



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Enriquecimiento del Alimento Balanceado con Probióticos para
Prevenir la Vibriosis de Camarones Juveniles (*Litopenaeus*
Vanamei sp.) en la Zona de Tenguel, Provincia Del Guayas"

EXAMEN COMPLEXIVO

Previo la obtención del Título de:

INGENIERO DE ALIMENTOS

Presentado por:

John William Baidal Escalante

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2015

AGRADECIMIENTO

A mi madre y mi Padre que hicieron posible mi educación y me guiaron en cada momento de mi vida.

A mis amigos que de una u otra manera colaboraron con la realización de este TFG y en especial a la MS.C. María Fernanda Morales, Directora del TFG, por su invaluable ayuda.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MI HIJO

A MI FAMILIA

A MIS AMIGOS

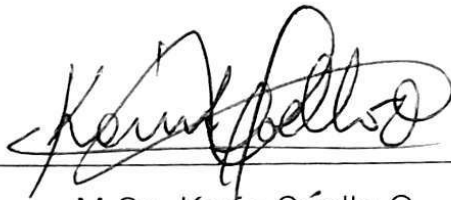
TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



M.Sc. María Fernanda Morales R.
DIRECTORA DEL TFG

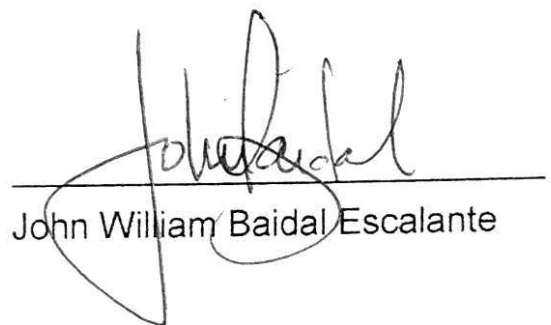


M.Sc. Karín Córdova O.
VOCAL

DECLARATORIA EXPRESA

La responsabilidad del contenido desarrollado en el presente Trabajo Final de Graduación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



John William Baidal Escalante

RESUMEN

El presente estudio se elabora dado que en la producción de camarón se presentan enfermedades durante la etapa inicial de cultivo. Esto disminuye la cantidad de animales y las libras de camarón por hectárea que se van a cosechar al final de cada ciclo de producción.

Este trabajo pretende analizar el uso de microorganismos en la preparación de alimento balanceado y de ácidos orgánicos que permitan el aumento de la sobrevivencia en la etapa inicial de producción de camarón el cual permita cualificar y cuantificar los resultados obtenidos.

Se va a evaluar piscinas de engorde de una camaronera situada en Tenguel, prov. del Guayas, utilizando animales genéticamente desarrollados con nauplios y maduración de varios laboratorios que se encuentran a lo largo de la costa ecuatoriana.

Se determinó los siguientes tratamientos en las piscinas: T0= manejo convencional, T1= alimento + microorganismos, T2= alimento + microorganismos + ácidos orgánicos, T3= alimentos + ácidos orgánicos. Las variables a analizar son peso, talla y porcentaje de sobrevivencia. Estos datos fueron tomados semanalmente en la camaronera.

Se va a hacer un análisis estadístico y control microbiológico para determinar la presencia de patógenos. Los resultados esperados es obtener mayor números de unidades de animales a la etapa de engorde de producción por metro de siembra.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
SIMBOLOGÍA.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. CULTIVO DE CAMARON.....	5
1.1. Descripción de las etapas del cultivo de camarón en el Ecuador.....	5
1.1.1. Preparación de piscinas.....	5
1.1.2. Siembra.....	7
1.1.3. Descripción breve del proceso de producción.....	9
1.1.4. Cosecha.....	9
1.1.5. Mantenimiento de piscinas.....	10
1.2. Principales enfermedades que afectan al cultivo de camarón.....	11

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y METODOS	26
-------------------------------	----

2.1. Método para el enriquecimiento del balanceado.....	26
2.1.1 Preparación del probiótico.....	26
2.1.2 Mezcla de balanceado con microorganismos.....	28
2.2. Recolección de datos.....	36
2.2.1. Obtención de información en campo.....	36
2.2.2. Análisis Microbiológico.....	40

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1. Análisis del efecto de la aplicación del probiótico.....	41
3.1.1. Análisis estadístico de las variables.....	41
3.1.2. Otros beneficios.....	54

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
--	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

LPS	Lipopolisacáridos
<i>Vibrios</i>	Agentes patógenos
Organismos que viven en condiciones extremas	
<i>V.cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>V.mimicus</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>V.hispanicus</i>	<i>Vibrio hispanicus</i>
VBNC	Bacterias Viables no Cultivables
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
AL	Alimento Balanceado
PL	Post Larvas de camarón
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
AO	Ácidos Orgánicos
pH	Potencial de Hidrogeno
Nf	Población final
No	Población inicial
B	Biomasa final
Wx	Peso promedio final
ANOVA	Análisis de varianza
T0	Experimento 1
T1	Experimento 2
T2	Experimento 3
T3	Experimento 4

SIMBOLOGÍA

NH_4^+

Amonio

O_2

Oxígeno

NaCl

Cloruro de Sodio

Kg

Kilogramos

g

Gramos

ha

Hectárea

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representación gráfica de las interacciones de <i>vibrios</i> en diferentes compartimentos del ecosistema costero.	14
Figura 3.1	Diagrama de cajas entre los tratamientos (lb/ha).	44
Figura 3.2	Diagrama de cajas de las medidas de supervivencia.	47
Figura 3.3	Diagrama de cajas para el crecimiento de las unidades muestrales.	50
Figura 3.4	Presencia y control de <i>vibrios</i> .	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentración de <i>vibrios</i> aislados desde muestras de Agua de mar y diferentes organismos marinos	15
Tabla 2	Toma de datos del tratamiento 0	30
Tabla 3	Toma de datos del tratamiento 1	31
Tabla 4	Toma de datos del tratamiento 2	32
Tabla 5	Toma de datos del tratamiento 3	33
Tabla 6	Análisis del hepatopáncreas en microscopio	39
Tabla 7	Anova unidireccional: lb/ha vs tratamiento	42
Tabla 8	Análisis usando método de tukey: lb/ha vs tratamiento	43
Tabla 9	Anova unidireccional: Porcentaje de sobrevivencia vs tratamiento	45
Tabla 10	Análisis usando método de tukey: Porcentaje de sobrevivencia vs tratamiento	46
Tabla 11	Anova unidireccional: Talla (g) vs tratamiento	48
Tabla 12	Análisis usando método de Tukey: Talla (g) vs tratamiento	49
Tabla 13	Análisis del agua hecha en laboratorio	51
Tabla 14	Muestra en fresco de camarón en campo	52

INTRODUCCIÓN

En Ecuador el desarrollo de la industria camaronera en la última década ha estado caracterizado por el incremento de producción e intensificación del sistema de cultivo, desde 1998 hasta el año 2000 la producción disminuyó en un 68% por las mortalidades causadas por la “Mancha Blanca”. Desde el 2006 las producciones mejoraron y hasta la actualidad la producción sigue en incremento, pese a que se convive con el virus de la Mancha Blanca y otras especies de patógenos que han atacado y mermado al ratio de producción camaronero y esto ha hecho que los costos de producción se hayan incrementado en la actualidad.

Muchas medidas se han tomado para mitigar las pérdidas económicas con el uso de antibióticos, pero su uso es regulado por sus efectos colaterales perjudiciales (FDA, 1998). Por esto se ha llevado a experimentar con otras alternativas como la utilización de bacterias probióticas e inmunoestimulantes obteniendo buenos resultados.

Ciertos tipos de hemocitos han sido asociados a la encapsulación y melanización y funciones como un sistema de reconocimiento de lo no propio. Los hemocitos remueven partículas extrañas, ej. Bacterias, de la

hemolinfa por fagocitosis (Söderhäll, K.; *et al.*1992). Durante la fagocitosis son producidas especies reactivas del oxígeno. Este fenómeno conocido como explosión respiratoria, juega un papel importante en la actividad microbicida (Song, Y; *et al.* 1997).

Como tratamiento alternativo, existen componentes biológicos, jugando el papel de moléculas de alarma que activan el sistema inmune del animal. El sistema responde a un estimulante como a una agresión microbiana. La mayoría de las moléculas son fragmentos de la pared celular de microorganismos que hacen a los animales más resistentes a infecciones microbianas.

Muchos componentes activos son extraídos de paredes celulares bacterianas: fragmentos de péptidos, lipopolisacáridos (LPS), lipopéptidos, aciloligopéptidos, entre otros. En la pared celular de levaduras hay principalmente β -glucanos que son los componentes responsables para esta reacción microbicida de los hemocitos (células blancas).

La aplicación por vía oral es el mejor método aplicable para el sistema de producción del cultivo del camarón. El aditivo puede ser fácilmente incorporado en el alimento. Esta forma de tratamiento no tiene ninguna implicación en prácticas industriales de crianza.

En una escala experimental, se han analizado que las sustancias que refuerzan la defensa del camarón y adicionalmente mantienen un sistema equilibrado es el uso de organismos que regulan la materia orgánica que se encuentra en exceso durante la etapa inicial de crianza, el cual es un consumidor de oxígeno O_2 , aumenta la producción de amonio (NH_4^+) y sulfuros. El número de hemocitos se incrementa significativamente con β -glucano como aditivo del inmunoestimulante (Le Moullac, G.; *et al.* 1998), la actividad fagocítica aumenta con β -glucano y péptidoglucano.

Los resultados favorables y amigables con el medio ambiente han sido obtenidos con el uso de ácidos orgánicos el cual está mejorando el estado de salud de los camarones y la resistencia al ataque de patógenos. La respuesta inmune puede ser estimulada con la adición de inmunoestimulantes en la dieta (Rodríguez, J.; *et al.* 2000). También por el uso de antioxidantes naturales como las vitaminas C y E, mejora el estado de salud en los camarones (Molina, C.; *et al.* 2002).

La sustentabilidad del cultivo del camarón depende de la prevención y el control de enfermedades, por ello toda mejora en el sistema inmune constituye un factor importante (Rodríguez, J.; *et al.* 2000).

En este estudio con el uso y aplicación de probióticos y ácidos orgánicos al alimento balanceado se pretende medir la capacidad estimuladora y de resistencia a ataques de enfermedades por medio de la sobrevivencia final en el rendimiento del cultivo de camarón.

CAPÍTULO 1

1. CULTIVO DE CAMARÓN

1.1. Descripción de las etapas del cultivo del camarón en el Ecuador

1.1.1. Preparación de piscinas

Las piscinas están conformadas por la mesa que es la parte central que tiene menor profundidad y el préstamo que es la parte más profunda localizada a los bordes de la piscina. Poseen una compuerta de entrada de agua, una compuerta de salida de agua y una compuerta más pequeña que es la de reboce.

El primer paso es secar completamente la piscina dejándola descansar cerca de 12 días, hasta que la tierra esté cuarteada (en caso de verano), ya que el mejor desinfectante es el sol. Antes de

ser llenada nuevamente, el suelo de las piscinas se tratan con carbonato de calcio y zeolita, para que actúen como desinfectantes.

Después de esto se llena parcialmente la piscina aproximadamente 10 cm de agua por un día y se le agrega productos para inhibir el crecimiento de larvas de pescado, el producto más comúnmente usado es el barbasco. Se la vacía completamente la piscina y se hace un lavado que consiste en dejar ingresar y salir agua por aproximadamente 4-6 horas para eliminar cualquier remanente de barbasco.

Se procede a llenarla con aproximadamente 30 cm de agua. Se fertiliza con abonos inorgánicos, como la urea, nitrógeno, fósforo y silicato. Esto permite el florecimiento de algas y microorganismos que son el alimento natural y primario de las larvas. Se espera 7 días antes de poder sembrar los animales.

1.1.2. Siembra

Se selecciona las post larvas de camarón en alguno de los diferentes laboratorios localizados a lo largo de la costa ecuatoriana. Luego se transporta los animales desde los laboratorios a la finca camaronera en el estadio que se desee sembrar, para estos experimentos se decidió sembrar 450 PL/gr.

Existe 2 tipos de siembra: la que llega primero a precriaderos y la otra es la siembra directa a la piscina de engorde.

a) Pre criaderos: La densidad a la cual se colocan los animales varía de acuerdo al criterio del técnico, historial de la piscina y/o capacidad de carga, que es básicamente la cantidad máxima de post larvas de camarón que se pueda trabajar una piscina con mayor rendimiento pero para llegar a este valor debe haber un análisis estadístico previo para establecerlo.

En Ecuador en granjas de *Litopeneus vannamei* sp. se estabulan entre 10 y 25 animales/m². En las camaroneras del sector de Tenguel 100 camarones/m² es el promedio de siembra.

Los animales permanecen en los precriaderos entre 15 y 20 días, hasta alcanzar pesos que varían entre 0.5 y 2 g. Luego de esto son pasados a las piscinas de engorde.

b) Criaderos o piscinas de engorde: En estos estanques los animales son llevados hasta talla comercial que se encuentra a partir de los 10 gramos. Dependerá del camaronero hasta que talla quiere llevar el animal.

