 5-11 mayo 1999.
90. **Vargas-Albores, F.; Hernández, L.J.; Gollas, G.T.; Montaña, P. K.; Jimenez, V.F.; Yepiz, P.G.** 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In: FLEGEL, T.W. (ed.) *Advances in shrimp biotechnology. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum* Chiangmai, Thailand, 161-166.
91. **Wang, X.H.; Li, H.R.; Feng, J.; Han, L.L.; Qi, Z.Z.; Li, J.; Li, Y.; Zhang, X.H.; Ji, W.S.; Xu, H.S.; Yang, X.S.; Ma, J.K.; Yu, X. Z., Sun, X.X. fide.** Sf. Feasibility Study on the Delivery of a Probiotic Flora to Penaeid Larvae and the Bacterial Flora in the Digestive Tract of Adult Shrimp. Ocean University of Qingdao, P.R. China.
92. **Wickins, J.F. and Lee, D.O.C.** 2002 *Crustacean Farming*. Blackwell Science, Oxford. [citado 18 de marzo del 2012] EEUU [en línea] Disponible en: http://biblioteca.uns.edu.pe/saladocentes/archivoz/publicacionez/TESIS_MAESTRIA_UNT.pdf
93. **Zherdmant, M.T.** 1996. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la

interacción in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

94. **Zein-Eldin, G.** 1969. Penaeid nutrition. Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, editado por G.D.

8. ANEXOS

Cuadro A-1. Métodos para la detección de los principales agentes virales en camarones penaeidos (CYTED, 2009).

Método	WSSV	IHHNV	BP	MBV	BMN	SMV	YHV*	TSV	IMNV	PvNV
Directa BF/ LM/ PH/ DF	++	-	+++	+++	++	-	++	+	-	-
Histopatología	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	++
Bioensayos	++	+	+	-	+	-	+	++	+	+
TEM / SEM	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
ELISA CON PAb / MAb	-	-	+	-	+	-	-	++	-	-
Sondas ADN/ DHB/ ISH	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+	+
PCR/ RT- PCR	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++

*Grupo YHV: La información sobre virus IMNV y PvNV, fue suministrada por el DR. Carlos Pantoja de la Universidad de Arizona, USA (2008).

Definiciones de aplicación de los métodos para cada virus

- = método desconocido o cuya aplicación no está publicada
- + = método cuya aplicación es desconocida o está publicada, pero no frecuentemente practicada o difícilmente disponible.
- ++ = método cuya aplicación provee suficiente exactitud de diagnóstico o sensibilidad en la detección de patógenos para la mayoría de las aplicaciones
- +++ = método que provee un alto grado de sensibilidad en la detección de patógenos

Abreviaturas para los métodos

BF = microscopía de luz de campo brillante para el análisis de improntas de tejidos, montajes húmedos o montajes enteros teñidos.

LM = microscopía de luz

PH = microscopía con contraste de fases

DF = microscopía de campo oscuro

Cuadro A-2. Esquema de hoja de registros usada en el ciclo larvario para los tratamientos en estudio.

DÍA							
ESTADIO							
PROBIÓTICO		<table border="1"> <tr> <td>HIPO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>HIPO</td> <td></td> </tr> </table>	HIPO		HIPO		
HIPO							
HIPO							
CONDICIÓN GENERAL DE LA LARVA							
OBSERVACIONES DEL NIVEL 1	FOTOTAXIS						
	HITO REAL						
OBSERVACIONES DEL NIVEL 1	ACTIVIDAD NATATORIA						
	LUMINISCENCIA						
	CONTENIDO INTESTINAL						
	HOMOGENEIDAD DEL ESTADIO						
	NECROSIS						
	DEFORMIDADES						
	ROULING						
TONELADAS DE AGUA EN LA PILA							
AGUA	CALIDAD	CIORO	AM				
		PM	AM				
	CAMBIO	SALINIDAD (ups)	AM	AM			
			PM	AM			
			TONELADAS	TONELADAS			
		ENTRA	AM	AM			
			PM	AM			
			TONELADAS	TONELADAS			
	ALGA	ENTRA	AM	AM			
			PM	AM			
			TONELADAS	TONELADAS			
		MIX (gr)	AM1	AM1			
AM2			AM2				
PM1			PM1				
ALIMENTO	ARTEMIA (gr)	AM	AM				
		PM	AM				
		CONCELADA	PM				
	ARTEMIA (gr)	AM	AM				
		PM	AM				
		VIVA	PM				
SOBREVIVENCIA (%)							
OBSERVACIONES							

Cuadro A-3 Tabla de T de Student.

TABLA A2. VALORES DE "T" DE STUDENT

Grados De Libertad	P = 0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01
1	0.158	0.325	0.510	0.727	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.142	0.289	0.445	0.617	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.137	0.277	0.424	0.584	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.134	0.277	0.414	0.569	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.132	0.267	0.408	0.559	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.131	0.265	0.404	0.553	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.130	0.263	0.402	0.549	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.130	0.262	0.399	0.546	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.129	0.261	0.398	0.543	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.129	0.260	0.397	0.542	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.129	0.260	0.396	0.540	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.128	0.259	0.395	0.539	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.128	0.259	0.394	0.538	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.128	0.258	0.393	0.537	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.128	0.258	0.393	0.536	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.128	0.258	0.392	0.535	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.128	0.257	0.392	0.534	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.127	0.257	0.392	0.534	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.127	0.257	0.391	0.533	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.127	0.257	0.391	0.533	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.127	0.257	0.391	0.532	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.127	0.256	0.390	0.532	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.127	0.256	0.390	0.532	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.127	0.256	0.390	0.531	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.127	0.256	0.389	0.531	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
σ	0.1256	0.2533	0.3853	0.5244	0.6744	0.8416	1.2815	1.2815	1.6448	1.9599	2.3263	2.5758

FUENTE : Diseño de Experimentos Aplicados de Pedro Reyes Castañeda. 1980.

Cuadro A-4. Porcentaje de recambios de agua hechos en el experimento.

