

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

Daniel Aguayo¹, Ricardo Cedeño², Edward Donoso³, Jenny Rodríguez⁴

¹Ingeniero Acuicultor 2006

²Master en Ciencias 2003

³Acuicultor 1996

⁴Directora de Tópico. Bióloga, Universidad Estatal de Guayaquil, 1984, Doctorado Francia, Blaise Pascal Clermont-Ferrand II, 1994, Investigadora de CENAIM desde 1994

Resumen

*Debido a las bajas producciones de camarón reportadas en Ecuador por la presencia del WSSV, las estrategias para disminuir la incidencia del virus han sido enfocadas en el manejo de la salud de estos organismos. La hipótesis de este estudio plantea que los probióticos *Vibrio hepatarius* (P62) y *Bacillus sp.*(P64), y los β -1,3/1,6-glucanos (BG) estimulan el sistema inmune del camarón, haciendo que estos sean más resistentes a brotes infecciosos, esto permitirá mejorar la salud, la supervivencia de los organismos e incrementar la producción por ciclo de cultivo. Se evaluaron dos protocolos de BG aplicados en base a dosis y dos protocolos con probióticos en base a frecuencias de administración. Tanto los probióticos como los BG fueron aplicados en el alimento. Todos los protocolos fueron comparados contra un tratamiento control (Sin probióticos y sin BG).*

Pese a la hipoxia observada en las piscinas, y presencia del WSSV a mitad del ciclo de cultivo; se obtuvo diferencias significativas en producción (libras.ha.⁻¹) y FCA en los tratamientos BG-1 y probiótico 1. Logrando incrementar la producción sobre el 48% y 52% respectivamente, obteniéndose además una disminución de un 60% en el FCA en ambos casos. La supervivencia y densidad de cosecha de los organismos, no fue estadísticamente significativa a pesar de ser numéricamente mayores en los tratamientos que el control.

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

Palabras Claves: Probiótico, BG, producción, supervivencia, inmunidad.

Abstract

*Since low shrimp production have been associated in Ecuador with the presence of WSSV, production strategies that will reduce the virus incidence have focused on shrimp health. The hypothesis of this study was that the use of probiotics (*Vibrio hepatarius*, P62 and *Bacillus sp.*, P64) and β -1,3/1,6-glucans (BG) stimulate the shrimp immune system, improving its resistance to infection, increasing pond survivals and the production at harvest. Two BG doses and two frequencies of administration of probiotics were evaluated. In all cases, probiotics and BG were administrated through the feed. A control was included that did not receive probiotics nor BG.*

In spite of hypoxia events and the presence of a WSSV outbreak, significant differences in the production (lbs.ha.⁻¹) and FCR with the BG-1 and in the Probiotic 1 treatments were observed, allowing production to increase by 48% and 52%, respectively. In addition, we found a decrease of 60% in the FCR in both cases.

The survival and density at the harvest were not statistically different, although these treatments showed higher values than the control.

The additional cost associated with the use of probiotic 1 and BG-1 is justified, in regard to the higher income and internal return rate obtained.

1. Introducción

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

En Ecuador antes de la presencia del virus de la mancha blanca (WSSV, por sus siglas en inglés) en el año 1998, el cultivo de camarón llegó a producir más de 252 millones de libras con un ingreso de \$900 millones (USD), generando más de 1'200.000 puestos de trabajo [1]. El rendimiento del cultivo en aquella época era alto (2000 libras.ha.⁻¹) y la

supervivencia de los organismos alcanzaba entre el 55 y el 60%. Esta cifra bajó drásticamente a partir de la presencia del WSSV con supervivencias que no lograban superar el 10% y rendimientos bajos de producción (400 libras.ha⁻¹). El virus provocó altas mortalidades en los animales causando un colapso en la industria camaronesa. A inicios de 1999, la Cámara Nacional de Acuicultura (CNA) informó que apenas el 25% de la industria de camarón en Ecuador estaba produciendo y que hasta el 2004 la industria dejó de percibir más de \$3.000 millones [1,2].

Ante la desesperación del sector productivo, muchas medidas se tomaron para mitigar las pérdidas económicas y controlar el virus. La comunidad científica se dispuso a tratar de controlar la epidemia a través de métodos preventivos sin producir efectos nocivos en el medio, enfocándose en algunos casos directamente en el sistema de defensa del camarón. Se realizaron investigaciones de tipo fisiológico y genómico del WSSV y se desarrollaron métodos de diagnóstico a fin de investigar posibles portadores del virus, tratando de controlar ya sean las entradas del virus o su desarrollo en los estanques.