Los criaderos generalmente tienen una superficie entre 5 y 20 hectáreas, pero los de menor tamaño (5 – 9 ha) son más prácticos, ya que en ellos, se puede ejercer un mayor control sobre los camarones en cría, esto permite aumentar la densidad de siembra de animales por ha.

Las piscinas que se fertilizan, se agregan algún tipo de balanceado y se hace recambio de agua se pueden colocar hasta 10 - 15 camarones por metro cuadrado. Si se trabaja en piscinas donde se usa algún tipo de aireación, fertilización y alimento balanceado se puede sembrar densidades de 15 - 20 animales/m².

1.1.3. Descripción breve del proceso de producción

Los camarones son animales invertebrados pertenecientes al grupo de los crustáceos, crecen por medio de mudas sucesivas a lo largo de su ciclo de vida y presentan metamorfosis durante su primera fase de vida llamada fase larval.

Se crían o se engordan en piscinas de por lo menos uno a cuatro metros la parte mas profunda de algunas piscinas. Las camaroneras suelen estar localizadas cerca de la costa para asegurar una fuente cercana de agua.

El proceso de engorde comprende el crecimiento del camarón hasta llegar al tamaño comercial que es a partir de los 10 gramos. El promedio es de 12 – 17 gramos que es alcanzado en 95 a 120 días a partir de la siembra; llevando los animales a estas tallas se pueden realizar 3 a 3.5 ciclos por año, dependiendo de las condiciones de la piscina.

1.1.4. Cosecha

La cosecha consiste en bajar paulatinamente el nivel de agua de los estanques hasta tener una columna de agua de aproximadamente 60 cm, para luego utilizar redes en forma de túnel o bolso para

capturar los camarones localizados en la compuerta de pesca de las piscinas.

Se debe tener cuidado de bajar el nivel de agua lentamente para evitar corrientes fuertes que puedan aplastar a los camarones cuando se encuentran en la red ya que esto conlleva a una pérdida de calidad porque se les afloja la cabeza al camarón y esta se torna con un ligero color oscuro.

La cosecha se deber realizar entre el atardecer y las primeras horas de la mañana a bajas temperaturas y tener hielo a disposición.

Se cosecha dependiendo de las condiciones que este el animal, el gramaje que sea comercial y la hora en que este bajando la marea para poder evacuar el agua de la piscina.

1.1.5. Mantenimiento de piscinas

Las piscinas se realizan mantenimientos según la condiciones presentes ya sea físicas (temperatura, pH, oxígeno) o químicas (nitritos, amonios, sulfuros), estos factores son los que deben ser controlados durante la etapa inicial de producción y pueden ser

manejados con carbonatos, hidróxidos de calcio, zeolita, bacterias (nitrificantes, levaduras y ácido lácticas). Se debe revisar las compuertas de salida y entrada de agua de las piscinas camaroneras para hacerle algún tipo de reparación de ser necesario.

En el caso de que el suelo de la piscina este deteriorado con suelos negros o demasiada sedimentación de materia orgánica es necesario retirarlos utilizando maquinaria pesada ya sea con el uso de retroexcavadora y/o tractores.

1.2 Principales Enfermedades que Afectan el Cultivo de Camarón

Los *vibrios* fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente en la naturaleza (Pacini, F. 1854); se clasifican en la familia *Vibrionaceae* abarcando diversos grupos de bacterias bacilares marinas heterótrofas; son gama proteo bacterias, Gram negativa, oxidasa positivos, mesófilos, generalmente móviles por medio de un simple flagelo polar (Thompson, J.; *et al.* 2004). Toleran un amplio rango de salinidades, el óptimo requerimiento de NaCl es de ~ 2,0 a 2,5% (peso/volumen), algunas especies (halófilas) requieren al menos

una concentración del 0,5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus* o *Vibrio hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Gómez-Gil, B.; *et al.* 2004). La presencia de altas concentraciones de nutrientes orgánicos o cationes divalentes pueden compensar la falta de Na⁺. Naturalmente habitan ambientes marinos y de agua dulce en formas de vida planctónica en la columna de agua bentónica desarrollando biopelículas en sedimentos, zooplancton (Heidelberg, J.; *et al.* 2002) y en el tracto gastrointestinal de organismos marinos. Diversos estudios han demostrado que los *vibrios* se encuentran en altas densidades en el ecosistema marino (Figura 1.1) y han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos. La distribución y dinámica de estas poblaciones están influenciadas por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos como, depredación y abundancia de dinoflagelados y hospedadores (Thompson, J.; *et al.* 2006). Al respecto, diversos estudios estuarinos y costeros de diferentes partes del mundo han demostrado que la temperatura y salinidad juegan funciones importantes en la ocurrencia del *V. Cholerae*. En general, los *vibrios* tienden a ser más comunes en aguas cálidas, en

particular cuando las temperaturas exceden 17°C (Thompson, J.; *et al.* 2004), no obstante, Urakawa Hidetoshi y Rivera Irma (2006) postulan que en aguas tropicales y subtropicales la variación de poblaciones de *vibrios* es baja. Poco es el conocimiento que se tiene sobre la distribución, abundancia, supervivencia y función ecológica de especies de *vibrios* en el sedimento marino (Urakawa, H. & I Rivera. 2006). Se ha sugerido que la ocurrencia estacional de vibrios mesófilos como *Vibrio parahaemolyticus* y *V. coralliilyticus* se puede deber a una hibernación en sedimentos o en asociación con la fauna marina (Ben-Haim, Y.; *et al.* 2003), por lo que no es sorprendente que estas bacterias posean un gran repertorio de proteínas con enorme especificidad de sustratos, los cuales le permiten realizar diferentes funciones catabólicas para responder eficientemente a los constantes cambios en los ecosistemas (Connell, T; *et al.* 1998). El tracto digestivo de organismos marinos posee mayor disponibilidad de materia orgánica que el agua de mar, transformándose en un ambiente apropiado para *vibrios*, aunque en este micro ambiente están expuestos a un pH bajo, secreción de ácido bilico y a condiciones micro o anaeróbicas (Urakawa, H.; *et al.* 2006). Lo anterior permite el desarrollo de biopelículas las cuales son comunidades microbianas que forman una matriz con sustancias extracelulares producidas por ellas; esta

TABLA 1.
CONCENTRACIÓN DE *VIBRIO* AISLADOS DESDE
MUESTRAS DE AGUA DE MAR Y DIFERENTES
ORGANISMOS MARINOS

Nº	Agua / Organismo	Especie de <i>Vibrio</i>	Concentración y referencia
1	Agua de mar	<i>Vibrio</i> spp.	10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>Vibrio</i> spp.	1x10 ² – 7x10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>Vibrio</i> spp.	9,7x10 ⁵ cél. mL ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2000)
		<i>V. vulnificus</i>	10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>V. cholerae</i>	10 ⁴ cél. L ⁻¹ (Eilers <i>et al.</i> 2006)
		<i>V. splendidus</i>	10 ² CFU mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>V. harveyi</i>	26 a 58 CFU mL ⁻¹ (Makemson <i>et al.</i> 1992)
		<i>V. harveyi</i>	5 a 7 CFU mL ⁻¹ (Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> 1990)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	4 cél. 100 mL ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> 1990)
		<i>Vibrio</i> spp.	10 ² cél. mL ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
2	Agua de mar (16°C)	<i>V. rotiferianus</i>	1,7x10 ⁵ CFU mL ⁻¹ (Suantika 2001)
	Agua de mar (cultivo peces)		
	Agua de mar (cultivo rotíferos)		
	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Vibrio</i> spp.	3,2 x 10 ² y 1,9 x 10 ³ CFU mL ⁻¹ (Estes <i>et al.</i> 2004)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	8,4x10 ⁵ – 3,4x10 ⁷ CFU g ⁻¹ (Calik <i>et al.</i> 2002)
	Ostras	<i>V. splendidus</i>	10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Pujalte <i>et al.</i> 1999)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (Kaysner & DePaola 2000)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (DePaola <i>et al.</i> 2000)
	Ostión	<i>V. vulnificus</i>	10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Cai <i>et al.</i> 2007)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	10 ⁴ CFU g ⁻¹ (Colwell 1996)
3	<i>Turbo cornutus</i>	<i>V. halioticoli</i>	1,7x10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2003)
	<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	3,5x10 ⁵ CFU mL ⁻¹ (Cai <i>et al.</i> 2007)
	<i>Haliotis discus</i> (digestivo)	<i>V. halioticoli</i>	2,6 x10 ⁶ a 9,9 x10 ⁸ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 1995)
	<i>Haliotis midae</i> (digestivo)	<i>V. halioticoli</i>	3,7 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
	<i>Haliotis tuberculata</i>	<i>V. gallicus</i>	3,0 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
	<i>Haliotis laevigata</i> (digestivo)	<i>Vibrio</i> spp	9,4 x10 ⁶ CFU g ⁻¹ (Sawabe <i>et al.</i> 2006)
4	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Vibrio</i> spp	10 ⁵ y 10 ⁴ CFU g ⁻¹ (Gomez-Gil <i>et al.</i> 1998)
		<i>Vibrio</i> spp	10 ⁹ CFU g ⁻¹ (Moss <i>et al.</i> 2000)
	<i>Penaeus merguensis</i>	<i>V. logei</i>	10 ⁴ y 10 ⁵ CFU g ⁻¹ (Oxley <i>et al.</i> 2002)
	<i>Penaeus monodon</i>	<i>A. pelagius</i>	10 ⁴ CFU mL ⁻¹ (Aguirre-Guzman <i>et al.</i> 2003)
	<i>Penaeus monodon</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	1x10 ⁵ CFU peneido ⁻¹ (Sudheesh & Xu 2001)
5	<i>Anguilla japonica</i>	<i>V. vulnificus</i>	9,4x10 ³ a 2,3x10 ⁵ CFU anguila ⁻¹ (Tison <i>et al.</i> 1982)
	<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>V. cholerae</i>	1,26x10 ⁴ y 1,26x10 ² cél. mL ⁻¹ (Yamanoi <i>et al.</i> 1980)
6	<i>Sepiolla</i> sp.	<i>Vibrio</i> spp.	10 ¹¹ cél. órgano ⁻¹ (Nishiguchi 2000)
7	<i>Oculina patagonica</i>	<i>V. shiloi</i>	10 ⁸ a 10 ⁹ cél. (cm ³) ⁻¹ (Rosenberg & Koren 2006)
8	Zooplankton	<i>Vibrio</i> spp.	4,3x10 ⁶ cél. (mm ²) ⁻¹ (Heidelberg <i>et al.</i> 2002)
9	Sedimento	<i>Vibrio</i> spp.	3,0 x10 ³ CFU g ⁻¹ (Maeda <i>et al.</i> 2003)
		<i>V. harveyi</i>	10 ³ CFU g ⁻¹ (Ramesh <i>et al.</i> 1989)

(Leyton & Riquelme, C., 2008)

Las especies de *vibrios* varían considerablemente en patogenicidad y aún están indefinidas las causas de su aparición y epidemiología. Esto es relevante debido a que ocasionan numerosos episodios patológicos, casos de mortalidad y grandes pérdidas económicas y alteraciones sociales en la población dedicada a industrias extractivas y procesadoras de productos del mar.

Los *vibrios* en la naturaleza pueden estar en un estado inactivo o no ser capaces de crecer en los medios selectivos empleados, no obstante, se ha evidenciado que las bacterias en estado de viables no cultivables (VBNC) pueden también causar enfermedades. Eugene Rosenberg y Yael Ben-Haim (2002) postulan que se observan diferencias entre las bacterias VBNC y las bacterias viables cultivables como reducción del tamaño de la célula, aumento del grosor de la pared celular, disminución de la cantidad de RNA, DNA y formación de biopelículas.

Por otro lado, aunque la costa difiere significativamente del océano abierto con respecto a los rangos de producción primaria e influencia terrestre, la secuencia del 16S rRNA de *vibrios* aislados desde el océano abierto son filogenéticamente similares a las secuencias de medio ambientes costeros (Radjasa, O.; *et al.* 2001).

A pesar de esto los *vibrios* son el grupo mayormente cultivable de bacterias heterótrofas, especialmente de aguas costeras y la proporción de recuento total en placas varía de acuerdo a los métodos de muestreo, áreas geográficas, estacionalidad y medios de cultivos diferenciales.

Actualmente se están desarrollando nuevos métodos para identificar la patogenicidad, ecología y distribución de *vibrios*, además, de evaluar aquellas especies que evaden los métodos convencionales de cultivo.

En el ecosistema marino los *vibrios* juegan funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes, sin embargo pueden actuar como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, o bien afectar al hombre (Thompson, J.; *et al.* 2004).

Existe una gran diversidad de *vibrios* reconociéndose casi 74 especies descritas dentro de este grupo (Thompson, J.; *et al.* 2004), algunas de las cuales se ha elucidado su función ecológica en la naturaleza.