	ESTADÍO	Toneladas de agua		PORCENTAJE TOTAL DE RECAMBIO
		Mañana	Tarde	
T1R1	Z1-2	4	-	40%
	Z2-3	2	-	2%
	Z3	7	4	110%
	Z3	6	-	60%
	Z3-M1	4	4	80%
	M1-2	6	6	120%
	M2	6	4	100%
	M3-PL 1	6	-	60%
	PL 2	6	-	60%
	PL 3	7	4	110%
	PL 4	7	-	70%
	PL 5	6	2	80%
T1R2	Z1-2	4	-	40%
	Z2-Z3	2	-	20%
	Z3	6	4	100%
	Z3	5.7	4	97.00%
	M1	4	4	80%
	M1-2	6	5	110%
	M2	6	4	100%
	M3-PL1	6	-	60%
	PL2	6	-	60%
	PL3	7	4	110%
	PL4	7	-	70%
	PL5	6	2	80%
T0R1	Z2	5	4.6	96.00%
	Z2	6	5.5	115%
	Z2-3	6	5.5	115%
	Z2-3	6	6	120%
	Z3-M1	4	3.5	75%
	Z3-M1	5	-	50%
	M1	6	6	120%
	M1-2	6	6	120%
	M2-3	6	6	120%
	M3-PL1	-	6	60%
	PL1	6	6	120%

T0R2	Z2	5	4.5	95%
	Z2	6	5.5	115%
	Z2-3	6	5.5	115%
	Z2-3	6	6	120%
	Z3-M1	4	4	80%
	Z3-M1	5	5	100%
	M1	6	6	120%
	M1-2	6	6	120%
	M2-3	6	6	120%
	M3-PL1	0	0	0%*
	PL1	6	6	120%

* No se realizó recambio porque se sifoneó la pila.

T0R1	Nauplio	10	Presente	Activa	Ausente	Lleno	Alto	Ausencia	Ausencia	Ausencia		
	N5-Z1											
	Z1											
	Z1-2											
	Z2											
	Z2								Intermedio	Alguna		
	Z2-3							Bajo				
	Z2-3			Intermedia								
	Z3-M1			Débil								Poco
	Z3-M1			Intermedia					Intermedio			
	M1								Alto			
	M1-2			Activa								
	M2-3											
	M3-PL1											
	PL1											
PL1-2												
T0R2	Nauplio	10	Presente	Activa	Ausente	Lleno	Alto	Ausencia	Ausencia	Ausencia		
	N5											
	Z1											
	Z1-2											
	Z2											
	Z2								Intermedio	Alguna		
	Z2-3											
	Z2-3											
	Z3-M1			Intermedia					Bajo			
	Z3-M1								Intermedio			
	M1								Alto			
	M1-2			Activa								
	M2-3											
	M3-PL1											
	PL1											
PL1-2												

1, 2, 7 y 9 Visto hasta Zoea

3 y 6 Visto en todos los estadios

4 y 5 Visto hasta Mysis

Cuadro A-6. Comparaciones de tratamientos para la variable sobrevivencia. (Estadío desde nauplio hasta postlarva 3)

COMPARACIONES	Tc	T. tabla	HIPOTESIS
SV1 de T ₁ y SV1 de T ₀	1.606	2.26	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₁ y SV2 de T ₀	2.67	2.22	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV 2 de T ₁ y SV2 de T ₀	2.58	2.262	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV1 de T ₁ y SV3 de T ₀	3.8	2.262	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV3 de T ₁ y SV3 de T ₀	2.7	2.262	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV2 de T ₁ y SV3 de T ₀	3.75	2.30	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV1 de T ₁ y SV2 de T ₁	0.0056	2.262	Acepta la Hipótesis Nula
SV2 de T ₁ y SV3 de T ₁	1.45	2.262	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₁ y SV3 de T ₁	1.46	2.22	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₀ y SV2 de T ₀	1.22	2.262	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₀ y SV3 de T ₀	2.77	2.30	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
SV2 de T ₀ y SV3 de T ₀	1.55	2.262	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₀ y SV2 de T ₁	-1.47	2.30	Acepta la Hipótesis Nula
SV1 de T ₀ y SV3 de T ₁	-0.12	2.262	Acepta la Hipótesis Nula
SV2 de T ₀ y SV3 de T ₁	-1.25	2.228	Acepta la Hipótesis Nula

EN DONDE:

SV1: primer muestreo de sobrevivencia

SV2: segundo muestreo de sobrevivencia

SV3: tercer muestreo de sobrevivencia

T₁: T₁R₁ y T₁R₂, con aplicación de probiótico.

T₀: T₀R₁ y T₀R₂, testigo.

Cuadro A-7. Comparaciones de tratamientos para la variable parámetro temperatura. (Estadio desde nauplio hasta postlarva 3)

COMPARACIONES	Tc	T. tabla	HIPOTESIS
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₁ de la primera semana	-4.0044	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₁ de la segunda semana	-3.246	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₂ de la primera semana	-0.482	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	-2.469	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₁ de la primera semana	-2.253	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₁ de la segunda semana	-4.921	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₂ de la primera semana	1.727	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	-1.25	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₁ R ₂ de la primera semana	-2.339	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₁ y T ₁ R ₂ de la segunda semana	-1.193	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₀ R ₁ y T ₀ R ₂ de la primera semana	3.382	2.145	<i>Acepta la Hipótesis Alterna</i>
T ₀ R ₁ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	1.944	2.145	Acepta la Hipótesis Nula

EN DONDE:

T₁R₁: Pila 1 aplicación de probiótico

T₁R₂: Pila 2 aplicación de probiótico

T₀: T₀R₁ y T₀R₂ testigo

Cuadro A-8. Comparaciones de tratamientos para la variable salinidad (Estadío desde nauplio hasta postlarva 3)

COMPARACIONES	Tc	T. tabla	HIPOTESIS
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₁ de la primera semana	-1.874	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₁ de la segunda semana	-1.821	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₂ de la primera semana	-2.769	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₁ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	-1.784	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₁ de la primera semana	-2.579	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₁ de la segunda semana	-0.817	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₂ de la primera semana	-3.6	2.145	<i>Acepta la Hipótesis alterna</i>
T ₁ R ₂ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	-0.806	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₁ R ₂ de la primera semana	0.515	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₁ R ₁ y T ₁ R ₂ de la segunda semana	0.752	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₀ R ₁ y T ₀ R ₂ de la primera semana	1.177	2.145	Acepta la Hipótesis Nula
T ₀ R ₁ y T ₀ R ₂ de la segunda semana	0.447	2.145	Acepta la Hipótesis Nula

Cuadro A-9. Informe de resultados: Resultado de bacteriología.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) FTL 15.1.2
03/10/2010 R.2, V.1

 **DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL Y ANIMAL**
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS

RESULTADO DE BACTERIOLOGÍA

No certificado 151203.29

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Propietario: CENDEPESCA Propiedad: EST. DE MARICULTURA LOS COBANOS
Dirección: _____ Teléfono: 2432 - 0349 Fax: _____
Departamento: SONSONATE Municipio: ACAJUTLA
Cantón: PUNTA REMEDIOS Caserío: _____
Enviada por: DR. MANUEL I. RAMIREZ LUNA

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Código de muestra: CF12030929 Muestra: HISOPADOS DE PILAS Nº de muestras: 3
Análisis solicitado: SALMONELLA SP, ESCHERICHIA COLI, CLOSTRIDIUM SP, VIBRIO SP
Fecha de recepción: 9/MARZO/12 Fecha de análisis: 12 - 15/MARZO/12 Especie: _____
Total de animales: _____ Nº animales enfermos: _____ Nº animales muertos: _____

RESULTADO
15/MARZO/12

Hisopado # 1: Se aisló E. coli
No se aisló Salmonella sp, Clostridium sp, y Vibrio sp

Hisopado # 2: Se aisló E. coli
No se aisló Salmonella sp, Clostridium sp, y Vibrio sp

Hisopado # 2: Se aisló E. coli
No se aisló Salmonella sp, Clostridium sp, y Vibrio sp

• Los resultados expresados en el presente certificado de análisis corresponden única y exclusivamente a las muestras ensayadas. El laboratorio no realiza actividades de muestreo. Prohibida la reproducción total o parcial, sin la autorización por escrito del laboratorio. Los datos no tienen validez si presentan algún cambio o emendadura.


