

# Efecto de probiótico a base de *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. en la sobrevivencia y crecimiento larval de *Litopenaeus vannamei* en la Estación de Maricultura Los Cóbanos, Sonsonate

Díaz Palacios, MA  
Estudiante tesista  
Departamento de Zootecnia  
Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Montes Rafailano, MG  
Estudiante tesista  
Departamento de Zootecnia  
Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

Paz Quevedo, NE  
Docente director  
Departamento de Zootecnia  
Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador.

Navarrete, MT  
Docente director  
Ministerio de Agricultura y Ganadería, CENDEPESCA.

## Resumen

Con nauplios de *Litopenaeus vannamei* cultivados en pilas de levantamiento larval, se estudió el efecto de un probiótico comercial a base de cuatro bacterias benéficas (*Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *LactoBacillus* sp.), en la Estación de Maricultura Los Cóbanos con 3.6 millones de larvas procedentes de la misma Estación. Las larvas se desarrollaron desde la fase de Nauplio hasta Postlarva III en un período aproximado de 18 días. Se utilizó la prueba T de Student con parcelas pareadas para igual y diferente número de observaciones evaluando dos tratamientos:  $T_0$  fue el tratamiento testigo, y  $T_1$  el tratamiento alternativo con probiótico comercial, cada uno con dos repeticiones físicas, y de 16 a 36 repeticiones en el tiempo aproximadamente durante el experimento. Durante la investigación, las larvas se vieron sometidas a desafíos causados por factores no controlables: falta de microalgas y recambios por defectos de la bomba de la Estación. Estos eventos influenciaron la sobrevivencia de la población en estudio, sin embargo, la aplicación del probiótico alcanzó una sobrevivencia de larvas de camarón marino del 42% contra un 30% del tratamiento testigo ( $P \leq 0.05$ ). En el análisis bacteriológico del agua de ambos tratamientos no se aislaron patógenos, únicamente *Escherichia coli* dentro de los rangos permitidos por la Norma Salvadoreña Obligatoria 2009 ( $<1.1$  NMP/100ml); no obstante, el recuento total de mesófilos aerobios en  $T_1$  reportó un número menor en comparación de  $T_0$ , donde fue demasiado numeroso. El resultado de Reacción de la Cadena de Polimerasa, mostró positivo en una repetición en una repetición de  $T_1$  a Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa. La relación de beneficio-costo (B-C) de  $T_1$ , mostró el mejor beneficio neto con \$749.22 superando a  $T_0$ .

**Palabras clave:** *Litopenaeus*, *vannamei*, probiótico, sobrevivencia, larval, levantamiento, larval, camarones, camaricultura, bacterias.

## Abstract

The study was focused on the effect of a probiotic product based in four nonpathogenic bacteria (*Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. and *LactoBacillus* spp.) with *Litopenaeus vannamei* nauplii on Estación de Maricultura Los Cóbanos with 3.6 million from parent stocks from the same hatchery laboratory. The usual management given to the larvae in the Estación was compared with a treatment with probiotic; these larvae were grown from Nauplius till Postlarvae III in approximately 18 days. Student's t distribution for different and equal samples was used, valuating 2 treatments: where  $T_0$  was the control treatment and  $T_1$ , the alternative treatment adding probiotic. Each treatment had 2 physic repetitions and 16 to 36 time repetitions in the experiment. During the cycle, the larvae were influenced by non-controllable factors such as the lack of micro-algae and none water exchange for a period of days because mechanical breakdown of the bomb used in the Estación. These events had a significant effect on the survival rate, though the probiotic treatment shown better survival rates ( $S \leq 12\%$ ) than the control treatment. The bacterial analysis of the water had the absence of pathogens, the only isolated bacteria was *Escherichia coli* with  $<1.1$  NMP/100ML, which is in the allowed range according to the Norma Salvadoreña Obligatoria 2009.