De acuerdo al manual de Bergey, la familia *Vibrionaceae* comprende 8 géneros: *Vibrio* (65 especies), *Allomonas* (1 especie), *Catenococcus* (1 especie), *Enterovibrio* (2 especies), *Grimontia* (1 especie), *Listonella* (2 especies), *Photobacterium* (8 especies) y *Salinivibrio* (1 especie). Urbanczyk H. *et al.* (2007) proponen un noveno género en el que reclasifican a las especies, *Vibrio fischeri*, *V. logei*, *V. salmonicida* y *V. wodanis*, las cuales estaban estrechamente relacionadas formando un clado dentro de la familia *Vibrionaceae*. Los autores indican que las cuatro especies representan un linaje dentro de *Vibrionaceae* que es distinta de otros géneros. *Aliivibrio* se compone de cuatro especies: *Aliivibrio fischeri* comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. y *Aliivibrio wodanis* comb. nov. Thompson J. *et al.* (2004) proponen tres nuevas familias además de *Vibrionaceae* basándose en el 16S rRNA, de la secuencia de los genes *recA* y *rpoA* y datos fenotípicos, estos son: *Enterovibrionaceae* (comprendido por los géneros *Enterovibrio* y *Grimontia*), *Photobacteriaceae* (comprendido por el género *Photobacterium*) y *Salinivibrionaceae* (comprendido por el género *Salinivibrio*).

El propósito de considerar sólo al género *Vibrio* dentro de la familia *Vibrionaceae* debe a diferentes análisis genotípicos y moleculares que muestran a *vibrios* como altamente heterogéneos (Thompson, F.; *et al.* 2005).

Es importante estudiar a los *vibrios* que actúan de forma deletérea sobre organismos de importancia comercial, debido a las consecuencias económicas que este produce y descubrir los factores que ocasionan este accionar es aún una tarea pendiente. El objetivo de esta revisión es resumir la información disponible sobre *vibrios* y su interacción con diferentes componentes de la cadena trófica marina.

Etapas donde la producción de camarón es más susceptible a presencia de patógenos.

El desarrollo de enfermedades es el resultado de la interacción entre patógeno, hospedador y medio ambiente. La infección por *vibrio* es uno de los problemas significativos que tienen los cultivos comerciales de peces e invertebrados marinos debido a las mortalidades ocasionadas por los episodios pandémicos,

provocando alteraciones sociales en el sector industrial de extracción y procesamiento de recursos marinos, pérdidas en las capturas, con las consecuentes pérdidas económicas.

La alta densidad de organismos y nutrientes son característicos en sistemas de acuicultura lo cual facilita la proliferación de *vibrios*; se ha hipotetizado que las condiciones artificiales del medioambiente en sistemas de cultivo pueden constituirse como reservorio para *vibrios* patógenos. Actualmente, algunos estudios se han enfocado en la relación de la microbiota de aguas contaminadas por bacterias patógenas y sus efectos negativos en organismos de importancia comercial (Urakawa, H.; *et al.* 2006). Varios casos de *vibriosis* que afectan a bivalvos se han descrito en la literatura.

Por ejemplo, se ha reportado que *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. splendidus* son responsables de ocasionar la muerte de larvas de ostión, debido a un estado de estrés del hospedero que da lugar a una respuesta neuroendocrina que incrementa los niveles de noradrenalina induciendo la liberación de hierro, elemento importante para la reproducción de los *vibrios* (Platt, M.; *et al.* 1995). En otros bivalvos como almejas, *Vibrio tapetis* se ha descrito como la bacteria marina responsable de la enfermedad del anillo marrón que afecta a *Ruditapes philippinarum*;

en esta enfermedad las bacterias proliferan rápidamente en los tejidos blandos, provocando graves daños y la posterior muerte. Al respecto, Flye-Sainte Marie *et al.* (2007) muestran que almejas gravemente enfermas están sujetas a pérdida de peso en comparación con las no infectadas, lo que indica que BRD induce a un desequilibrio en el balance energético, disminución en la adquisición de energía y frecuencia respiratoria. El método SSP-PCR ha dado lugar a la detección de *V. tapetis* en larvas de almejas enfermas y en reproductores asintomáticos de almejas que más tarde desarrollarán BRD.

En el cultivo comercial de larvas de almejas *R. decussatus* durante los años 2001 y 2002, en España se observaron dos episodios de mortalidad (62 y 73%), asociados con infecciones bacterianas de *V. alginolyticus* (en los dos episodios) y *V. splendidus* con *V. alginolyticus* (segundo episodio) causando lesiones histológicas similares que afectaron principalmente el manto, el velo, y el tejido conectivo de los organismos infectados.

Según los autores es la primera vez que estas especies bacterianas se han asociado a mortalidades de larvas y juveniles de esta almeja (Gómez-León, J.; *et al.* 2005).

Las cepas de *V. harveyi* también se asociaron a mortalidades de abalón *Haliotis tuberculata* observado en la costa oeste de Francia desde 1997 (Nicolas, J.; *et al.* 2002). Otro *vibrio* reportado como patógeno en postlarvas de abalón *H. diversicolor supertexta* es el *Vibrio parahaemolyticus*. Una enfermedad que afecta a los corales, causada por *vibrios*, es el de blanqueamiento de corales que se debe a la interrupción de la simbiosis entre el coral y el dinoflagelado *Zooxanthellae*, la cual se le ha atribuido a los patógenos *Vibrio shilonii* (también conocido como *V. mediterranei*), *V. coralliilyticus* (Ben-Haim, Y.; *et al.* 2002) y *V. shiloi* (Kushmaro, A.; *et al.* 2001).

En peces, un grupo relativamente pequeño de bacterias marinas es responsable de importantes pérdidas económicas en los cultivos de todo el mundo (Toranzo, A.; *et al.* 2005). Los patógenos principales son *V. splendidus*, *Listonella (Vibrio) anguillarum*, *V.*

ordalii, *Aliivibrio salmonicida* (anteriormente *V. salmonicida*, (Thompson, F.; *et al.* 2006) y *V. vulnificus* biotipo 2 (Toranzo, A.; *et al.* 2005). *L. anguillarum* y *V. ordalii* causan septicemia hemorrágica en peces. *A. salmonicida* causa anemias y hemorragia extensa especialmente en órganos internos (Toranzo, A.; *et al.* 2005). Según estudios bacteriológicos, en el salmón del atlántico, las úlceras en la piel u órganos internos (Bruno, D.; *et al.* 1998) se deben a *Vibrio viscosus* el cual podría ser reclasificado como *M. viscosa*. Igualmente, *Aliivibrio wodanis* anteriormente *V. wodanis* (Thompson, F.; *et al.* 2006), estrechamente relacionado con *V. logei* se ha aislado de úlceras de peces en Noruega, Islandia y Escocia.

Un examen bacteriológico realizado a cultivos de *Sparus aurata*, en España, entre 1997 y 2000, detectó 25 brotes, cuyo grupo dominante fueron *vibrios* con un 69%. *Vibrio harveyi* es responsable de enfermedades infecciosas en algunos peces como lenguado, tiburón amarillo (Austin, B.; *et al.* 2006) y también en camarones (Austin, B.; *et al.* 2006).

Lavilla-Pitogo Celia, *et al.* (1998) relacionaron masivas pérdidas en cultivos de camarón en Filipinas debido a la presencia de *vibrios*,

reportando mortalidades del 60% entre 1992 y 1994. Los copépodos, rotíferos y artemias son usados como importantes fuentes nutricionales para el cultivo de muchos organismos acuáticos y existen antecedentes de la asociación de estos organismos con *vibrios*. Por ejemplo, los *vibrios* tienen una relación de simbiosis con organismos quitinosos, como los copépodos y numerosos estudios han correlacionado la concentración de copépodos con el número de *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* en el agua de mar (Lipp, E.; *et al.* 2003). Tamplin Mark *et al.* (1990) postulan que los *vibrios* utilizan la quitina como sustrato y el saco ovígero de los copépodos como un vehículo para la diseminación cuando el copépodo libera los huevos fertilizados al ambiente.

También existen antecedentes de la asociación de *vibrios* y diferentes especies de rotíferos como *Vibrio rotiferianus*, aislado como bacteria dominante desde cultivos de rotíferos *Brachionus plicatilis* (Gómez-Gil, Bruno; *et al.* 2003). Por otro lado, *Vibrio hispanicus* (Gómez-Gil, Bruno; *et al.* 2004) y *V. alginolyticus* fueron aislados desde *Artemia* sp. (Snoussi, Mejdí; *et al.* 2006). La asociación de *vibrios* patógenos con estos organismos puede tener como consecuencia la transmisión de estas bacterias a larvas que

son alimentadas con estos organismos. Las especies de *vibrios* patógenos para humanos en la actualidad esta limitada sólo a 12 que son clínicamente significativas *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *Grimontia (Vibrio) hollisae*, *V. fluviales*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium (Vibrio) damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* y *V. harveyi* (Nishibuchi, M. 2006).

Las infecciones causadas por estos organismos están usualmente asociadas a la ingestión de moluscos contaminados; los síntomas que manifiesta el paciente van desde gastroenteritis, infección a la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos o con bajas defensas.

En el siguiente capítulo se explicará cómo se prepara el probiótico, así como la forma en la que se lo mezclará con el balanceado con el cual van a ser alimentadas las piscinas de engorde.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Método para el enriquecimiento del balanceado

2.1.1. Preparación del probiótico

Diversos autores han propuesto el uso de la implementación de tecnologías limpias a través del uso de probióticos en la acuicultura, los cuales han sido definidos como microorganismos con efectos benéficos sobre el hospedero por la modificación del ambiente huésped-hospedero o la modificación de su comunidad microbiana, por la mejora en la asimilación de alimento o de su valor nutricional, por mejoramiento de la respuesta del hospedero ante enfermedades o por la mejora en la calidad de su medio ambiente” (Verschuere, L.; et al. 2000).

Estos consorcios microbianos también han sido denominados como microorganismos eficientes. Diferentes investigaciones han demostrado que los microorganismos benéficos pueden: 1) incrementar el valor nutricional; 2) aumentar la supervivencia y disminuir enfermedades mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas; 3) mantener y mejorar la calidad del agua con la reducción de concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el agua y 4) disminuir la carga elevada de materia orgánica.

En contraste, existen estudios que han reportado efectos nulos o negativos con el uso de probióticos, como infecciones cutáneas o aumento en la mortalidad con lo cual se ha evidenciado que el uso de los probióticos no siempre son benéficos, debido a que dependen de diversos factores como son: las especies de cultivo, los sistemas de producción, la escala de cultivo (laboratorio y granjas), la densidad de siembra, utilización de microorganismos provenientes de otros ambientes y la dosis de los microorganismos (Verschuere, L.; et al. 2000)

La preparación de los microorganismos es la siguiente:

Se utiliza 500 litros de agua de pozo, se mezcla 2 litros de bacteria comercial con un saco de 30 kilos de melaza, se deja fermentar por

72 horas. Esta bacteria activada está lista para ser utilizada. Para los tratamientos se usó 2 litros de bacteria activada por saco de alimento.

2.1.2. Mezcla de balanceado con microorganismos

Se hicieron 4 experimentos T0, T1, T2 y T3 siendo T0 la prueba de control. A todas las piscinas se las preparo de la misma manera controlando la temperatura, pH y el oxígeno disuelto en la piscina al sembrar las post larvas de camarón.

Los experimentos tuvieron una duración de 8 semanas, se usó balanceado al 35% de proteína. Los animales se alimentaron a razón de 5% del peso corporal, 2 veces al día (09:00 y 15:30 h). Se controló el peso, talla y porcentaje de sobrevivencia cada 7 días. El balanceado se lo enriqueció de diferentes maneras que serán detalladas a continuación:

Experimento 1 prueba de control: Este bioensayo se denominará T0. Sirve como testigo para comparar nuestros demás experimentos. (Tabla 2)

Experimento 2: Este bioensayo se denomina T1. Al balanceado se le agrega microorganismos (*Lactobacillus ssp.*) La concentración de microorganismos es 1×10^5 UFC/gr. (Tabla 3).

Experimento 3: Este bioensayo se denomina T2. Al balanceado se le agrega microorganismos (*Lactobacillus ssp.*) y ácidos orgánicos. La concentración de microorganismos es 1×10^5 UFC/gr y los Ácidos orgánicos son Ac. Propionico, Ac. Cítrico y Ac. Fórmico. (Tabla 4).

Experimento 4: Este bioensayo se denomina T3. Al balanceado se le agrega ácidos orgánicos son Ac. Propionico, Ac. Cítrico y Ac. Fórmico. (Tabla 5).