MVZ. Cecilia Vásquez
Técnico responsable del Análisis


Dr. Luis Ernesto Romero
Médico Veterinario Oficial


Ing. Margarita Arango de Cisneros.
Jefe Red Nacional de Laboratorios.

LABORATORIO CENTRAL, CANTÓN EL MATAZANO, SOYAPANGO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR
TELEFAX: 2202-0802

Página 1 de 1

Cuadro A-10. Informe de resultados: Agua M4

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) FTL 15.8.3
07/10/2011 N:3 V:1

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS

EL SALVADOR

AGUA

Nº certificado 151203.28

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Propietario: CENDEPESCA Empresa: EST. DE MARIC. LOS COBANOS
Dirección: _____ Teléfono: 2432 - 0349
Departamento: SONSONATE Municipio: ACAJUTLA
Enviada por: DR. MANUEL I. RAMIREZ LUNA

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Código de muestra: CF12030928 Fecha de recolección: 9/MARZO/12 Fecha de recepción: 9/MARZO/12
Fecha de análisis: 12 - 15/MARZO/12 Fecha de reporte: 15/MARZO/12

Descripción de envío: Frasco de vidrio Frasco de plástico Bolsa de plástico

RESULTADOS DE ANÁLISIS : M4 AGUA

Determinación	Especificaciones	Resultado
Bacterias coliformes totales ¹	< 1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
Bacterias coliformes fecales ²	<1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
Escherichia coli ³	<1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
Recuento total de mesófilos aerobios ⁴	100 UFC/ml	270 UFC/ ml
Bacterias patógenas ⁵	Ausencia	Ausencia de Vibrio sp

- Los resultados expresados en el presente certificado de análisis corresponden única y exclusivamente a las muestras ensayadas. El laboratorio no realiza actividades de muestreo.
- Prohibida la reproducción total o parcial, sin la autorización por escrito del laboratorio.
- Los datos no tienen validez al presentar algún borón o emmendadura.

- Especificaciones establecidas según NSO 13.07.01.05 "Agua potable. (Segunda actualización)"
- UFC: Unidades formadoras de colonia. NMP: Número más probable.
- 1. APHA AWWA WEF. Método 9221 B
- 2. APHA AWWA WEF. Método 9221 E
- 3. APHA AWWA WEF. Método 9221 F
- 4. APHA AWWA WEF. Método 9215 A y B


M.V. Cecilia del Carmen Vásquez
Técnico responsable


Ing. Margarita Arango de Cisneros.
Jefe Red Nacional de Laboratorios.

LABORATORIO CENTRAL, CANTÓN EL MATAZANO, SOYAPANGO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR
TELEFAX: 2202-0802

Página 1 de 1

Cuadro A-11. Informe de resultados: Agua M3

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) FTL 15.8.3
07/10/2011 R/3 V/1

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS

EL SALVADOR

AGUA

Nº certificado 151203.27

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Propietario: CENDEPESCA Empresa: EST. DE MARIC, LOS COBANOS
Dirección: _____ Teléfono: 2432 - 0349
Departamento: SONSONATE Municipio: ACAJUTLA
Enviada por: DR. MANUEL I. RAMIREZ LUNA

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Código de muestra: CF12030927 Fecha de recolección: 9/MARZO/12 Fecha de recepción: 9/MARZO/12
Fecha de análisis: 12 - 15/MARZO/12 Fecha de reporte: 15/MARZO/12

Descripción de envío: Frasco de vidrio Frasco de plástico Bolsa de plástico

RESULTADOS DE ANÁLISIS : M3 AGUA

Determinación	Especificaciones	Resultado
Bacterias coliformes totales ¹	< 1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
Bacterias coliformes fecales ²	<1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
<i>Escherichia coli</i> ³	<1.1 NMP/100 ml	<1.1 NMP/100 ml
Recuento total de mesófilos aerobios ⁴	100 UFC/ml	DNPC
Bacterias patógenas ⁵	Ausencia	Ausencia de Vibrio sp

- Los resultados expresados en el presente certificado de análisis corresponden única y exclusivamente a las muestras ensayadas. El laboratorio no realiza actividades de muestreo.
- Prohibida la reproducción total o parcial, sin la autorización por escrito del laboratorio.
- Los datos no tienen validez si presentan algún borrón o enmendadura.
- DNPC: Demasiado numeroso para contarse**

- Especificaciones establecidas según NSO 13.07.01.05 "Agua. Agua potable. (Segunda actualización)"
- UFC: Unidades formadoras de colonia. NMP: Número más probable.
- 1. APHA AWWA WEF. Método 9221 B
- 2. APHA AWWA WEF. Método 9221 E
- 3. APHA AWWA WEF. Método 9221 F
- 4. APHA AWWA WEF. Método 9215 A y B


M.V. Cecilia del Carmen Vásquez
Técnico responsable


Ing. Margarita Arango de Cisneros.
Jefe Red Nacional de Laboratorios.

Página 1 de 1

LABORATORIO CENTRAL, CANTÓN EL MATAZANO, SOYAPANGO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR
TELEFAX: 2202-0802

Cuadro A-12. Informe de resultados: Agua M2

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) FTL 15.8.3
07/10/2011 R3 V:1

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA
INFORME DE RESULTADOS

AGUA

Nº certificado 151203.26

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Propietario: CENDEPESCA Empresa: EST. DE MARIC. LOS COBANOS
Dirección: _____ Teléfono: 2432 - 0349
Departamento: SONSONATE Municipio: ACAJUTLA
Enviada por: DR. MANUEL I. RAMIREZ LUNA

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Código de muestra: CF12030926 Fecha de recolección: 9/MARZO/12 Fecha de recepción: 9/MARZO/12
Fecha de análisis: 12 - 15/MARZO/12 Fecha de reporte: 15/MARZO/12

Descripción de envío: Frasco de vidrio Frasco de plástico Bolsa de plástico

RESULTADOS DE ANÁLISIS : M2 AGUA

Determinación	Especificaciones	Resultado
Bacterias coliformes totales ¹	< 1,1 NMP/100 ml	<1,1 NMP/100 ml
Bacterias coliformes fecales ²	<1,1 NMP/100 ml	<1,1 NMP/100 ml
<i>Escherichia coli</i> ³	<1,1 NMP/100 ml	<1,1 NMP/100 ml
Recuento total de mesófilos aerobios ⁴	100 UFC/ml	340 UFC/ ml
Bacterias patógenas ⁵	Ausencia	Ausencia de Vibrio sp

- Los resultados expresados en el presente certificado de análisis corresponden única y exclusivamente a las muestras ensayadas. El laboratorio no realiza actividades de muestreo.
- Prohibida la reproducción total o parcial, sin la autorización por escrito del laboratorio.
- Los datos no tienen validez si presentan algún borrón o enmendadura.