De toda la experiencia acumulada desde 1999, uno de los efectos más destacados sobre la resistencia al WSSV, es la inmunestimulación del sistema inmune del camarón producido por las altas temperaturas en el sistema de cultivo. Durante el año 2001, CENAIM realizó varios experimentos exponiendo camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* al WSSV a diferentes temperaturas [3]. Los resultados consistentemente demostraron una supervivencia superior al 95% cuando los camarones eran expuestos al virus con una temperatura del agua de 33°C.

El uso de invernaderos se implementó como estrategia para incrementar las temperaturas y la producción de camarón. Sin embargo, el alto costo en la implantación de esta tecnología en las piscinas camaronas, ha sido una limitante para el sector productor. Una de las alternativas más económicas y discutidas que ha provocado un efecto protector ante el WSSV, es el uso de cepas probióticas y/o β -1,3/1,6-glucanos (BG). Se han logrado obtener muy buenos resultados de inmunestimulación en los organismos mejorando su salud y supervivencia bajo condiciones de laboratorio y engorde en piscinas. Sin embargo; en el campo los resultados muchas veces han sido poco reproducibles. No existe un protocolo que garantice la efectividad del uso de inmunostimulantes en cultivo. El propósito de este estudio, es encontrar las dosis y los protocolos de aplicación de BG y probióticos más adecuados, a fin de incrementar de forma significativa la producción de camarón (densidad de cosecha) en estanques de cultivo.

2. Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en la Estación experimental de la Fundación CENAIM-ESPOL

ubicada en la provincia del Guayas, localidad de Palmar, entre los meses de Febrero y Abril del 2006.

3.1. Características de piscinas experimentales

El cultivo se realizó en 8 piscinas de 400m²⁻¹ del sector A y 12 piscinas del sector B de la estación. Las piscinas tienen una superficie promedio de 400m²⁻¹ una pendiente de fondo de 0,8%, la altura de los muros es de 1,50m y columna de agua de 1,0m con capacidad de almacenamiento de 400m³⁻¹. Los muros laterales de división entre piscinas tienen una corona superior de 1m. Los muros que llevan la tubería para la distribución de agua y los ductos de drenaje de los efluentes tienen un ancho superior a los 3,0m. Todos los muros tienen una pendiente de 1,5:1,0.

3.2 Material biológico

3.2.1. Animales Cultivados. Se obtuvieron los organismos provenientes del laboratorio EGIDIOSA ubicado en San Pablo, en el estadio Nauplio 5. Fueron cultivados en CENAIM siguiendo el protocolo de rutina del centro, el mismo que incluye el suministro del probiótico *V. alginolyticus*. Posteriormente desde PL5 hasta PL18 las larvas pasaron a 3 tanques externos de 8TM, correspondientes a 3 tratamientos distintos. En el primero se aplicó los probióticos *V. hepatarius*, P62; *Bacillus sp*, P64. Estos fueron aplicados al agua como un inóculo para obtener una concentración final de 1x10⁵ UFC.ml⁻¹ en el tanque. En el segundo se aplicó BG en el alimento a una concentración de 150 mg.kg⁻¹ de alimento. El tercero correspondió al control. Todos los tratamientos estuvieron a 31± 1°C (incluyendo el control). Esta temperatura se consiguió empleando una cubierta de plástico de invernadero sobre los tanques.

Finalmente se efectuó la siembra directa de los camarones a una densidad de 16 animales.m²⁻¹.

3.2.2. Cepas Probióticas. Las cepas fueron almacenadas en CENAIM en recipientes plásticos esterilizados, a una temperatura de -40°C. Cada semana se transportó a la Estación (Palmar) la dosis calculada de cepas probióticas para la aplicación correspondiente de alimento.

3.3. Diseño experimental

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

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

bacterias probióticas P62 y P64 se aplicaron diariamente en el alimento a partir de la quinta semana de cultivo hasta la cosecha.

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

Los BG sólo se aplicaron en el alimento en dos ocasiones específicas de cada mes los cuales se determinaron de acuerdo al ciclo lunar. 1) La primera aplicación se realizó la semana posterior a la luna nueva. 2) La segunda aplicación se inició 2 días anteriores a la luna llena prolongándose durante todo el aguaje. Esto se hizo con la finalidad de aprovechar la sincronización del ciclo de muda con el ciclo lunar. Teóricamente con este procedimiento, los animales recibieron BG durante las etapas de postmuda a premuda temprana cuando el camarón aumenta su capacidad de ingerir alimento [4].