TABLA 2.
TOMA DE DATOS DEL TRATAMIENTO 0 (T0)

CORRIDA	SEMANA	PRUEBA T0		
		PESO POR ha (lb/ha)	SOBREVIVENCIA (%)	TALLA (g)
1	0	0.378	100%	0.002
	1	39	92%	0.25
	2	214	90%	1.40
	3	367	87%	2.48
	4	448	85%	3.10
	5	544	80%	4.00
	6	564	78%	4.25
	7	646	76%	5.00
	8	493	50%	5.80
2	0	0.41	100%	0.002
	1	17	91%	0.10
	2	29	87%	0.18
	3	39	85%	0.25
	4	89	80%	0.60
	5	206	74%	1.50
	6	325	70%	2.50
	7	407	66%	3.32
	8	462	53%	4.70
3	0	0.28	100%	0.002
	1	16	92%	0.14
	2	22	89%	0.2
	3	96	85%	0.9
	4	146	83%	1.4
	5	272	79%	2.75
	6	351	75%	3.73
	7	426	70%	4.85
	8	390	55%	5.65
4	0	0.30	100%	0.002
	1	13	94%	0.10
	2	22	90%	0.18
	3	30	88%	0.25
	4	52	85%	0.45
	5	370	79%	3.45
	6	431	75%	4.23
	7	452	63%	5.28
	8	486	56%	6.39
(Baidal, J. 2015)				

TABLA 3.
TOMA DE DATOS DEL TRATAMIENTO 1 (T1)

CORRIDA	SEMANA	PRUEBA T1		
		PESO POR ha (lb/ha)	SOBREVIVENCIA (%)	TALLA (g)
1	0	6.50	100%	0.035
	1	43	92%	0.250
	2	125	90%	0.750
	3	142	87%	0.880
	4	158	85%	1.000
	5	186	80%	1.250
	6	181	78%	1.250
	7	326	76%	2.310
	8	671	62%	5.830
2	0	6.25	100%	0.035
	1	17	93%	0.100
	2	41	91%	0.250
	3	77	86%	0.500
	4	104	83%	0.700
	5	217	80%	1.520
	6	347	77%	2.520
	7	502	70%	4.010
	8	558	60%	5.200
3	0	6.34	100%	0.035
	1	33	92%	0.200
	2	56	88%	0.350
	3	125	85%	0.810
	4	246	80%	1.700
	5	349	77%	2.500
	6	543	74%	4.050
	7	718	70%	5.660
	8	737	66%	6.160
4	0	6.39	100%	0.035
	1	74	90%	0.450
	2	79	86%	0.500
	3	152	83%	1.000
	4	292	80%	2.000
	5	563	77%	4.000
	6	579	73%	4.340
	7	674	71%	5.200
	8	703	65%	5.920

(Baidal, J. 2015)

TABLA 4.
TOMA DE DATOS DEL TRATAMIENTO 2 (T2)

CORRIDA	SEMANA	PRUEBA T2		
		PESO POR ha (lb/ha)	SOBREVIVENCIA (%)	TALLA (g)
1	0	0.46	100%	0.002
	1	47.15	92%	0.25
	2	138.38	90%	0.75
	3	173.33	89%	0.95
	4	196.19	87%	1.1
	5	252.67	85%	1.45
	6	283.72	80%	1.73
	7	474.91	78%	2.97
	8	934.81	76%	6
2	0	0.42	100%	0.002
	1	17.38	92%	0.10
	2	28.90	90%	0.17
	3	128.46	85%	0.80
	4	166.24	88%	1.00
	5	198.35	84%	1.25
	6	344.28	81%	2.25
	7	515.71	78%	3.50
	8	779.24	75%	5.50
3	0	0.40	100%	0.002
	1	33.84	94%	0.20
	2	57.33	91%	0.35
	3	262.72	89%	1.64
	4	436.89	87%	2.79
	5	566.20	83%	3.79
	6	705.57	80%	4.90
	7	807.08	76%	5.90
	8	880.34	73%	6.70
4	0	0.40	100%	0.002
	1	6.85	94%	0.04
	2	150.88	92%	0.90
	3	227.05	89%	1.40
	4	342.44	87%	2.16
	5	523.31	83%	3.46
	6	675.16	79%	4.69
	7	798.14	75%	5.84
	8	880.15	70%	6.90
(Baidal, J.2015)				

TABLA 5.
TOMA DE DATOS DEL TRATAMIENTO 3 (T3)

CORRIDA	SEMANA	PRUEBA T3		
		PESO POR ha (lb/ha)	SOBREVIVENCIA (%)	TALLA (g)
1	0	0.38	100%	0.002
	1	38.42	90%	0.25
	2	37.99	89%	0.25
	3	51.99	87%	0.35
	4	93.23	84%	0.65
	5	102.45	80%	0.75
	6	139.84	78%	1.05
	7	173.89	76%	1.34
	8	568.59	74%	4.5
2	0	0.46	100%	0.002
	1	28.60	93%	0.15
	2	72.16	88%	0.40
	3	285.36	87%	1.60
	4	285.36	80%	1.74
	5	442.13	79%	2.73
	6	607.63	78%	3.80
	7	779.01	76%	5.00
	8	790.37	74%	5.21
3	0	0.39	100%	0.002
	1	80.64	92%	0.50
	2	127.75	89%	0.89
	3	230.60	85%	1.89
	4	360.17	82%	3.60
	5	312.15	78%	4.00
	6	298.49	75%	5.10
	7	234.34	70%	5.72
	8	183.54	64%	7.00
4	0	0.40	100%	0.002
	1	78.73	91%	0.48
	2	207.63	90%	1.28
	3	260.29	87%	1.66
	4	379.93	85%	2.48
	5	537.24	81%	3.68
	6	636.95	76%	4.65
	7	673.64	73%	5.12
	8	804.92	70%	6.38
(Baidal, J. 2015)				

La necesidad de reconocer que el éxito nutricional y económico de un balanceado no depende solamente de su formulación, contenido de nutrientes, características físicas y organolépticas, sino también de otros factores tales como manejo en granja del alimento y prácticas de manejo del agua, incluyendo almacenamiento del alimento, método de alimentación, tasa de alimentación, calidad del agua, manejo del agua, substrato del estanque, densidad de siembra del camarón, y disponibilidad natural del alimento. Contrario a los sistemas de producción de peces, los hábitos alimenticios únicos del camarón obligan a que el alimento permanezca en el agua por periodos de tiempo considerables antes de empezar a ser consumidos (en algunas ocasiones es de horas), y más frecuentemente cuando se alimenta en sistemas de cultivo de agua verde/turbia en donde no es posible observar el comportamiento alimenticio de los organismos cultivados.

Por lo tanto, el éxito económico y biológico de un alimento balanceado dependerá en gran medida del desarrollo y uso de alimentos y técnicas de manejo de agua apropiados para los hábitos alimenticios de la especie y sistemas de producción establecidos

Por ejemplo, existen aspectos que requieren de una particular atención y posterior mejoramiento como son el manejo en granja del alimento y el manejo del agua, que incluyen: 1) transporte y almacenamiento en granja del alimento, 2) criterios de selección para determinar la tasa de alimentación (cuantitativa) y la selección del método de aplicación, 3) frecuencia, regulación y monitoreo de la aplicación de alimento, 4) calidad del agua, incluyendo oxígeno disuelto y técnicas de oxigenación, 5) selección del sustrato del tanque/estanque y patrón de circulación e intercambio de agua, 6) comportamiento alimenticio del camarón y características en respuesta a diferentes densidades de siembra, sustratos de tanques/estanques, fotoperiodo/iluminación, unidad de producción del cultivo (ej. tanques, estanques o jaulas), y disponibilidad natural de alimento.

En base a los parámetros que se debe tener en cuenta dentro de las unidades muestrales se determina la cantidad de uso de microorganismo a aplicar en el balanceado que en nuestro caso fue de 2 litros por cada saco de 40 kilos de alimento.

Sin embargo, como en el uso de invertebrados como alimento, existe el riesgo de introducción y transmisión de enfermedades por

el empleo de animales silvestres contaminados con patógenos. Aparte de la obvia necesidad de cultivar y mantener lotes de camarones “libres de patógenos específicos” o “altamente saludables” y de contar con centros de acopio para la producción y distribución de reproductores y larvas libres de enfermedades para los camaronicultores (Pruder, G. 1994), también es necesario que técnicas apropiadas de proceso y manufactura sean desarrolladas para la producción de alimentos artificiales, económicos y efectivos, para larvas y reproductores, incluyendo técnicas mejoradas como la microencapsulación, micro-ligados o producción de hojuelas para el caso de alimento para larvas y el mejoramiento en las técnicas de peletización/ extrusión para el caso de alimentos de mantenimiento y de reproducción.

2.2. Recolección de datos

2.2.1 Obtención de información de campo

Se determinó el peso, talla y el porcentaje de supervivencia así como la biomasa de cada uno de los bioensayos.

Para determinar la talla del camarón se usó una balanza gramera digital. Se sacaron entre 100 y 150 animales con una atarraya. Se usó la siguiente fórmula:

$$P = Pt / No$$

Donde:

Pf = Peso total de los camarones

Nc = Numero de camarones pesados

Conociendo que se sembraron 450 pl por gramos se pesaron desde la primera semana de cultivo hasta la 8va semana que duro el experimento.

Para obtener el valor del porcentaje de supervivencia para cada tratamiento se aplica la siguiente fórmula:

$$S = Nf / No * 100$$

Donde:

Nf = Población final

No = Población inicial

Conociendo la población inicial para todos los tratamientos que es la cantidad de animales que se sembraron en las piscinas.

El cálculo de la población final es realizado semanalmente. Para obtener el valor de la biomasa final se utilizó la siguiente fórmula:

$$Nf = Cp * Da * 10.000$$

Donde:

Cp= Numero de camarones promedio por lance de la atarraya

Da=Diámetro de la atarraya

Se realizan mínimo 3 lances de atarraya por hectárea. Este valor se calculó semanalmente y sirve para conocer el porcentaje de supervivencia de las piscinas de engorde camarón.

Como se mencionó anteriormente se determinó la temperatura, el oxígeno, la salinidad y el pH de cada tina, utilizando para la

temperatura y el oxígeno un oxigenómetro YSI y para la determinación del pH un potenciómetro marca Hanna. La medición de los parámetros se hizo cada 7 días 2 veces al día.

Al final del bioensayo se realizó una evaluación al microscopio del hepatopáncreas del camarón. Esto ayuda a tomar decisiones en la camaronera sobre el control de enfermedades.

TABLA 6
ANALISIS DEL HEPATOPANCREAS EN MICROSCOPIO

PISCINAS	T0	T1	T2	T3
Necrosis	SI	NO	NO	NO
Lípidos	Xx	xxx	3	2
Paredes engrosadas (Tubulos)	Xxx	xx	X	xx
Paredes engrosadas (Tracto)	Xxx	x	Xx	x
Lóbulos deformes	Xx	xx	X	xx
+ BAJO		(1-25% afectación)		
++MEDIO		(26-50% afectación)		
+++ ALTO		(51-75% afectación)		
++++ MUY ALTO		(76-100% afectación)		
(Baidal, J. 2015)				

2.2.2 Análisis Microbiológico

Se realizaron análisis de laboratorio de la fase inicial. Esto es para mantener un control en las variables que puedan afectar los experimentos.

Como control se analizó muestras de agua de las piscinas donde se hicieron los experimentos y del agua con la cual se activó las bacterias. Así como un análisis microbiológico de camarones a los 35 días de cultivo.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis del efecto de la aplicación del probiótico.

3.1.1 Análisis estadístico de las variables.

Según la naturaleza de lo que se desea probar que es ver la diferencia en peso, talla y porcentaje de sobrevivencia se decidió usar un Análisis de Varianza ANOVA de un factor.

Prueba de hipótesis PESO

El control en camaronera del peso es semanal. Esto indica la cantidad de libras por hectárea que hay en la piscina. Se utilizara un Alfa=0.1

Ho: No existe diferencia significativa entre las libras por hectárea de los tratamientos T0, T1, T2 y T3.

H1: Existe diferencia significativa entre las libras por hectárea de al menos un tratamiento.