- Especificaciones establecidas según NSO 13.07.01.05 "Agua. Agua potable. (Segunda actualización)"
- UFC: Unidades formadoras de colonia. NMP: Número más probable.
- 1. APHA AWWA WEF, Método 9221 B
- 2. APHA AWWA WEF, Método 9221 E
- 3. APHA AWWA WEF, Método 9221 F
- 4. APHA AWWA WEF, Método 9215 A y B


M.V. Cecilia del Carmen Vásquez
Técnica responsable


Ing. Margarita Arango de Cisneros.
Jefe Red Nacional de Laboratorios.

LABORATORIO CENTRAL, CANTÓN EL MATAZANO, SOYAPANGO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR
TELEFAX: 2202-0802

Página 1 de 1

Cuadro A-13. Informe de resultados: Acuícola.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) FTL 9.2.1
02/03/2011 R:2 V:1

DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE CALIDAD
LABORATORIO DE PCR
INFORME DE RESULTADOS

EL SALVADOR

ACUICOLA

Nº certificado 91203.05

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Propietario: CENDEPESCA LOS COBANOS Propiedad: EST. DE MARICULTURA LOS COBANOS
Dirección: _____ Teléfono: _____
Departamento: SONSONATE Municipio: ACAJUTLA
Cantón: PUNTA REMEDIO Caserio: _____
Enviada por: DR. MANUEL I. RAMIREZ LUNA

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Código de muestra: CF12030930 Tipo de muestra: POSTLARVAS Nº de muestras: 3
Análisis solicitado: YHV / TSV / IHNV Fecha de muestreo: _____
Fecha de recepción: 9/MARZO/12 Fecha de análisis: 12-13/MARZO/12 Fecha de reporte: 13/MARZO/12

RESULTADO

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETECCION DE YHV / TSV / IHNV EN MUESTRAS DE POSTLARVAS DE CAMARON

Identificación	Resultado		
	YHV	TSV	IHNV
1 - Tubo con Postlarvas de Camarón	Negativo	Negativo	Negativo
2 - Tubo con Postlarvas de Camarón	Negativo	Negativo	POSITIVO
3 - Tubo con Postlarvas de Camarón	Negativo	Negativo	Negativo

- Referencia: Protocolo del Kit para PCR.
- Los resultados expresados en el presente certificado de análisis corresponden única y exclusivamente a las muestras ensayadas. El laboratorio no realiza actividades de muestreo.
- Prohibida la reproducción total o parcial, sin la autorización por escrito del laboratorio.
- Los datos no tienen validez si presentan algún borro o emendaduras.


 Dr. Luis Ernesto Romero
 Técnico responsable



 Ing. Margarita Arango de Cisneros
 Jefe Laboratorio de Diagnóstico y Control de Calidad

Página 1 de 1

LABORATORIO CENTRAL, CANTÓN EL MATAZANO, SOYAPANGO
SAN SALVADOR, EL SALVADOR
TELEFAX: 2202-0802



- a. Calamar
- b. Flake
- c. Espirulina

- d. Plancton BP
- e. Cistos de artemia

figura A-1. Presentación del alimento utilizado en el levantamiento larvario.