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

3.4. Manejo de la alimentación

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

3.4.1 Aplicación de Cepas Probióticas. Los recipientes que contenían las cepas bacterianas P62 y P64 a una concentración de 1×10^8 fueron descongelados 20 minutos previos a la adición en el alimento. La relación del probiótico a utilizar fue de: 1ml de cepa P62 y 1ml de cepa P64 por kg de alimento, el procedimiento consistió de:

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

3.4.2 Aplicación de BG en el Alimento. El procedimiento consistió de:

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

3.5. Muestreos

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

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

3.6. Parámetros abióticos

Durante el cultivo se registraron los siguientes parámetros:

- Temperatura y Oxígeno disuelto (OD) del agua.- Se realizó su lectura todos los días en dos jornadas: 06h00 y 18h00. Se utilizó un equipo YSI- 85 con sensor de temperatura incorporado.

- Salinidad.- Se tomó cada vez que hubo incidencias de lluvias fuertes, utilizando un refractómetro de mano marca ATAGO, Modelo 5/Mill.

- Fertilización.- Se fertilizó al inicio del cultivo por una sola ocasión a razón de 20 kg. de Urea y 7 kg. de Súper fosfato triple por ha, con relación N:P de 6:1.

- Productividad primaria.- Se efectuó 2 cuantificaciones del fitoplancton en los estanques con ayuda de una cámara neubauer y microscopio.

- Se registró las reposiciones de agua en cada una de las piscinas por filtración y evaporación; se mantuvo los niveles de agua en cinco tablonés, lo que corresponde a una profundidad 1m.

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

3.7. Análisis estadísticos

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

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

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

3.8. Muestreos para diagnósticos

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

Durante el cultivo se tomaron muestras de camarones enfermos para hacer un análisis de histología.

3.9. Análisis mediante la técnica de PCR

Para la utilización de esta técnica se realizó la extracción del ADN del tejido de la cabeza por medio del Método de CTAB descrito por Lo [5]. Luego se realizó el análisis de detección de WSSV con la técnica de PCR anidado, utilizando los iniciadores de Kimura [6]. Para el control interno del ADN del camarón se utilizaron los iniciadores de 441-bp codante para la subunidad 18S del ARN ribosomal

3.10. Análisis histológicos

La técnica utilizada para el respectivo análisis histológico de los camarones se realizó basado en el protocolo descrito por Bell y Lightner [7]. El muestro de los animales se realizó durante el cultivo tomando animales que presentaban comportamiento anormal y moribundos.

4. Resultados

4.1. Tratamiento de las larvas

Las postlarvas empleadas en este bioensayo (PL 18), fueron tratadas en CENAIM durante 14 días. El tratamiento con cepas probióticas y temperatura alta dió como resultado una supervivencia del 94% y un peso promedio de 9,80mg.PL⁻¹. Con los BG y temperatura alta se obtuvo una supervivencia del 94% y un peso promedio de 8,69mg.PL⁻¹, mientras que en el control (larvas tratadas solo con temperatura alta) la supervivencia y el peso fueron del 82% y

10,41mg.PL⁻¹, respectivamente. Tanto los probióticos como los BG tuvieron un efecto sobre la prevalencia final para WSSV, siendo del 5 % para el tratamiento con probióticos y del 0 % para el tratamiento con BG, contra el 10 % en el control (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de peso, supervivencia y prevalencia para WSV(± Intervalo de Confianza; IC) de los tratamientos evaluados.

| Tratamientos | Peso (mg) Larvas | Supervivencia (%) | Prevalencia de WSV- PL5 (%) | Prevalencia de WSV PL18 (± IC) |
|--------------|------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Control | 10,4 | 82 | 0 | 10 (±8) |
| Probióticos | 9,8 | 94 | 0 | 5 (±1) |
| BG | 8,7 | 94 | 0 | 0 |

4.2. Parámetros ambientales

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

La concentración de OD, registró un valor promedio de 3,4 ± 1,6 mg.L⁻¹ a las 6:00 horas y de 9,2±1,9mg.L⁻¹ a las 18:00. Desde el día 28 de cultivo se observó una clara tendencia a la caída en el OD, durante el muestreo de las 6:00 horas, llegando en varias ocasiones a valores críticos de 0,2 a 1,9mg.L⁻¹ en las mañanas y máximos de 12,1 a 18,5mg.L⁻¹ en la tarde. Estas bajas concentraciones de OD se mantuvieron hasta el final del ciclo. Los recambios emergentes fueron del 40% y 50% del volumen total de cada piscina es decir 150m³-1 a 188m³-1 de agua aproximadamente. Debido a las complicaciones de manejo provocadas por los bajos niveles de OD, se adelantó la cosecha.