TABLA 7

ANOVA UNIDIRECCIONAL: LB/HA VS. TRATAMIENTO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
tratamiento	3	186394	62131	0.96	0.416
Error	140	9106993	65050		
Total	143	9293387			

S = 255.0 R-cuad. = 2.01% R-cuad. (ajustado) = 0.00%

ICs de 95% individuales para la media				basados en Desv.Est. agrupada
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----
T0	36	235.2	209.3	(-----*-----)
T1	36	265.2	249.0	(-----*-----)
T2	36	334.3	303.7	(-----*-----)
T3	36	275.2	249.3	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----
				210 280 350

Desv.Est. agrupada = 255.0

(Baidal,J.2015)

TABLA 8
ANALISIS USANDO METODO DE TUKEY: LB/HA VS.
TRATAMIENTO

Agrupar información utilizando el método de Tukey

tratamiento	N	Media	Agrupación
T2	36	334.3	A
T3	36	275.2	A
T1	36	265.2	A
T0	36	235.2	A

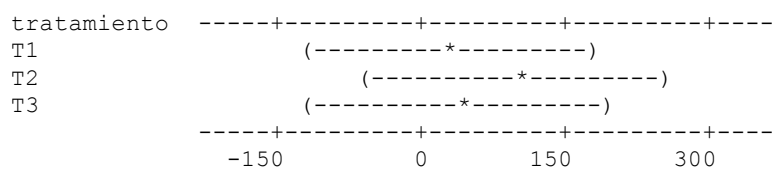
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de tratamiento

Nivel de confianza individual = 98.97%

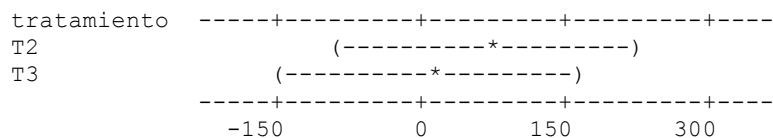
tratamiento = T0 restado de:

tratamiento	Inferior	Centro	Superior
T1	-126.4	30.1	186.5
T2	-57.3	99.2	255.6
T3	-116.4	40.0	196.4



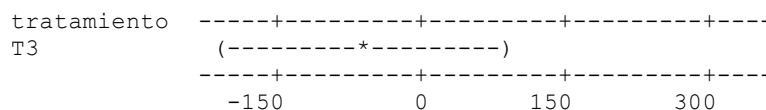
tratamiento = T1 restado de:

tratamiento	Inferior	Centro	Superior
T2	-87.3	69.1	225.5
T3	-146.5	9.9	166.4



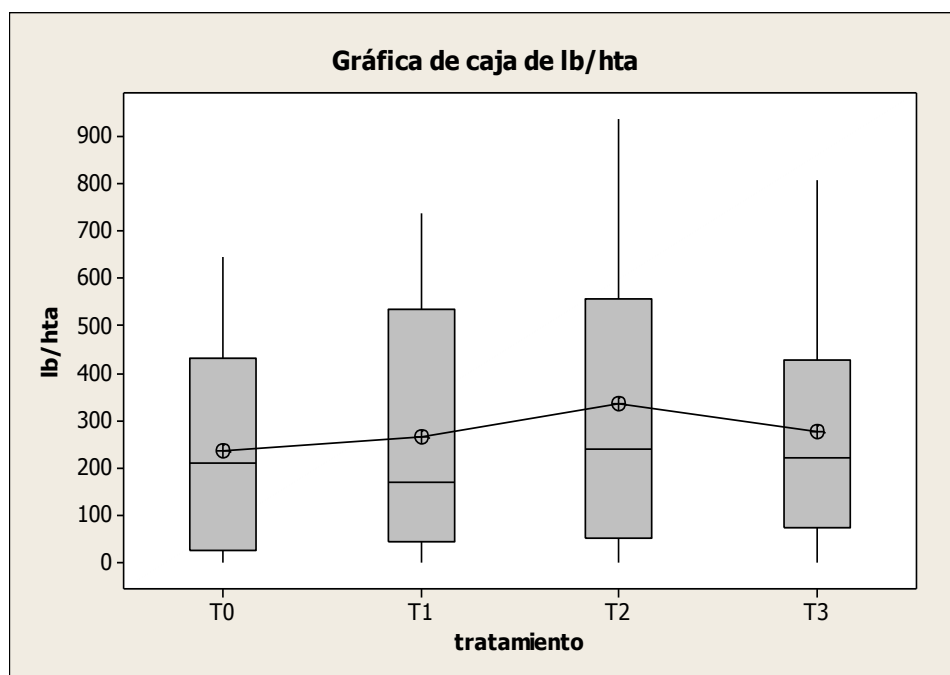
tratamiento = T2 restado de:

tratamiento	Inferior	Centro	Superior
T3	-215.6	-59.2	97.3



(Baidal, J. 2015)

Como se evidencia por el valor $p > 0,1$ se concluye que: Existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 , por lo tanto todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre lb/ha.



(Baidal, J. 2015)

FIGURA 3.1 DIAGRAMA DE CAJAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS (LB/HA).

Prueba de hipótesis PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA

Esto indica en valores porcentuales la cantidad de animales que se tiene vivos en la piscina con respecto a la cantidad sembrada.

Ho: No existe diferencia significativa entre las supervivencia de los tratamientos T0, T1, T2 y T3

H1: Existe diferencia significativa entre las supervivencia de al menos un tratamiento.

TABLA 9

ANOVA UNIDIRECCIONAL: PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA VS TRATAMIENTO

ANOVA unidireccional: Porcentaje de Supervivencia vs. tratamiento.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
tratamiento.	3	0.0557	0.0186	1.66	0.178
Error	140	1.5641	0.0112		
Total	143	1.6197			

S = 0.1057 R-cuad. = 3.44% R-cuad.(ajustado) = 1.37%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	+-----+-----+-----
T0	36	0.8061	0.1349	(-----*-----)
T1	36	0.8186	0.1078	(-----*-----)
T2	36	0.8589	0.0806	(-----*-----)
T3	36	0.8336	0.0916	(-----*-----)
				+-----+-----+-----
				0.770 0.805 0.840
				0.875

Desv.Est. agrupada = 0.1057

(Baidal, J. 2015)

tratamiento. = T2 restado de:

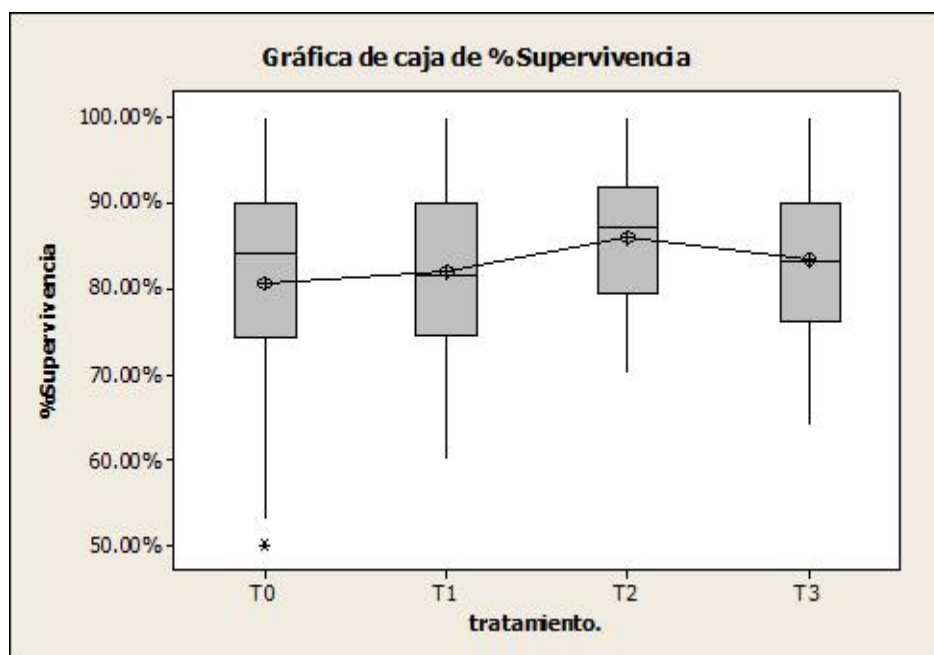
tratamiento.	Inferior	Centro	Superior
T3	-0.0901	-0.0253	0.0395

tratamiento. -----+-----+-----+-----+
T3 (-----*-----)
-----+-----+-----+-----+

-0.060 0.000 0.060 0.120

(Baidal, J. 2015)

Como se evidencia por el valor $p > 0,1$ se concluye que: Existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 , por lo tanto todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre la supervivencia del camarón.



(Baidal, J. 2015)

FIGURA 3.2 DIAGRAMA DE CAJAS DE LAS MEDIAS DE PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA

Prueba de hipótesis TALLA

Se analizará el incremento semanal de la talla de los animales, está dada en gramos ya que así se puede saber si el camarón está creciendo o no.

Ho: No existe diferencia significativa entre las tallas del camarón de los tratamientos T0, T1, T2 y T3

H1: Existe diferencia significativa entre las tallas del camarón de al menos un tratamiento.

TABLA 11

ANOVA UNIDIRECCIONAL: TALLA (GR) VS. TRATAMIENTO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
TRATAMIENTO,	3	1.99	0.66	0.15	0.932
Error	140	637.33	4.55		
Total	143	639.31			

S = 2.134 R-cuad. = 0.31% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

media				ICs de 95% individuales para la
				basados en Desv.Est. agrupada
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----
T0	36	2.205	2.112	(-----*-----)
T1	36	2.021	2.062	(-----*-----)
T2	36	2.262	2.211	(-----*-----)
T3	36	2.339	2.147	(-----*-----)
-)				-----+-----+-----+-----
+-----				1.50 2.00 2.50
3.00				

Desv.Est. agrupada = 2.134

(Baidal, J. 2015)

TABLA 12

ANALISIS USANDO METODO TUKEY: TALLA VS TRATAMIENTO

Agrupar información utilizando el método de Tukey

TRATAMIENTO,	N	Media	Agrupación
T3	36	2.339	A
T2	36	2.262	A
T0	36	2.205	A
T1	36	2.021	A

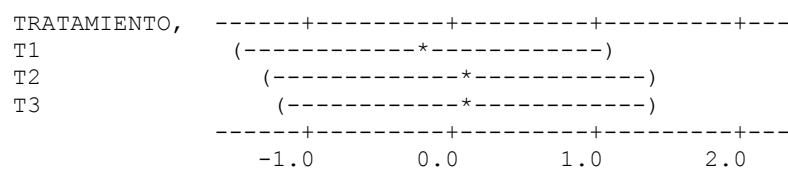
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de
TRATAMIENTO,

Nivel de confianza individual = 98.97%

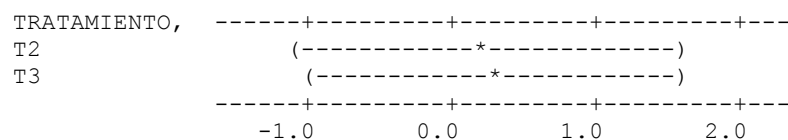
TRATAMIENTO, = T0 restado de:

TRATAMIENTO,	Inferior	Centro	Superior
T1	-1.493	-0.184	1.124
T2	-1.252	0.057	1.366
T3	-1.175	0.134	1.443



TRATAMIENTO, = T1 restado de:

TRATAMIENTO,	Inferior	Centro	Superior
T2	-1.067	0.241	1.550
T3	-0.990	0.318	1.627



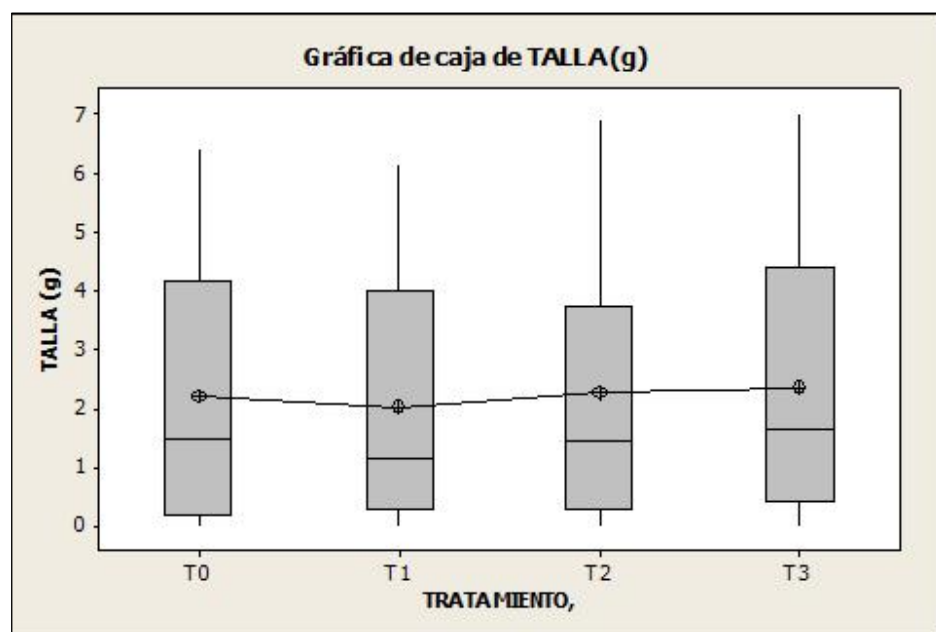
TRATAMIENTO, = T2 restado de:

TRATAMIENTO,	Inferior	Centro	Superior
T3	-1.232	0.077	1.386

TRATAMIENTO,	-----+-----+-----+-----+-----			
T3	(-----+-----+-----+-----+-----)			
	-----+-----+-----+-----+-----			
	-1.0	0.0	1.0	2.0

(Baidal, J. 2015)

Como se evidencia por el valor $p > 0,1$ se concluye que: Existe suficiente evidencia estadística para no rechazar H_0 , por lo tanto todos los tratamientos tienen el mismo efecto sobre la talla del camarón.