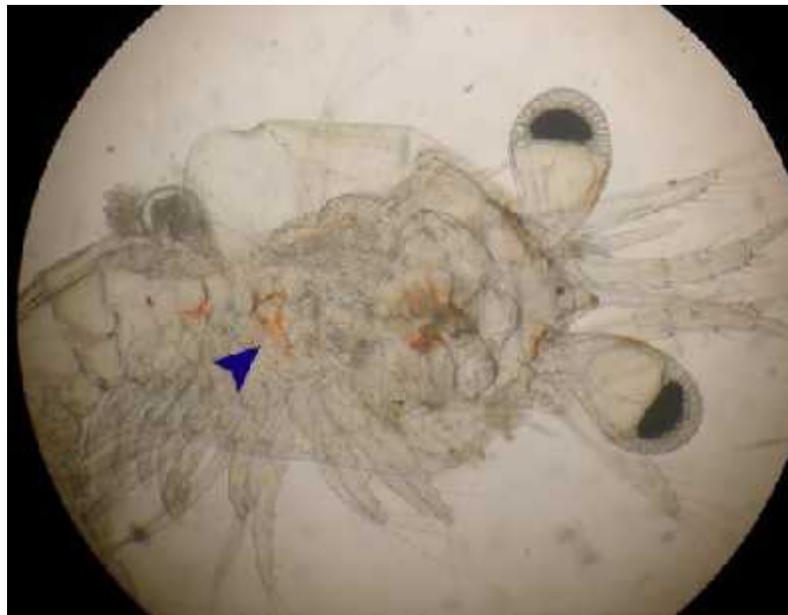


figura A-2. Necrosis encontrada en Z II-III

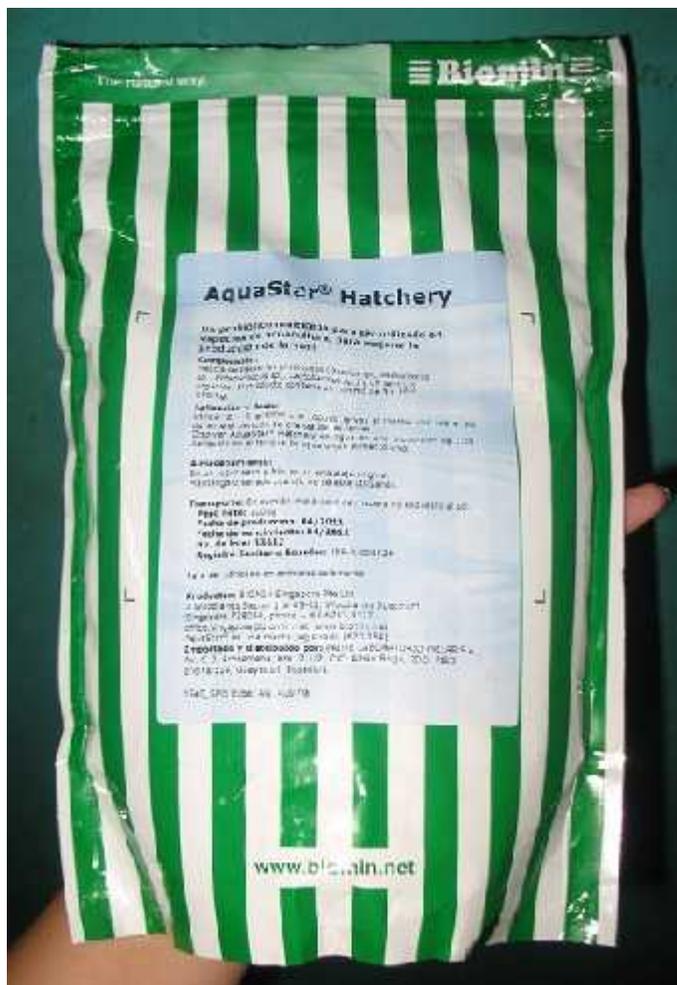
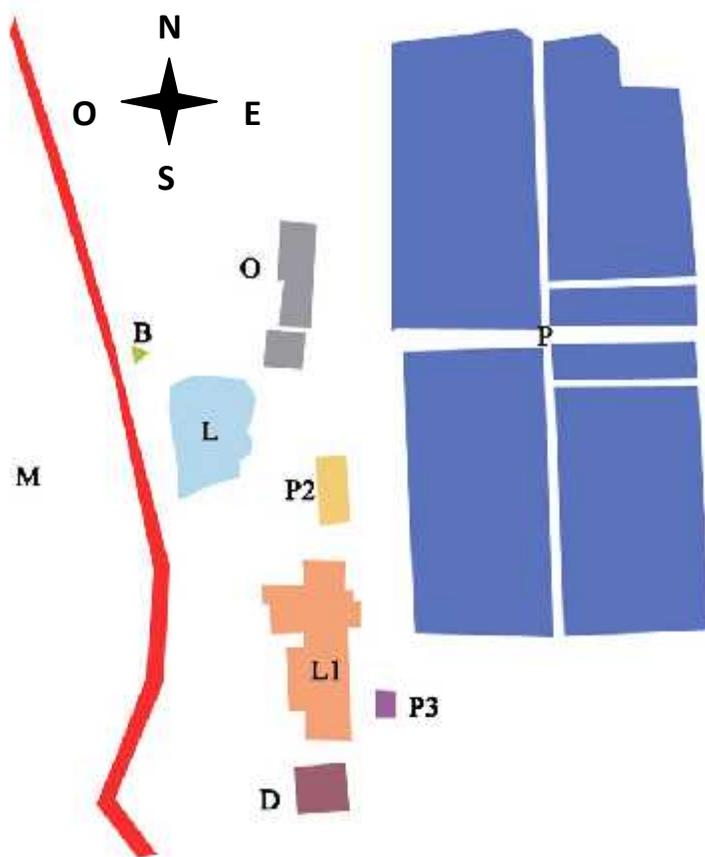


figura A-3. Bolsa de probiótico



M= costa pacífica

B= bomba

O= bodega

L= laguna de oxidación

L1= laboratorio

P= estanques

P2= pilas de pepinos de mar, cría de conchas y aclimatación de postlarvas de camarón.

P3= planta de energía

D= dormitorios

figura. A-4 Croquis de la Estación de Maricultura Los Cóbanos

- 1) Pilas donde se recibe y trata el agua
- 2) Entrada del agua tratada y ubicación del filtro de arena
- 3) Pilas de cultivo masivo de microalgas
- 4) Entrada de tubería de las microalgas a la zona larvicultura
- 5) Pilas de cultivo de larvas
- 6) Pilas de reservorio de agua tratada
- 7) Desagüe
- 8) Incubadoras de artemia
- 9) Tanque de agua tratada
- 10) Sala de reproductores
- 11) Mangueras para recambio de agua
- 12) Laboratorio de microalgas
- 13) Equipo de aireación
- 14) Bodega
- 15) Lavaderos
- 16) Filtros para recambio de agua
- 17) Bomba para entrada de agua
- 18) Estantes de materiales (bolsas, mangueras para aireación, etc.)

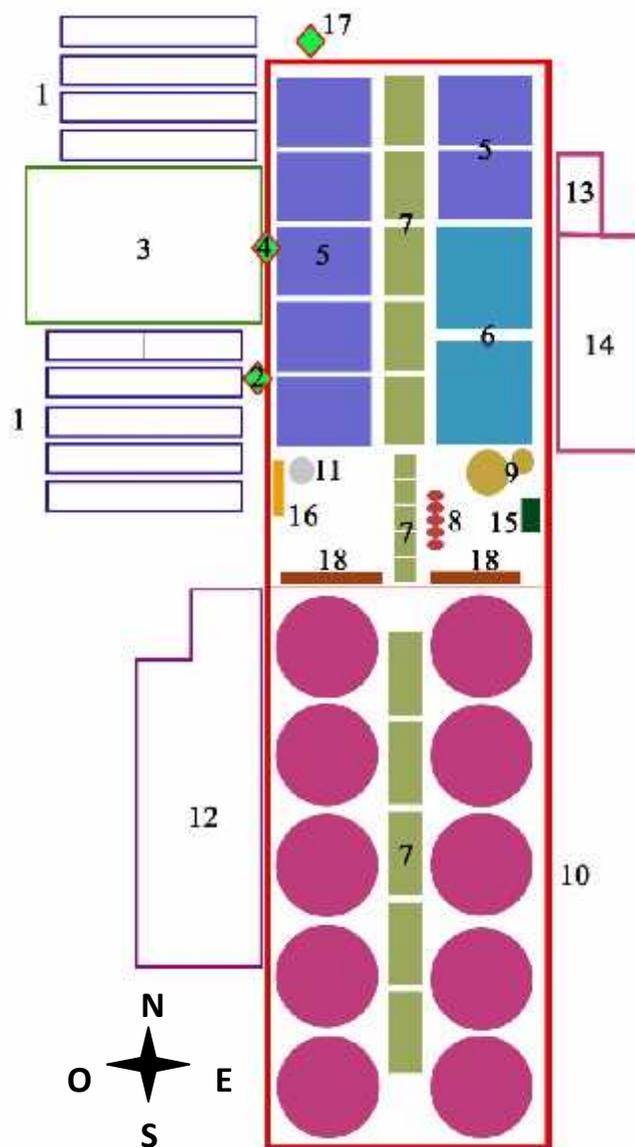


figura. A-5 Esquema del laboratorio de larvicultura

Anexo 1. Métodos de diagnóstico de enfermedades en camarones marinos de cultivo (*Litopenaeus vannamei*)

Según Cuéllar-Anjel (2002), los pasos para el diagnóstico en base a los métodos actuales para determinar enfermedades en camarones marinos son:

a) Anamnesis

El técnico en sanidad responsable de realizar el diagnóstico de una enfermedad en una población de camarones, debe incluir una visita a la instalación afectada (maduración, larvicultura o finca de engorde).