La turbidez promedio registrada en las piscinas fue de 40 ± 6,6cm según la lectura del disco Secchi tomada al medio día, con una concentración de 280.000 cel.ml.⁻¹ entre las 20 piscinas. En algunas piscinas el valor mínimo de turbidez llegó a 20cm y el máximo a 70cm. La salinidad promedio en el ciclo de cultivo fue de 35,1±2 UPS

4.3. Salud animal

Durante el cultivo se tuvo mortalidad por WSSV. El brote se presentó entre la séptima y novena semana, coincidiendo con las semanas en que el OD alcanzó niveles críticos. Las muestras de camarón que fueron tomadas para el análisis histológico confirmaron niveles severos de WSD.

4.4. Indicadores de cultivo

4.4.1. Producción. El ciclo de cultivo tuvo una duración total de 85 días. Los resultados mostraron la mayor producción en los tratamientos probióticos 1 y BG-1, alcanzando valores de (datos proyectados por hectárea) 2337,50 libras.ha⁻¹. y 2281,25 libras.ha⁻¹.

respectivamente; observándose la más baja producción en el tratamiento control.

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

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

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

4.4.4. Crecimiento. El peso promedio final de los organismos cosechados fue de $8,55 \pm 0,6$ g. El mayor promedio de crecimiento diario se obtuvo en el tratamiento probiótico 1 y BG-2, al igual que el crecimiento semanal con un 17% más sobre el tratamiento control. Sin embargo, para los pesos finales, estadísticamente sólo hubo diferencias significativas entre el tratamiento BG-2 y el control ($p < 0,1$).

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

Tabla 2. Resumen de los indicadores de cultivo (\pm desviación estándar)

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

4.5. Costo beneficio del uso de probióticos y BG.

4.5.1 Costos de Investigación. El costo de los tratamientos del bioensayo proyectados por hectárea se encuentran detallados en las tablas 3 y 4. En tanto el ingreso adicional en libras de camarón y en dólares americanos (USD) proyectados por hectárea se muestran en la tabla 5.

Tabla 3. Costo de BG y probióticos utilizados en el bioensayo.

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

Tabla 4. Costos de aceite de pescado (USD) utilizados en los tratamientos y proyectados.ha⁻¹

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

Tabla 5. Costo total de los tratamientos e Ingreso adicional de libras y USD. Datos proyectados.ha⁻¹

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

4.5.2 Análisis de la inversión. El monto de la inversión se logró determinar, tomando como referencia los costos tradicionales de inversión en una hectárea de producción de camarón, que según el estudio ascienden a USD 890.72 por hectárea por ciclo (Tabla 6). Los costos operativos adicionales en los que se incurren utilizando los tratamientos Probióticos 1 y BG-1, son de USD 213 y 44.13 respectivamente. Los cuales incrementan la inversión inicial a \$1,103.72 para el tratamiento con Probióticos y en \$ 934.85 para el tratamiento de BG. Este incremento en los costos, representan un 24% para el primer caso y el 5% para el segundo.

Tabla 6. Costos aproximados de inversión en una hectárea de producción tradicional de camarón.

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

4.5.3 Proyección de Ingresos

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

Tabla 7. Ingreso adicional en dólares por ciclo.ha⁻¹ y tasa de retorno aplicando los tratamientos probióticos 1 y BG-1

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

En la tabla 8 se ilustra la rentabilidad del cultivo, proyectando las ganancias netas por ciclo y por año con el uso, tanto del tratamiento con probióticos 1 como de BG-1, comparados con el tratamiento control.

Tabla 8. Rentabilidad neta por ciclo y año.ha⁻¹ con la aplicación de los tratamientos Probióticos 1 y BG-1 en base a costos estimados de producción.