(Baidal, J. 2015)

FIGURA 3.3 DIAGRAMA DE CAJAS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS UNIDADES MUÉSTRALES

También se tomaron muestras del agua de las piscinas y se realizó la siguiente tabla.

TABLA 13.
ANALISIS DE AGUA REALIZADA EN LABORATORIO

Analisis agua de vibrio ssp.	
Muestra	UFC/ml
Agua de piscina prueba T0	$3,0 \cdot 10^2$
Agua de piscina prueba T1	$4,0 \cdot 10^2$
Agua de piscina prueba T2	$1,0 \cdot 10^2$
Agua de piscina prueba T3	$4,0 \cdot 10^2$
Agua de inoculación de probiótico	$<1,0 \cdot 10^1$
Agua de reservorio	$7,0 \cdot 10^2$

(Baidal, J. 2015)

Como se puede observar en la tabla 13 el *Vibrio ssp.* viene desde el reservorio a las piscinas, es decir la toma de agua tiene naturalmente *Vibrio spp.*

En la siguiente tabla se muestra los resultados microbiológicos de *Vibrio ssp.* para camarón por cada prueba.

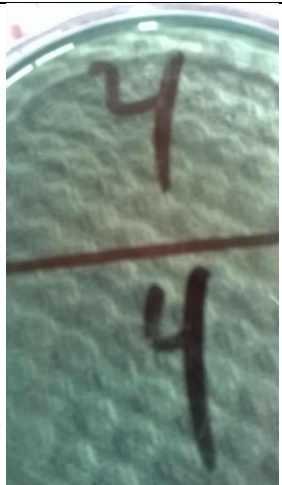
TABLA 14.
MUESTRAS EN FRESCO DE CAMARON EN CAMPO

MUESTRA	UFC/g Promedio	# de camarones muestreados	# de camarones con Vibrio ssp.	% de camarones con vibrio ssp.
Camarón Prueba T0	$5,0 \cdot 10^1$	20	12	60%
Camarón Prueba T1	$7,0 \cdot 10^2$	20	6	28%
Camarón Prueba T2	$2,0 \cdot 10^3$	20	1	5%
Camarón Prueba T3	$4,0 \cdot 10^4$	20	6	28%

(Baidal, J. 2015)

Analizando la figura 3.4 en la muestra 2A se observa la presencia de *vibrios* a los 35 días de cultivo en T0.

La muestra 2B es un examen de *vibrios* en el agua donde se inocularon los microorganismo que usaron para el enriquecimiento del balanceado.

	
Muestra 1A. Presencia de vibrios en agua, presenta un color amarillo intenso	Muestra 1B. Presencia de vibrios en animales de 35 días, presenta coloracion amarilla y verde.
	
Muestra 2A. Presencia de vibrios en agua, color amarilla.	Muestra 2B. No presenta vibrios en agua control

(Baidal, J. 2015)

FIGURA 3.4 PRECENCIA Y CONTROL DE VIBRIOS

3.1.2. Otros beneficios

Llevando un control estadístico de los crecimientos semanales de las piscinas en la camaronera se pueden tomar medidas correctivas para aumentar la eficiencia de la camaronera.

Esto conlleva a un mejor análisis de los insumos que son usados en la camaronera consecuentemente a una mayor rentabilidad económica ya que esto se verá reflejado en las libras cosechadas.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Analizando los datos recopilados se puede concluir:

- Se observó que estadísticamente no existe diferencia significativa hasta las 8 semanas de crecimiento, en el peso; talla y el porcentaje de sobrevivencia del camarón usando el balanceado mezclados con ácidos orgánicos y/o microorganismos probiótico con respecto a la alimentación a base únicamente de balanceado por lo tanto no hubo rentabilidad económica en los tratamientos T1, T2 y T3 con respecto al tratamiento T0.
- Se observó en campo que las unidades muestrales presentaron mejor resistencia a enfermedades causadas por *Vibrio ssp.* usando el tratamiento 2 que presento un 5% de

incidencia a *Vibrio ssp.* a diferencia de tratamiento 1 y 3 con un 28% de incidencia a *Vibrio ssp.* en relación a tratamiento 0 presento incidencia a *Vibrio ssp.* durante la etapa juvenil en un 60% esto se comprobó con el análisis en campo.

- La incidencia menor de *Vibrio ssp.* se halla dado en el tratamiento 2, debido a la competencia por recursos nutricionales dada por el probiótico.
- Los datos obtenidos van correlacionados a un control de biomasa para poder determinar la dosificación durante la etapa inicial de cultivo y obtener una mejor sobrevivencia.

Se recomienda:

- Realizar investigaciones antagónicas que permita determinar si existe algún otro microorganismo que si genere un beneficio significativo en cuanto a talla, peso y porcentaje de sobrevivencia en las primeras 8 semanas de crecimiento, y así mejore el sistema de producción y su rentabilidad.

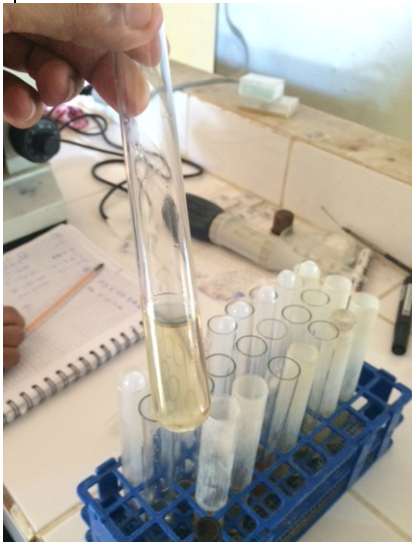
- Establecer una prueba en época invernal dado que el cambio de temperaturas, pH y salinidad es una variable que puede mantener una nueva dosificación en los aditivos usados en el estudio.

APÉNDICES

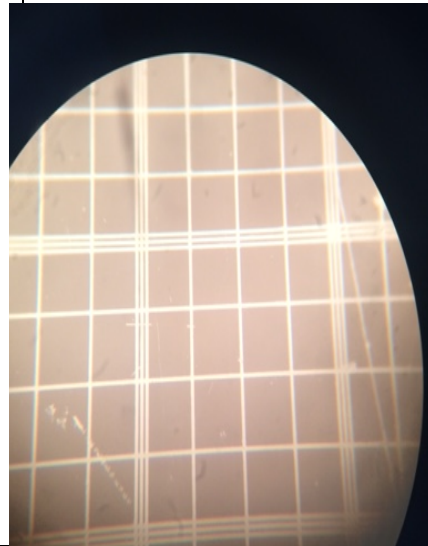
APENDICE 1

	
Muestras de probióticos en campo para realizar conteo de MB	Dilucion de MO en laboratorio para calcular el conteo total
	
Dilucion de bacterias 10e (Baidal, J. 2015)	Dilucion 9e de las bacterias

APENDICE 2



Dilucion de 8e del conteo en laboratorio



Vista al microscopio en laboratio para el
conteo de colonias de bacterias presentes

(Baidal, J. 2015)

APENDICE 3

LABORATORIO
ANÁLISIS PATOLÓGICO DE CAMARÓN

CAMARONERA: Capricornio ZONA: Tuquesa
FECHA DE MUESTREO: 10. Marzo 2015 FECHA DE ANÁLISIS: 10. Marzo 2015
SOLICITANTE: Pablo Moreno FECHA DE ENTREGA: 10. Marzo 2015

PISCINAS		KAS 4	KAS 9	PRO 4	PRO 6	KIM 1	KIM 3
Peso promedio g.		-	-	-	-	-	-
Flacidez %		-	-	-	-	-	-
Cela roja %		-	-	-	-	-	-
Grado de Afectación		-	-	-	-	-	-
Hemolinf. Coagulación		-	-	-	-	-	-
Deformes-enanos %		-	-	-	-	-	-

* Bajo ** Medio *** Alto
n: Normal e: enfermo
Optimo: < 5%

BRANQUIAS		KAS 4	KAS 9	PRO 4	PRO 6	KIM 1	KIM 3
Sucias		+	+	+	+	+	+
Necrosis		-	-	-	-	-	-
P R O T O Z O A	Epistylis	-	-	-	-	-	-
	Vorticela	-	-	-	-	-	-
	Zoothamnium	-	-	-	-	-	-
	Acineta	-	-	-	-	-	-
	Ciliado Apostome	-	-	-	-	-	-
	Lagenophrys	-	-	-	-	-	-
	Leucotrix sp.	-	-	-	-	-	-
Fusarium sp.	-	-	-	-	-	-	
Algas		-	-	-	-	-	-
Detritos		+	+	+	+	+	+

Nivel de presencia patógenos en: Branquias/Hepatos/Intestino
+ BAJO (1-25% afectación)
++ MEDIO (26-50% afectación)
+++ ALTO (51-75% afectación)
++++ MUY ALTO (76-100% afectación)

HEPATOPANCREAS		+ <th>++ <th>+++ <th>++++ <th>+++++ <th>++++++ </th></th></th></th></th>	++ <th>+++ <th>++++ <th>+++++ <th>++++++ </th></th></th></th>	+++ <th>++++ <th>+++++ <th>++++++ </th></th></th>	++++ <th>+++++ <th>++++++ </th></th>	+++++ <th>++++++ </th>	++++++
Lípidos		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Rickettsia 1 (engrosamiento)		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Rickettsia 2 (deformación)		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Rickettsia 3 (estrangulación)		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Baculovirus		-	-	-	-	-	-

Lípidos Mayor a 3.5 Optimo
Se tolera hasta 20% de R1
R2-3 Tratar
Baculovirus sin presencia

INTESTINO		KAS 4	KAS 9	PRO 4	PRO 6	KIM 1	KIM 3
Baculovirus		-	-	-	-	-	-
Gregarinas		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Nematodos		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Algas		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Detritos		+	++	+++	++++	+++++	++++++
Balanceado		-	-	-	-	-	-
Restos Crustáceos		-	-	-	-	-	-

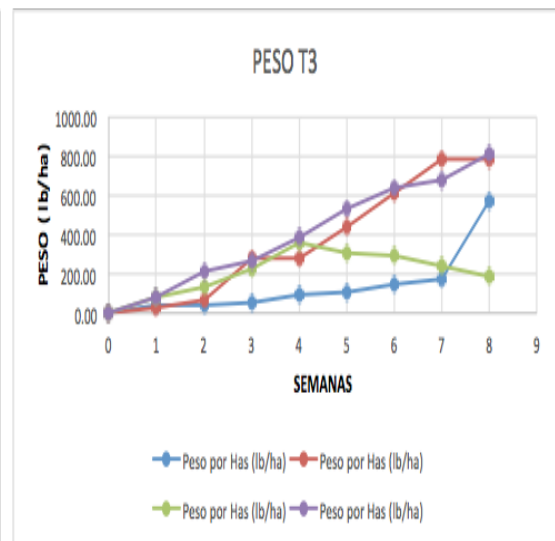
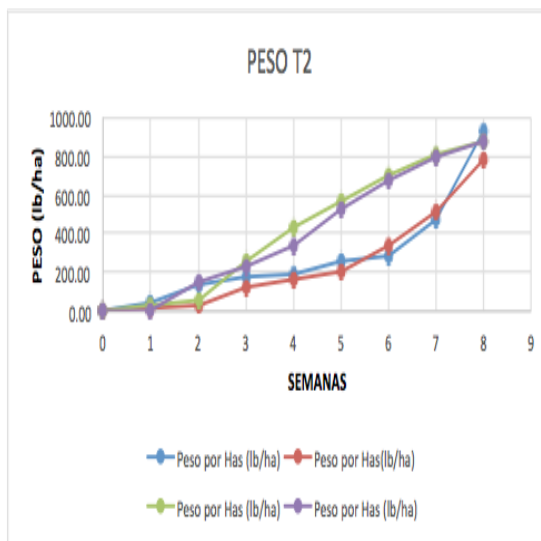
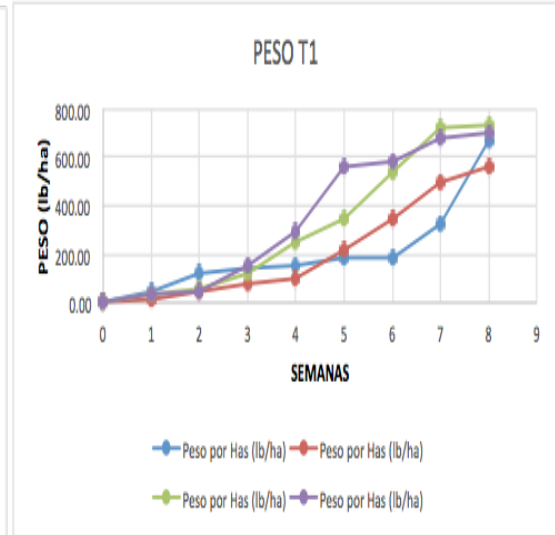
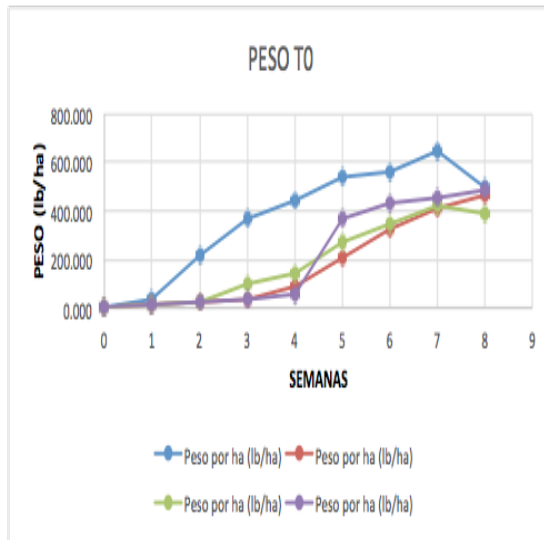
GREGARINAS > 50% Tratar
H = Huevos A = Adulto
+ BAJO (1-25% afectación)
++ MEDIO (26-50% afectación)
+++ ALTO (51-75% afectación)
++++ MUY ALTO (76-100% afectación)

OBSERVACIONES:
1. PISCINAS: KAS 4, KAS 9, PRO 4, PRO 6, KIM 1, KIM 3: 2 g/l Alimento Dr. Lactobacillus (10 d.c.m.) Intestinalmente.
2. PISCINAS: KAS 4, KAS 9, PRO 4, PRO 6, KIM 1, KIM 3: 2 g/l Alimento Ac. Organico (Lactobacillus - Lactococcus).
3. PISCINAS: KAS 4, KAS 9, PRO 4, PRO 6, KIM 1, KIM 3: 2 g/l Alimento Dr. Lactobacillus (10 d.c.m.) Intestinalmente.