Durante esta visita, debe recopilar la información histórica previa a la aparición del brote de la enfermedad. Esto puede incluir cambios en parámetros ambientales o fisicoquímicos, tránsito inusual de personas o equipos instalaciones, presencia de animales foráneos al sistema como perros, aves, roedores o vacas, alteraciones en el régimen y tipo/calidad del alimento suministrado, cambios en los procedimientos o tipos de fertilizantes, uso de productos químicos o biológicos en el cultivo afectado, existencia de brotes similares con anterioridad en dicha empresa o en otras conocidas y, toda aquella información pasada o presente relacionada directa o indirectamente con la población en cuestión (Cuéllar-Anjel 2002).

b) Examen clínico

Deben evaluarse las unidades de producción (tanques o estanques) que presenten problemas. Se deben realizar capturas de camarones in situ y hacer una revisión individual de animales, para formarse una idea aproximada de la proporción del problema: qué tanta población está afectada (prevalencia en %), grado de severidad de las afecciones observadas en los organismos enfermos y qué tipo de enfermedad puede estar causando el brote.

El examen clínico debe incluir un recorrido manual y visual muy cuidadoso de los camarones que sean revisados, los cuales no deben ser capturados al azar, sino seleccionados por presentar alguna manifestación de enfermedad. Con base en los hallazgos de esta valoración

clínica, es factible en algunos casos hacer un diagnóstico presuntivo, el cual se debe confirmar con pruebas complementarias de laboratorio.

Cuando se eligen camarones que presenten signos clínicos, 5 a 10 por población examinados individualmente, serán suficientes.

La captura o colección de camarones para realizar un examen que busca determinar la presencia de enfermedad, debe realizarse procurando el mínimo de estrés durante la manipulación de los animales.

Si el examen clínico debe ser realizado en un lugar diferente al de la captura y los camarones deben ser transportados hacia otra parte, la movilización debe hacerse en recipientes con agua del mismo estanque, limpia (sin lodo ni trozos de vegetales), con adecuada aireación y teniendo una densidad baja (para evitar el estrés). Si los camarones van a permanecer un período de tiempo en el recipiente antes de ser examinados, deben tener buena aireación y, en lo posible, se debe bajar la temperatura a 25-27°C mediante la adición de bolsas con hielo (selladas).

En estudio de camarones presumiblemente enfermos, se debe seleccionar animales moribundos, descoloridos, con comportamiento anormal o que presenten otras anomalías macroscópicas con las cuales se sospeche de una enfermedad (Cuéllar-Anjel 2002).

c) Microscopía Directa (Análisis en fresco)

Esta técnica está basada en la observación bajo el microscopio de tejidos o partes de camarones afectados, con el fin de establecer en la medida de lo posible un diagnóstico presuntivo. Las partes más comúnmente examinadas bajo microscopio con: hepatopáncreas, branquias, contenido intestinal (heces), músculo esquelético y contenido gástrico.

Para una evaluación sanitaria con microscopía directa, 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 al 10% tamponada, cuando no sea posible trabajar con camarones vivos (Cuéllar-Anjel 2002).

d) Bacteriología

Objetivo. El objetivo de la bacteriología en camarones, es cuantificar la cantidad y el tipo de bacterias presentes en la hemolinfa, otros tejidos o larvas y postlarvas, así como en agua para/de cultivo.

Descripción. La bacteriología es un conjunto de métodos que se utiliza como apoyo en el diagnóstico de enfermedades en camarones, cuando se sospecha que la causa de la enfermedad está relacionada con presencia de bacterias patógenas en el agua de cultivo o dentro del organismo de los animales. Consiste en la siembra de muestras en diferentes medios de cultivo, para determinar si hay crecimiento o no de bacterias potencialmente patógenas. (Cuéllar-Anjel 2002)

e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Objetivo. La reacción en cadena de polimerasa es un método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN, que permite la síntesis in Vitro de un fragmento de ADN de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas. De esta manera, se utiliza para la detección genómica de ciertos microorganismos patógenos como virus (ADN y ARN) y bacterias, en muestras de camarones o de organismos relacionados.

La PCR se utiliza en camarones para la detección de virus WSSV, IHHNV, BP, MBV, SMV, YHV (grupo), IMNV, TSV y PvNV

Descripción. El principio de la PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos nucleótidos llamados iniciadores o cebadores (primers), complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas.

La PCR se realiza en forma de ciclos. Cada ciclo duplica la cantidad de ADN, por lo que permite obtener hasta un millón de copias de un solo fragmento en pocas horas. Los elementos necesarios para llevarla a cabo se comercializan en forma de kits.

En esta técnica se consideran importantes los siguientes parámetros: un suministro abundante de iniciadores y de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); una fuente renovada de ADN polimerasa (enzima encargada de la síntesis de las cadenas complementarias) y los ciclos periódicos de cambios de temperatura. Estos últimos consisten en: desnaturalización del ADN a 100°C, alineamiento de los iniciadores con las secuencias de interés entre 50 y 60°C y, la síntesis del ADN a 72°C. Estas temperaturas pueden variar de acuerdo con las condiciones de la reacción.

El poder de la amplificación con PCR es tan alto que los pequeños contaminantes pueden dar resultados falsos positivos, por lo que el material y las soluciones a emplear deben ser muy cuidadosamente manipulados y almacenados.

Metodología: La reacción en cadena de la polimerasa imita el fenómeno de replicación del ADN que ocurre de forma natural en las células vivas. El ADN es de doble cadena (es decir, cada cadena de ADN está apareada con otra complementaria). Durante la replicación, las dos cadenas se separan y una enzima especializada llamada polimerasa, hace una copia de cada una de las cadenas, utilizando la original como plantilla o modelo. Normalmente este proceso de copia tiene lugar cuando la célula se divide y da lugar a la formación de un par de cadenas hijas.

La polimerasa necesita otros tres ingredientes para copiar ADN. El primero es una reserva de los cuatro bloques básicos que constituyen la molécula de ADN, llamados nucleótidos o bases. El segundo es una fibra corta de ADN copiado, que se llama cebador oligonucleotídico o primer, el cual está formado por varios nucleótidos que inician la replicación. El tercero es el cofactor $MgCl_2$, sin el cual la enzima no puede funcionar. La PCR utiliza estos mismos ingredientes para copiar ADN en un microtubo de ensayo.

La reacción tiene lugar en tres fases. Durante la primera o desnaturalización, la plantilla o fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de 90° a 95°C durante 30 segundos; esto provoca la separación de las dos cadenas. En la segunda fase, llamada anillaje,

la temperatura de la mezcla se baja hasta 55°C durante 20 segundos para que los cebadores oligonucleotídicos se enlacen con el ADN escindido. en la tercera fase o de polimerización, la temperatura de la mezcla se eleva hasta 75°C para que la polimerasa copie rápidamente la molécula de ADN.