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

5. DISCUSIÓN

5.1. Tratamiento de las larvas

Desde PL4 las larvas empleadas en este estudio, fueron tratados con probióticos y BG

a una temperatura de $31 \pm 1^\circ\text{C}$ con la finalidad de lograr una temprana inmunoestimulación del camarón y obtener una baja prevalencia ante el virus de la

mancha blanca (WSSV). Según Valladares [8], la interacción de los dos factores temperatura y BG tienen un efecto protector contra la infección de WSSV en larvas de camarón *P. vannamei* minimizando la probabilidad de ocurrencia (o detección) del virus. Todas las larvas recibieron el probiótico *V. alginolyticus* de zoea 1 hasta PL4.

En bioensayos de desafíos con WSSV, para evaluar la supervivencia y respuesta inmune en larvas de *P. vannamei*, Rodríguez [9] reportó que los animales cultivados con cepas probióticas tuvieron un mayor índice inmunitario que otros tratamientos de ese estudio, respondiendo al WSSV con proliferación de hemocitos.

5.2 Parámetros ambientales

La temperatura en el ciclo del cultivo estuvo dentro de los rangos óptimos para crecimiento y supervivencia del camarón, entre 28 y 31°C; en efecto, Ponce-Palafox [10], reportan como rangos óptimos 25 a 35°C para el crecimiento de estos organismos, mientras que, Wyban [11], indican que el rango óptimo para esta especie se encuentra entre 28° a 31°C siendo 35°C el límite máximo de resistencia a altas temperatura [3]. Rodríguez [12], reporta también que en esta especie a partir de temperaturas inferiores a 27°C se incrementa la prevalencia de WSSV, en tanto que la patogenicidad de esta enfermedad se reduce con el incremento de la temperatura.

La productividad primaria en el agua fue baja al inicio del cultivo (50,000 cel.ml⁻¹), siendo lo recomendado para un sistema semi-intensivo entre 80,000 cel.ml⁻¹ y 300,000 cel.ml⁻¹ [13]. Wyban y Sweeney [14], reportan que un buen nivel de productividad primaria en los estanques permite un mejor manejo del cultivo de camarón manteniendo una adecuada calidad del agua a través de diferentes mecanismos.

Los valores bajos de concentración de algas durante los primeros días de cultivo se acompañaron de lecturas altas del disco Secchi, así en la mayoría de las piscinas estuvo entre 60 cm y 70 cm, siendo lo recomendado para un sistema de cultivo semi-intensivo de camarón entre 35 y 40cm [15]. Martínez [16], reportan que una pobre turbidez en los estanques permite el desarrollo de algas bentónicas indeseables (por la llegada directa de los rayos solares al fondo de los estanques), ocasionando problemas en el manejo del cultivo e impidiendo el desarrollo de comunidades de fitoplancton por el consumo de nutrientes. Además, estas pueden atrapar partículas de alimento y postlarvas en el fondo y su descomposición, ocasionar una alta carga orgánica, abatir el oxígeno, permitiendo el desarrollo de bacterias y malos olores.

Debido a la baja productividad primaria y a la pobre turbidez en los estanques se procedió a fertilizar. El fertilizante tuvo efectos negativos en el sistema de cultivo, una semana después de su

aplicación se dió una caída brusca del OD. La combinación de Nitrógeno y Fósforo potencializó el crecimiento de dinoflagelados y cianobacterias (Donoso y Massaut, comunicación personal) de acuerdo a las observaciones de Yussof [17], las cianobacterias son consideradas una molestia en estanques acuícolas por aportar poco OD al medio y estar asociadas con una pobre calidad del agua y eutrofización [18]. El agua del sector de Palmar posee altos niveles en nutrientes y materia orgánica, producto de una mala recirculación de los efluentes de los estuarios y esto hizo que la fertilización haya sido contraproducente (Massaut, comunicación personal).

Según Martínez [16], no existe un régimen de fertilización que sea universalmente el mejor, ya que la eficiencia de la fertilización depende de numerosos factores tales como: características del estanque (incluyendo el tipo de suelo), estación del año (cálida-húmeda o fría-seca), características del agua, densidad de siembra y variables ambientales, entre otros.

Posiblemente; la baja concentración de OD en el cultivo durante cinco semanas consecutivas y los frecuentes recambios de agua (condiciones estresantes para el camarón), facilitaron los brotes de WSSV. Boyd y Watten [19], reportan que niveles bajos de OD incrementan la susceptibilidad a enfermedades, aumentando la mortalidad en camarón; rangos de 0,2 - 1mg.L⁻¹ (hipoxia) son letales para varias especies de peneidos [13]. En un estudio realizado por Zenteno-Savin [20], en *P. vannamei*, se reportó que una reoxigenación después de condiciones de hipoxia en el cultivo, afectó el metabolismo oxidativo del hepatopancreas y músculo de camarón disminuyendo sus defensas ante patógenos existentes en el medio y ocasionando daño en los tejidos.