(Agripac, 2014)

Análisis de Laboratorio de calidad de agua y hepatopáncreas en camarón realizado por la compañía AGRIPAC S.A.

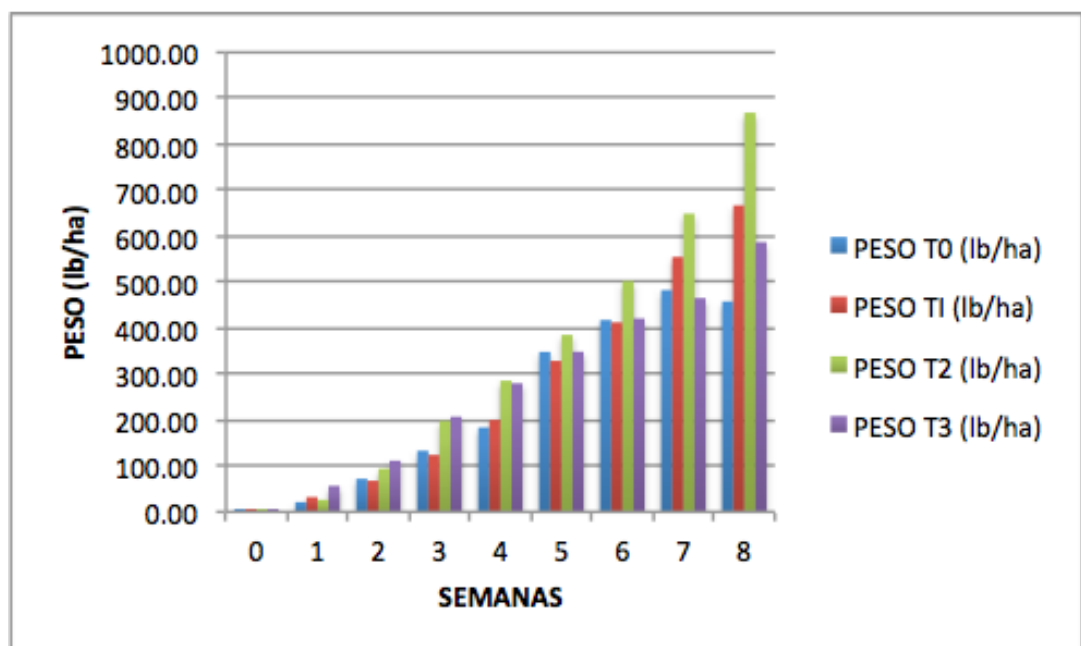
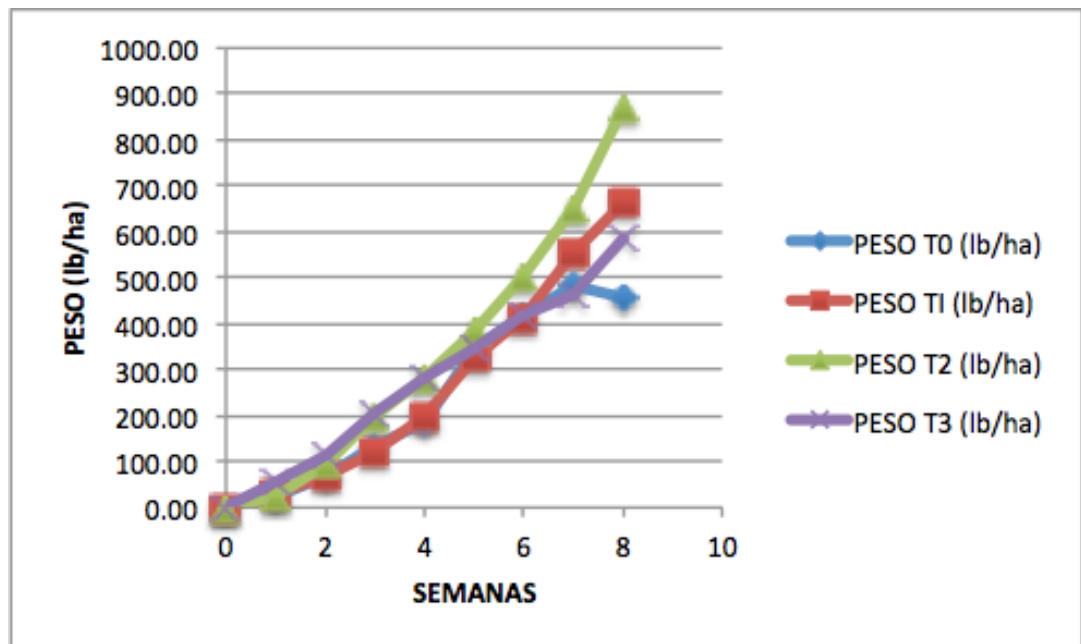
APENDICE 4



(Baidal, J. 2015)

Análisis de los Pesos por hectárea de los diferentes tratamientos.

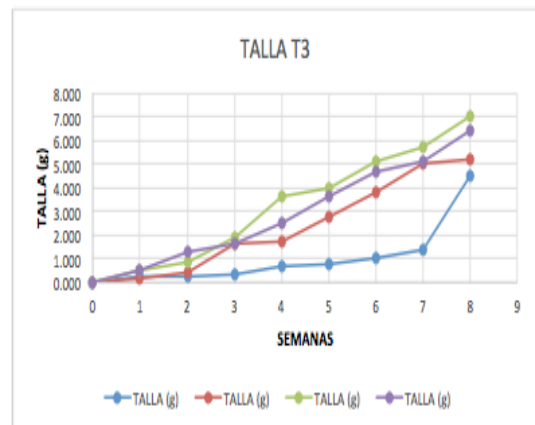
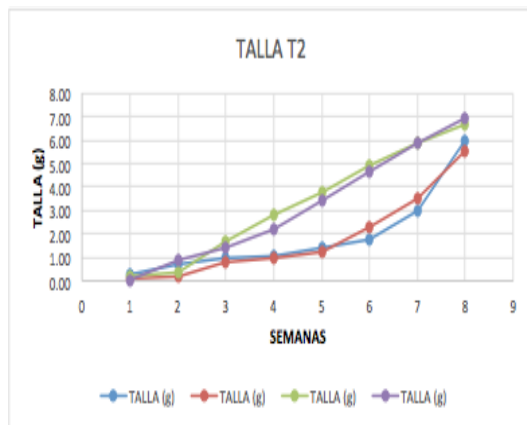
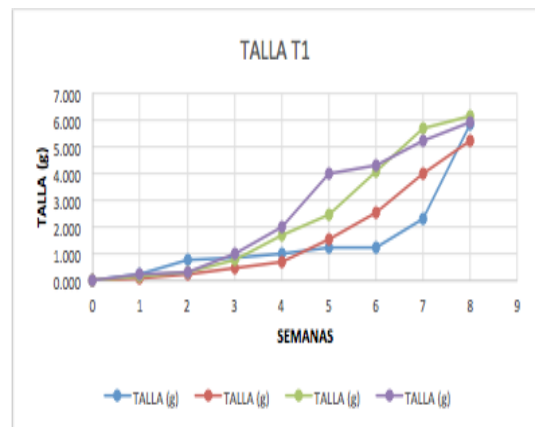
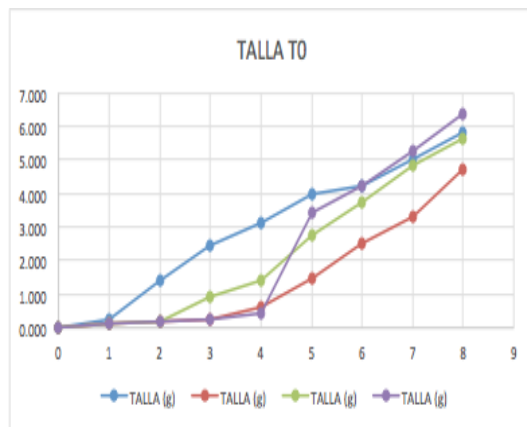
APENDICE 5



(Baidal, J.2015)

Promedio de los pesos en los tratamiento T0, T1, T2 y T3.

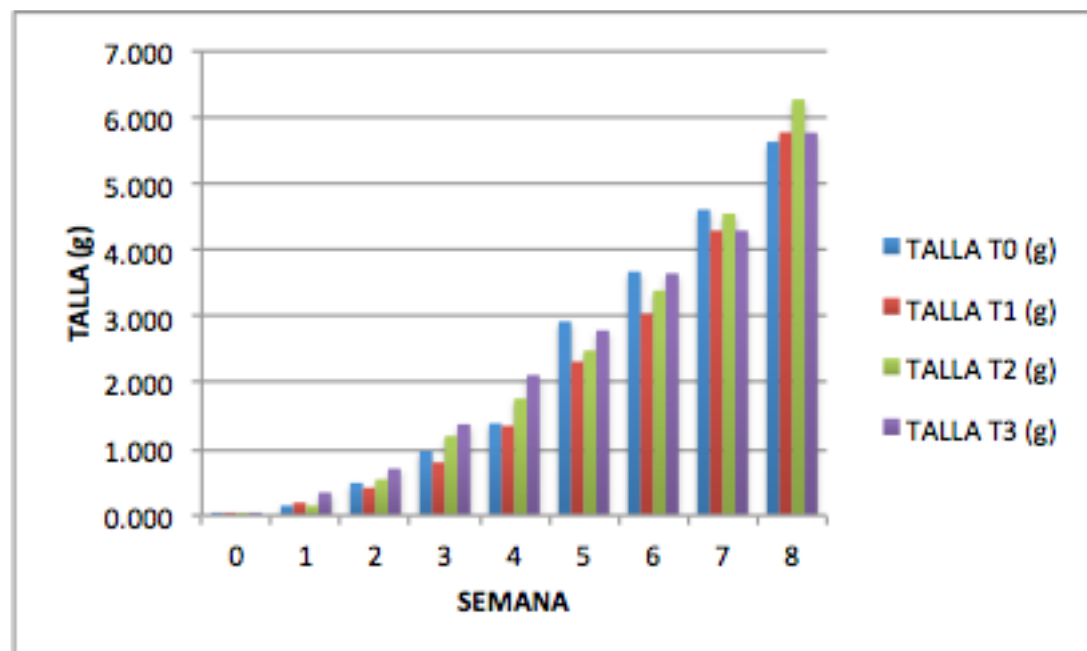
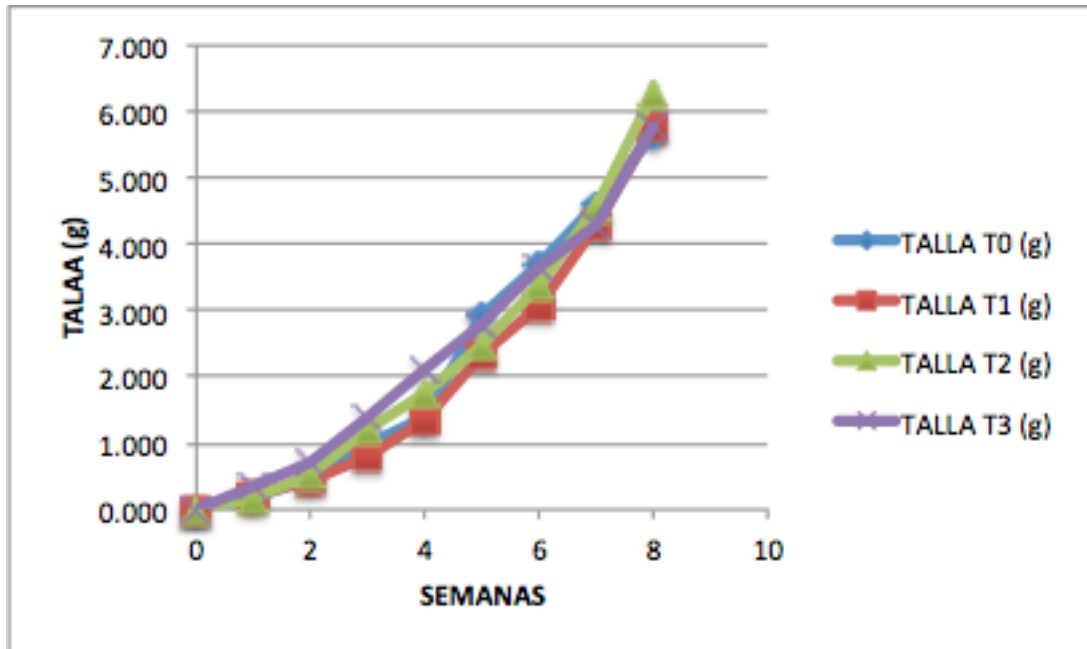
APENDICE 6