Estas tres fases tienen lugar en el mismo tubo de reacción y constituyen un ciclo completo de PCR, que se realizan en menos de dos minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir sin límite, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores, deben renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir millones de copias de ADN.

Cuando la muestra contiene un agente patógeno cuyo genoma es ARN, se debe de utilizar antes de la PCR un paso adicional. Consiste en adicionar a la muestra (ARN extraído) una enzima llamada transcriptasa reversa, la que transcribe el ARN en ADN complementario (cDNA), molécula que es un ADN de doble cadena y, por consiguiente, susceptible de ser amplificada mediante una reacción normal de PCR. Este proceso enzimático que se requiere para los virus ARN, ha hecho que la PCR que lo utiliza se llame "PCR con transcriptasa reversa" (TR-PCR).

La polimerasa utilizada actualmente es termoestable, no se inactiva por las elevadas temperaturas de la primera reacción y es llamada Taq, debido a que proviene de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila. Debido a que la polimerasa Taq no resulta destruida por las elevadas temperaturas a las que transcurre PCR, basta con añadirla una vez, al principio de la reacción. la polimerasa Taq se fabrica ahora con bacterias modificadas genéticamente.

El uso de la PCR exige mucho cuidado. Lo más importante es evitar la contaminación de la mezcla reactiva. Es tan sensible, que permite multiplicar accidentalmente cantidades mínimas de ADN contaminante. Se utilizan procedimientos especiales para evitar la contaminación (Cuéllar-Anjel 2002).

Anexo 2. Ejemplo de cálculo de sobrevivencia por método volumétrico

Se tienen cuatro muestreos con los siguientes resultados:

M1= 26 larvas

M3= 23 larvas

M2= 19 larvas

M4= 30 larvas

En total se tiene que en 1000 ml o 1 litro hay: $(26+19+23+30)= 98$ larvas, entonces:

$98 \text{ larvas/lit} \times 10,000\text{lit} = 980,000 \text{ larvas}$

1,000,000 nauplios sembrados ----- 100%

980,000 nauplios según conteo ----- X

$980,000 \times 100 / 1,000,000 = 98\%$ de sobrevivencia (S.V).

Anexo 3. Cálculos del Presupuesto Parcial

Rendimiento ajustado para T0:

540,000 ----- 100%

X ----- 10% = 54,000 larvas; $540,000 - 54,000 = 486,000$ larvas.

Rendimiento ajustado para T1:

756,000 ----- 100%

X ----- 10% = 75,600 larvas; $756,000 - 75,600 = 680,400$ larvas.

Beneficio Bruto: El precio de la larva en venta es de \$0.004.

T0: $\$0.004 \times 486,000 = \$1,944$

T1: $\$0.004 \times 680,400 = \$2,721.6$

Nauplio: Tanto en T0 y T1 se utilizaron 1.8 millones de nauplios, haciendo el total de 3.6 millones. El precio de venta del nauplio es \$0.0005.

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{T0R1:} \ 900,000 \times \$0.0005 = \$450 \\
 \mathbf{T0R2:} \ 900,000 \times \$0.0005 = \$450 \\
 \mathbf{T1R1:} \ 900,000 \times \$0.0005 = \$450 \\
 \mathbf{T1R2:} \ 900,000 \times \$0.0005 = \$450
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array}$$

1.8 millones de nauplios

1.8 millones de nauplios

Costo total:

$$\mathbf{T0:} \ \$1.74 + \$0.5 + \$4.33 + \$1.37 + \$6 + \$900 = \$913.94$$

$$\mathbf{T1:} \ \$1.74 + \$0.5 + \$4.33 + \$1.37 + \$6 + \$28.38^* + \$900 = \$942.32$$

* Precio del probiótico.

Beneficio Neto:

$$\mathbf{T0:} \ \$1,944 - \$913.94 = \$1,030.06$$

$$\mathbf{T1:} \ \$2,721.6 - \$942.32 = \$1,779.28$$

$$\mathbf{Resultando} \ la \ diferencia \ de \ \$1,779.28 - \$1,030.06 = \$749.22$$

Anexo 4. Glosario

A.

Ablación ocular: o ablación peduncular unilateral, consiste en el corte del pedúnculo ocular en la hembra y provoca una disminución del nivel de hormona inhibidora del desarrollo gonadal circulante en hemolinfa, induce picos de maduración y desoves, optimizando la producción comercial de larvas (Díaz et al, 1997).

Acidolin: antibiótico producido por *Lactobacillus acidophilus*.

Anamnesis: Parte del examen clínico que reúne todos los datos históricos de la enfermedad, anteriores al brote en estudio. Es suministrada por el personal técnico de campo o por el granjero.

Antibióticos: es una sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintética de ella que a bajas concentraciones mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias. Ocasionalmente estos puede producir una reacción adversa al medicamento o afectar a la flora bacteriana normal del organismo.

Artemia: es un pequeño crustáceo filtrador, propio de hábitats acuáticos de elevada salinidad, que se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo. La salinidad es el factor principal que distribuye a las poblaciones de Artemia, ya que se encuentra adaptado a escapar de sus depredadores habitando lugares hipersalinos, en donde estos no pueden sobrevivir y por consiguiente este crustáceo puede desarrollarse adecuadamente.

B.

Bacterias enteropatógenas: son todas aquellas bacterias que se alojan en el tracto gastrointestinal y que son dañinas para el organismo.

Baculovirus: es una familia de virus infectivos para invertebrados. Poseen un genoma con ADN de cadena doble como ácido nucleico, por lo que se incluyen en el Grupo I de la Clasificación de Baltimore. El genoma es circular con un tamaño de 80-180 kpb. Se caracterizan por albergar dicha información genética en una cápside recubierta de envoltura viral y estructuralmente definida por una simetría cilíndrica, de un tamaño (con envoltura) de 40-110 por 200-400 nm; y por ensamblar los viriones maduros en el núcleo como compartimento celular.

Bentos: En ecología se llama bentos (del griego /benthos, "fondo marino") a la comunidad formada por los organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos. El bentos se distingue del plancton y del necton, formados por organismos que habitan en la columna de agua. El adjetivo que se hace derivar de bentos es bentónico.

Bioencapsulación: introducción de cepas seleccionadas dentro del tracto digestivo del predador vía alimento vivo como las artemias.

Bioensayo: Experimento que se hace utilizando organismos vivos, bajo condiciones y ambientes.

C.

Cromatóforo/s: son células con pigmentos en su interior que reflejan la luz. Pueden encontrarse en diversos seres vivos como los anfibios, los peces, ciertos crustáceos y algunos cefalópodos.

D.

Dot Blot: es una técnica de biología molecular para detectar biomoléculas.

E.

Ecdisis: o muda, en biología, se llama a la renovación de los tegumentos (recubrimientos del cuerpo) que se produce en muchos animales.

EDTA: ácido etilen diamino tetra acético, es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica.