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

5.3 Indicadores de cultivo

Todas las larvas utilizadas en este estudio recibieron un tratamiento térmico, incluso las del control, posiblemente eso influyó en los resultados de piscina. Rodríguez [21], sugiere que la temperatura actúa de forma positiva sobre la respuesta inmune del camarón, observándose una mayor proliferación celular. Por otra parte los camarones inmunoestimulados tempranamente tienen un sistema inmune más desarrollado y están mejor preparados para enfrentar desafíos virales.

El uso de probióticos en la dieta de camarón ejerció un efecto satisfactorio en cuanto a rendimiento,

supervivencia, densidad de cosecha, factor de conversión alimenticia y crecimiento en comparación con el control. De acuerdo con Conway [22]; Roques & Dussert [23], el incremento de peso en los animales puede estar relacionado directamente a la utilización de los probióticos como fuente de alimento. La relación también puede ser indirecta por la producción de enzimas y/o vitaminas. Lo segundo mejoraría la asimilación de nutrientes, el rango de crecimiento, la supervivencia y la tasa de conversión alimenticia [24, 25]. Los probióticos influyen en los procesos de digestión al mejorar la población de microorganismos benéficos, la actividad enzimática microbiana, la digestibilidad y por tanto la salud del organismo [26]. Gullian [27], observaron un efecto inmunoestimulante en la salud y crecimiento en juveniles de *P. vannamei*, cuando utilizaron las cepas probióticas P62, P64 y *V. alginolyticus* en el cultivo.

La supervivencia en el tratamiento con probióticos fue alta a pesar de la presencia del brote de WSD. Un estudio realizado por Balcazar [28], indica que el efecto de la mezcla de las bacterias probióticas P62 y P64 frente al WSSV, ejerció un efecto protector, cuando el grado de infección fue moderado.

El tratamiento probiótico 2 posiblemente no fue tan eficiente como el tratamiento probiótico 1 debido a la diferencia en la frecuencia de aplicación de las cepas probióticas en el alimento. Los animales del tratamiento probiótico 1 recibieron las cepas desde el inicio del cultivo a diferencia de los animales del tratamiento probiótico 2, que las recibieron desde la 5ta semana. Rodríguez [29], indican que las primeras semanas de cultivo son las de mayor riesgo y las más importantes de controlar en cualquier estrategia de manejo que pretenda incrementar la producción bajo condiciones del WSSV. Estos resultados sugieren que la aplicación de las cepas probióticas desde el inicio del cultivo produjo un mayor efecto protector y fue fundamental para alcanzar mejores supervivencias. Al respecto Bomba [26], declaran que la eficacia del probiótico no depende solamente de su mecanismo de acción sino de otros factores relacionados al organismo como, salud, estado nutricional, edad, estrés, genética, uso de cepas probióticas compatibles a la especie, dosis y frecuencia de administración.

De igual manera, los tratamientos con BG fueron superiores al control, en todos los indicadores de cultivo; la supervivencia no fue afectada considerablemente por el brote de WSD durante el ciclo. Estos resultados concuerdan con Cheng-Fang *et al.* [30], ellos demostraron la efectividad de la incorporación de β -1,3 glucanos en la dieta, aumentando la resistencia al WSSV de postlarvas (PL. 15) y juveniles ($5.5 \pm 0.5g$), de *P. monodon*. Adicionalmente, estudios realizados por Cornejo [31], en la misma especie, mostraron también que inmunoestimulando desde postlarvas y juveniles con β -1,3-glucanos, se obtuvo un efecto protector ante un

desafío con WSSV, logrando alcanzar supervivencias significativamente mayores que el tratamiento control.

Es muy importante manejar la dosis y frecuencia de aplicación del inmunoestimulante; una excesiva inmunoestimulación en el organismo podría causar un desgaste energético reduciendo la actividad fenoloxidasa (PO), actividad antibacteriana, número de hemocitos circulantes y proteínas plasmáticas encargadas de las defensas del organismo [32] Tal vez por esta causa, los animales del tratamiento BG-2 que recibieron una dosis final de 600 mg de BG por kg de alimento mayor que el tratamiento BG-1 (300 mg.kg^{-1}), estuvieron más afectados por el brote de WSD. Posiblemente con la dosis del tratamiento BG-2 se obtuvo un mayor desgaste energético volviendo a los organismos más vulnerables ante el WSSV, reflejándose al final con menores supervivencias que el tratamiento BG-1.