(Baidal, J. 2015)

Tallas de los tratamientos T0, T1, T2 y T3

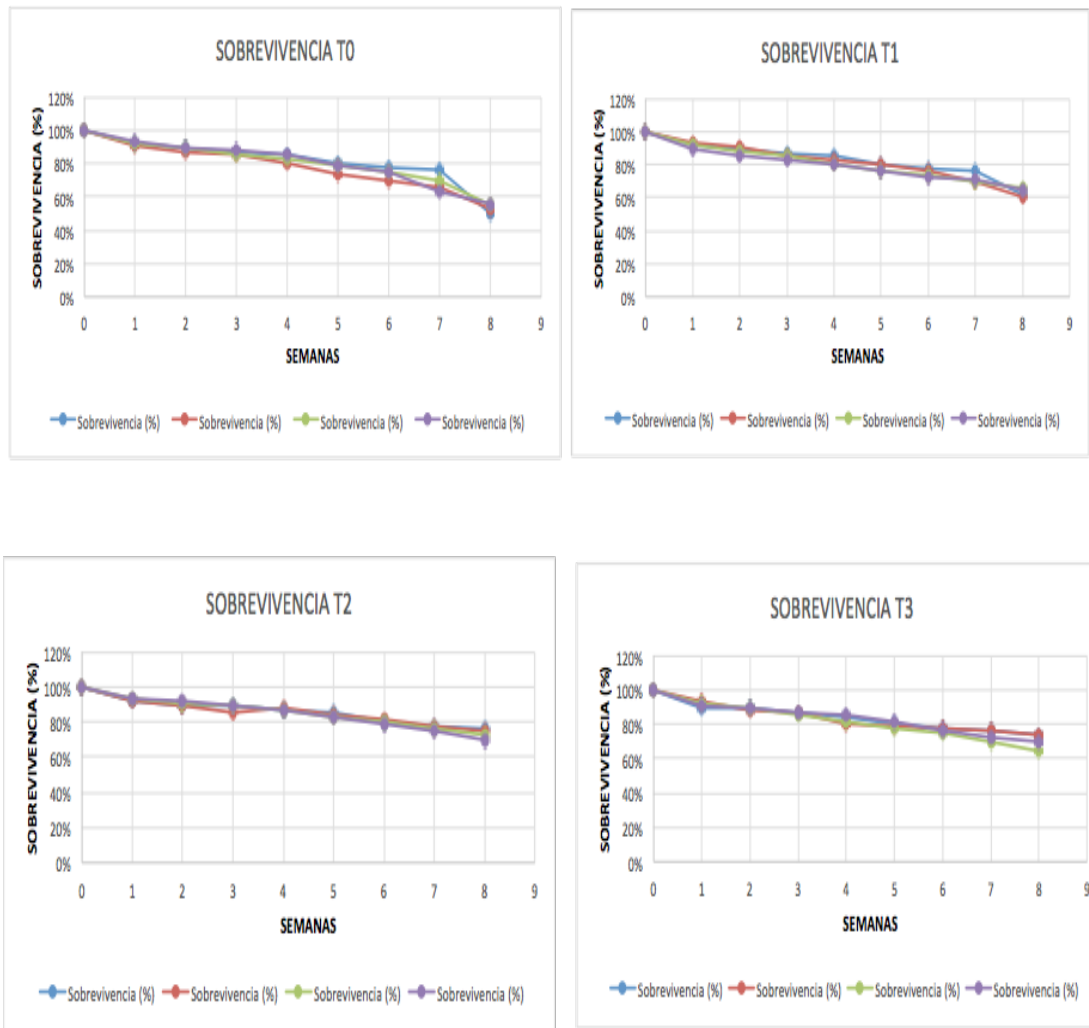
APENDICE 7



(Baidal, J. 2015)

Promedio de las tallas de los tratamientos T0,T1,T2 y T3

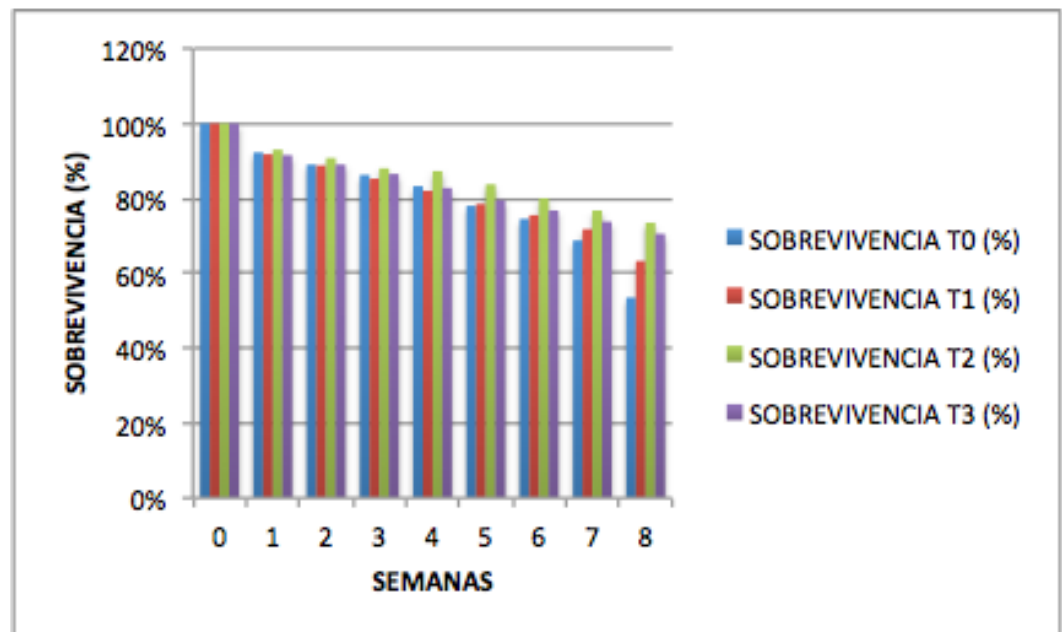
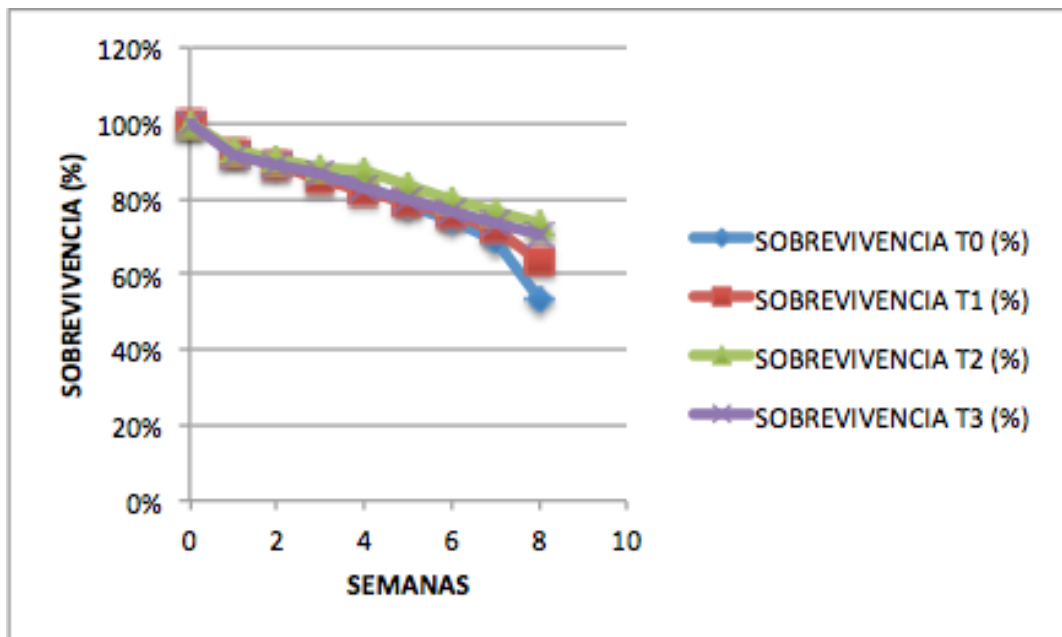
APENDICE 8



(Baidal, J. 2015)

Sobrevivencia en los tratamientos T0, T1, T2 y T3

APENDICE 10



(Baidal, J. 2015)

Promedio de la sobrevivencia de los tratamiento T0,T1,T2 y T3

BIBLIOGRAFÍA

Tacon, A.; et al. 2000. Tendencias y Retos Globales de los Alimentos Para Camarón. The Oceanic Institute, Makapuu Point, USA,

Söderhäll, K., and L. Cerenius, 1992. Crustacean immunity. Annual Rev. of Fish Diseases, Vol 2. Pergamon Press. Oxford, United Kingdom. Pag 3-23

Cedeño, R.; et al. Inmunomodulación: Aspectos Nutricionales E Inmunoestimulación. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. octubre 1999 Guayaquil – Ecuador.

CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>) **Ponce-Palafox1, J.; et al.** Bases Biológicas Y Técnicas Para El Cultivo De Los Camarones De Agua Dulce Nativos Del Pacífico Americano *Macrobrachium Tenellum* (Smith, 1871) y *M. americanum* (Bate, 1968).

CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), - **Jesús T. Ponce-Palafox, Fernando C. Arana-Magallón, Héctor Cabanillas Beltrán,** Héctor Esparza Leal, Bases biológicas y técnicas para el cultivo de los camarones de agua dulce nativos del Pacífico Americano *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) y *M. americanum* (Bate, 1968).

Partida, B. 2009. Efecto prebiótico y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento, supervivencia en el sistema inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones normales. Guasave, Sinaloa

Platt, M; et al. 2004. The Role of Chitin in the thermoprotection of *Vibrio cholerae*. Journal of Food Protection, Number 5. International Assotiation for food protection. Iowa, Usa. Pag 473-578.

Zhou, X.; et al. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. National Shellfisheries Assotiation. 287: 349-353.

Zhou, X., Y. Wang, and W. Li. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 287: 349-353. Zokaei,

Astudillo, M. 2013. Evaluación De La Melanosis Del Camarón Blanco *Litopenaeus Vannamei* Procesado En Empacadora Y Sometido A Congelación, Universidad Tecnica de Machala, Machala, Ecuador.

Rodriguez, J, et al. 2000. Efecto de la calidad de la dietasobre la respuesta immune del camarón *Panaeus Vanamei*. CENAIM-ESPOL, Guayaquil, Ecuador.

Song Y.L, Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18 (3) : 201-209.

Le Moullac, G., L.P. De Laborie, D. Saulnier, C. Goarant, and M. Dehasque. (1998). Principles and problems involved in the evaluation of immunostimulants on juvenile shrimp. IV Symposium International de Nutrition Acuicola, La Paz, B.S.C. Mexico.

Gomez-Gil B, FL Thompson, CC Thompson, A Garcia-Gasca, A Roque, and J Swings. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 261-265.

Pacini, F. 1854. Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul colera asiatico. *Gazette Medicale de Italiana Toscano Firenze* **6**: 405-412.

Thompson J., M. A. Randa, L. Marcelino, A. Tomita- Mitchell, E. Lim, and M. Polz. 2004. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4103-4110.

Thompson J., M. Polz. 2000. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, American Society of Microbiology. **13**:190-203.

Urakawa H & IN Rivera. 2006. Aquatic environment. *The biology of vibrios*. ASM Press. **12**:175-189.

Leyton Y., & C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **43**:441-456.

Thompson F., and J. Swings. 2006. Taxonomy of the vibrios, p. 175. *Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms*, Rio de Janeiro, Brasil.

Flye-Sainte M., S. Pouvreau, C. Paillard, and F. Jean. 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **349**: 378-389.