Epibionte: Organismo no parásito que vive por lo menos una fase de su ciclo vital encima de otro de mayor tamaño, al cual generalmente no le causa ningún problema.

Epirulina: Alimento a base de alga utilizado en el ciclo larvario de los camarones. Promueve al metabolismo de las larvas de camarón.

F.

Falso positivo: es un error por el cual al realizar una prueba complementaria (un análisis de sangre, etc.) su resultado indica una enfermedad, cuando en realidad no la hay.

Filogenéticamente/ filogenia: es la determinación de la historia evolutiva de los organismos.

Final call: reacciones de baja eficiencia debido al fallo de uno o más nucleótidos. Esto debido a un fallo en el diseño del sistema de detección por PCR.

Flake: Alimento para larvas de camarón a base de comida para camarón, hígado de calamar, extracto de alga marina, carotenoides, fosfolípidos y otros. La cantidad de proteína que contiene ayuda a incrementar el rango de crecimiento, eficiencia para alimentarse y el rango de sobrevivencia de las larvas de camarón.

Fototaxis/ fototaxia: es una habilidad que poseen muchas células para dirigirse hacia la luz.

H.

Hematopoyético/a/sis: proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética pluripotencial, unidad formadora de clones, hemocitoblasto o stem cell.

Hemolinfa: Tejido sanguíneo de los camarones que irriga los órganos y tejidos llevando oxígeno y nutrientes.

Hepatopáncreas: Glándula digestiva del camarón, encargada de producir enzimas y hormonas, principalmente.

Herbivoría: relaciones tróficas entre las plantas y los animales.

Hilo fecal: heces colgantes del ano de las larvas y suspendidas en la columna de agua donde se desarrollan las mismas, signo de buena salud.

I.

Iatrogénico/genia: también llamado acto médico dañino, es el acto médico debido, del tipo dañino, que a pesar de haber sido realizado debidamente no ha conseguido la recuperación de la salud del paciente, debido al desarrollo lógico e inevitable de determinada patología terminal.

Iniciador o primer: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Inmunoestimuladores: son sustancias (fármacos y nutrientes) que estimulan el sistema inmunitario induciendo activación o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes.

L.

Larvicultura: Fase del cultivo de camarón relacionado con el desarrollo de larvas y postlarvas.

Luminiscencia: es toda luz cuyo origen no radica exclusivamente en las altas temperaturas, por el contrario, es una forma de "luz fría" en la que la emisión de radiación lumínica es provocada en condiciones de temperatura ambiente o baja.

M.

M: Mysis.

Melanización: consiste en una serie de reacciones que se inician con la hidroxilación de tirosina para formar L-hidroxifenilalanina (L-DOPA) la cual, a su vez, se oxida y da lugar a diferentes compuestos llamados dopacromos, y éstos, por su parte, producen indolquinonas que se polimerizan y forman la melanina como producto final (Söderhall e Iwanaga, 1996).

Mesh: unidades utilizadas para medir el diámetro de los orificios de mallas de filtro.

Microalgas: grupo variado de plantas microscópicas de diversas formas, tamaños, que son meramente acuáticas, se encuentran naturalmente en rocas, flotado en el agua y en otros materiales. Aportan diversos nutrientes como lo son: proteínas, vitaminas, fibra cruda, aminoácidos. Constituyen la base para la alimentación de larvas.

Microbiota/ microbiota normal: flora normal o flora nativa al conjunto de microorganismos que viven de forma habitual en un organismo sano.

N.

Necrosis: Muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar. Una vez se ha producido y desarrollado la necrosis, es irreversible.

N: Nauplio.

nm: nanómetros.

O.

Omnivoría: Se define como el consumo sobre más de un nivel trófico.

P.

Patogénesis: origen y evolución de una enfermedad con todos los factores que están involucrados en ella.

Patología: es la parte de las ciencias médicas, humanas y animales encargada del estudio de las enfermedades en su más amplio sentido, es decir, como procesos o estados anormales de causas conocidas o desconocidas.

Pelágico: El pelágo (del griego (πέλαγος), "mar abierto") es la parte del océano que está sobre la zona pelágica, o sea, la columna de agua del océano que no está sobre la plataforma continental. Los organismos que habitan esta área se denominan pelágicos.

Penaeidae: Crustáceos nadadores con el rostro bien desarrollado, con dientes en el borde dorsal sólo o en ambos. El pedúnculo ocular carece de tubérculo, pero tiene escamas en la base. Presentan espina hepática y el surco cervical es corto y no alcanza el borde del caparazón. El tercer pereiópodo está un poco más desarrollado que el segundo. Sexos separados y fáciles de diferenciar; en el macho, los endopodios del primer par de pleópodos se han transformado en un órgano copulador que emplea para transferir a la hembra un espermatóforo que se fija a la base del cuarto y quinto par del pereiópodos. Los huevos, tras la fecundación, no son retenidos para ser incubados.

Penaeido: Nombre común para los miembros de la familia de crustáceos Penaeidae, comúnmente denominados camarones o gambas. Un cultivo económicamente importante originario de aguas marinas y salobres de áreas tropicales o subtropicales. Ciclo vital caracterizado por varias etapas iniciales del desarrollo de las cuales nauplios (5 etapas sucesivas), zoea (3), mysis (3) y postlarva (hasta 22).

Penaoides: referente a la familia penaeidae.

Peneidinas: Péptidos antimicrobianos de crustáceos.

pH: es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución. El pH indica la concentración de iones hidronio [H₃O⁺] presentes en determinadas sustancias. La sigla significa potencial de hidrógeno.

PL: postlarva.

Plancton artificial BP: Alimento para camarón consistente en plancton. Promueve el rango de sobrevivencia, como al metabolismo, además previene estrés por las vitaminas y aminoácidos que contiene.

Podocito: es una célula adosada a las asas capilares con un citoesqueleto prominente, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados y lisosomas frecuentes. Esta célula emite unas prolongaciones primarias de las que emergen otras finas secundarias terminando en unos ensanchamientos o pedicelos que se entremezclan los de un podocito con otros y forman un recubrimiento a los capilares.

ppm: partes por millón.

Probióticos: microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino.

S.

Sonda: o sonda molecular, es un fragmento de ADN (o raramente ARN) de pequeño tamaño (normalmente entre 100 y 1000 bases) usado en biología molecular como herramienta para detectar la presencia de ADN o ARN de secuencia complementaria parecida o igual.

U.

ufc: unidades formadoras de colonias.

ups: Unidades Prácticas de Salinidad, relación de conductividad de una muestra de agua de mar con una solución estándar de KCl.

Urópodos: son la parte final del cuerpo de los crustáceos; están a continuación del abdomen o pleon y normalmente son laminares o aplanados, presentando forma de abanico por lo que se le denomina abanico caudal.

Z.

Z: Zoea.