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

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

Los tratamientos con BG también justifican económicamente su inversión. Con el tratamiento de BG-1 la utilidad adicional por año⁻¹ alcanza los USD 1986 sin considerar el ahorro del 60% en el FCA. La utilidad en el tratamiento BG-2 solo logra USD 876 de utilidad por año. Estos resultados sugieren que siguiendo los protocolos de aplicación de este estudio, los mejores resultados en cuanto a producción y

ganancia se obtienen cuando se trabaja con una dosis baja de BG (150 mg.kg^{-1}).

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

En conclusión, para poder incrementar la producción de camarón, es importante mantener la salud de los organismos en todas las fases de desarrollo. No se puede obtener una buena supervivencia en las piscinas si las larvas no han recibido una buena inmunoestimulación; y una inmunoestimulación temprana de las larvas no es suficiente para mantener durante todo un ciclo de producción una protección eficaz contra las enfermedades existentes en el medio.

6. Conclusiones

1.- La aplicación de probióticos y BG en las larvas antes de la siembra, disminuyó la prevalencia de WSSV alcanzando valores del 5% y 0% respectivamente en comparación con el tratamiento control (10%).

2.- Se puede lograr incrementar significativamente la producción de camarón de *P. vannamei* en un sistema semi-intensivo con el uso de probióticos y BG en el alimento.

3.- La dosis de BG en el alimento que permitió alcanzar mejores resultados en supervivencia y producción en el cultivo de camarón, fue de 150 mg.kg^{-1} correspondiente al tratamiento BG-1.

4.- El tiempo o frecuencia de administración de las cepas probióticas en el cultivo mediante el alimento, tendrían efecto sobre la supervivencia y producción. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el probiótico fue aplicado durante todo el ciclo de producción desde la siembra.

5.- La aplicación de una dosis mayor de BG en el alimento, no incrementó de manera significativa la supervivencia, pero si tuvo un efecto positivo sobre el peso de los organismos cultivados.

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

7.- Económicamente se justifica la aplicación de probióticos y BG por su baja inversión y alta rentabilidad. Con los protocolos probiótico 1 y BG-1 se puede incrementar considerablemente la rentabilidad del cultivo de camarón por cada ciclo de producción.

5. Agradecimientos

Al Centro Nacional de Acuicultura e investigaciones Marinas (CENAIM) por permitirme realizar la tesis de grado para Ingeniería en Acuicultura.

6. Bibliografía

- [1] Guerrero, M. 2006. Vuelve la Bonanza Camaronera. Diario El Universo, Sección Economía, Pag. 15.
- [2] Regueira, E. 2001. Patrones espaciales y temporales de la producción camaronera en el Golfo de Guayaquil. Tesis de Magister en ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- [3] Sonnenholzner, S., J. Rodríguez, F. Perez, I. Betancourt, F. Echeverría, y F. Panchana. 2002a. Supervivencia, prevalencia del virus y respuesta inmune de camarones juveniles, *L. vannamei*, desafiados a WSSV a diferentes temperaturas. CENAİM-INFORMA Boletín informativo No.48
- [4] Cadena, E. 2001. "Relación entre el ciclo de Muda y actividad de las Enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el Crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*". Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- [5] Lo, C.F., J.H. Leu, C.H. Ho, S.E. Peng, Y.T. Chen, C.M. Chour, P.Y. Yeh, C.J. Huang, H.Y. Chou, C.H. Wang, y G.H. Kou. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase Chain reaction. Diseases Aquatic Organisms. 25,133-41.
- [6] Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye. 1996. Detection of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) by PCR, Fish Pathology, 31(2), 93-98.
- [7] Bell, T., y D. Lightner. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. The World Aquaculture Society. State of Hawaii, Arizona. USA. 2-3.
- [8] Valladares, A. 2006. "Tratamientos basados en alta temperatura y β -1,3-glucanos para disminuir la prevalencia de la enfermedad de la mancha blanca (WSD) en postlarvas de *Penaeus vannamei*". Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- [9] Rodríguez, J., F. Echeverría, A. Arias, y J. Apolo. 2004. El efecto combinado de una precría en invernadero e inmunestimulación con β -1,3-glucanos sobre el cultivo de camarón *L. vannamei* en el verano del 2003, CENAİM Informa Boletín Informativo No 108.
- [10] Ponce-Palafox, J., C.A. Martínez-Palacios, y L.G. Ross. 1997. The effects of salinity and Temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp. *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157:107-115.
- [11] Wyban, J., W.A. Walsh, y D.M. Godin. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the pacific shite shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. 138, 267-279.
- [12] Rodríguez, R. 2003. La tilapia y su efecto en la prevalencia del virus de la mancha blanca (WSSV) en poblaciones de camarón. Tesis de Magister en Ciencias, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.
- [13] Clifford, H. 1994. El manejo de estanques camaroneros: estudio manejo de un estanque. En: Zendejas-Hernández J (ed). Memoria del Seminario Internacional de Camarones "Camarón 94". 10-12 de Febrero, Mazatlán, Sinaloa, México. 38-50.
- [14] Wyban, J.A., y J.N. Sweeney. 1991. Intensive Shrimp Production Technology: The Oceanic Institute Shrimp Manual. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, U.S.A. 158 p.
- [15] Jory, D. 2001. Manejo integral de alimento de camarón, de estanques de reproducción, camaroneros y principios de bioseguridad. Curso Lance en acuicultura 26-30 de marzo 2001. Monterrey Nuevo León, México.
- [16] Martínez, L., A. Campaña, y M. Martínez. 2004. Manejo de la productividad natural en el cultivo del camarón. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- [17] Yusoff, F.M., M.S. Zubaidah, H.B. Matias, y T.S. Kwan. 2002. Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. Aquaculture Research 33 Issue 4 Page 269.
- [18] Paerl, H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. Limnology and Oceanography 33:823-847.
- [19] Boyd, C., y B. Watten. 1989. Aeration systems in aquaculture. Rev Aquat. Sci. 1, 425-472.
- [20] Zenteno-Savin, T., R. Saldierna, y M. Ahuejote-Sandoval. 2005. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. Comparative Biochemistry and Physiology. Article in press, Page 9.
- [21] Rodríguez, J. 2005. Efecto sobre la respuesta inmune y la supervivencia a desafíos con WSSV de la combinación temperatura inmuoestimulantes. CENAİM Informa, Boletín informativo No 125.
- [22] Conway, P. 1990. Effect of probiotic administration and dietary composition on gastrointestinal microflora of turbot. Annual report 1990/91, University of Goteborg, Sweden. P. 1-8.
- [23] Roques, C., y L. Dussert. 1991. The interest of live yeast supplementation in aquaculture and its providing effects on feed conversion. Eur. Aquacult. Soc., Spec. Publ. 14,37-45.
- [24] Douillet, P.A., y C.J. Langdon. 1994. Use of probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thumberg). Aquaculture. 119,25-40.

- [25] Garriques, D., y G. Arévalo. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador In: Browdy, C.L., Hopkins, J.S. (ed)., Swimming Throught Troubled Water. Preceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture "95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 53-59.
- [26] Bomba, A., R. Nemcoá, S. Gancarciková, R. Herich, P. Cuba, y D. Mudronová. 2001. Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fruco-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids, British Journal of Nutrition 88 (Suppl. 1), 55-99.
- [27] Gullian, M., F. Thompson, y J. Rodríguez. 2003. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233 (2004) 1 –14.
- [28] Balcazar, J. 2002. Evaluación de Mezcla de cepas probióticas en juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de grado, Universidad de Machala, Machala, Ecuador.
- [29] Rodríguez, J., F. Echeverria, C. Molina, y S. Sonnelhozner. 2003. "El efecto combinado de una precria en hipertermia e inmunoestimulacion. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos semi-intensivos en condiciones de wssv". Revista El mundo acuícola, Fundación CENAIM-ESPOL.
- [30] Cheng-fang, Ch., S. Mao-Sea, Ch. Houng-Yung, L. Chu-fang, K. Guang-Hsiung, y L. l-Chiu. 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms: 31(36):163-168.
- [31] Cornejo, F. 2001. Estudio de la resistencia contra el virus de la Mancha blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei* inmunoestimulado y su posible relación con inmunidad adaptativa. Escuela Académica Profesional de Pesquera, Perú.
- [32] Cedeño, R., C. Molina, V. Otero, E. Valenzuela, M.A. Sotomayor, y J. Rodríguez. 1999. Aspectos nutricionales e inmunoestimulación. V Congreso ecuatoriano de acuicultura, Guayaquil, Ecuador.