Even though, the total aerobic mesophilous bacteria recount on the probiotic treatment was low compared to the control treatment, which had too many for counting. In the PCR analysis, T1R2 was positive to IHHNV. The cost-payoff relation of the probiotic treatment larvae showed better neat earning with \$749.22, exceeding the control treatment.

**Key Words:** *Litopenaeus*, *vannamei*, probiotic, survival, rate, larvae.

## Introducción

En los últimos años el rubro de la camaricultura ha ido mejorando con los avances tecnológicos en el manejo, alimentación y desarrollo larvario. Con el tiempo, la búsqueda de especímenes resistentes a enfermedades se implementó el uso de antibióticos en el ciclo biológico del camarón al ser cultivado masivamente en explotaciones, promoviendo el control más estricto de las enfermedades. La implementación de estos productos comerciales en el mercado acuícola no sólo permitió controlar las enfermedades, sino también al haber abusado de los antibióticos, las bacterias se volvieron resistentes a estos. Además del riesgo de que el camarón al salir al mercado presente residuos en sus tejidos

Este hallazgo obligó a que se prohibiera el uso de estos productos. Como contraparte surgieron alternativas, así diferentes asociaciones de camaricultores han optado por el uso de productos que benefician no sólo a la salud del camarón, sino también a los consumidores, ya que no existe peligro de residuos dañinos (FDA, 2008).

Los probióticos, productos inocuos para la salud del camarón, son bacterias apatógenas que promueven al sistema inmune de estos. En la última década, el uso de probióticos ha tenido un auge substancial entre las empresas camaroneras de vanguardia, como es el caso de una de las empresas más importantes de la costa pacífica de Guatemala que han decidido implementar el uso de probióticos, mejorando la sobrevivencia e incrementando la productividad (Aguirre y Ascencio, 2003).

Por ello la aplicación de probióticos en los cultivos se vuelve una alternativa viable para promover la salud de los crustáceos y beneficiar al productor con animales resistentes a enfermedades, oportunidades de exportación y también a los consumidores con un producto más saludable.

A pesar de existir diferentes aplicaciones para los probióticos, ya sea en el engorde o fase larvaria del camarón, la presente investigación se enfocó en la evaluación de un probiótico aplicado al medio acuático compuesto de un complejo de bacterias (*Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp. y *LactoBacillus* sp.) en el ciclo larvario del camarón marino *Litopenaeus vannamei*, con el propósito de incrementar el nivel de sobrevivencia y desarrollo de las mismas.

## Materiales y Métodos

### Ubicación, Duración, Unidades Experimentales

El estudio es de tipo descriptivo, experimental, relacional y explicativo a través del cual se determinó la influencia del uso de probióticos en la sobrevivencia en el ciclo larval de *Litopenaeus vannamei* y su importancia económica. La investigación de campo se realizó entre los meses de enero y marzo de 2012, donde la fase de capacitación de manejo y protocolos empleados en la Estación comprendió del 3 al 16 de enero y del 7 al 20 de febrero y, la fase experimental del 21 de febrero al 9 de marzo. La Estación de Maricultura Los Cóbano es una dependencia del Centro de Desarrollo Pesquero, Ministerio de Agricultura y Ganadería, ubicada en el municipio de Acajutla, departamento de Sonsonate, El Salvador. Ubicada entre los 13°32'40.61"N y 89°49'23.70"O, con una elevación de 4 msnm. La población experimental estuvo conformada por 3.6 millones de larvas aproximadamente del género *Litopenaeus vannamei* procedentes de la misma Estación, desarrollándolas desde Nauplio hasta PL3.

### Metodología de campo

El agua que se utilizó para el experimento, fue tomada directamente del mar y recolectada en las pilas de tratamiento ubicadas fuera del laboratorio. Se aplicó cloro diluido a razón de 10-15ppm por tonelada de agua, con constante aireación por medio de tubería y a la intemperie de 1-2 días. Se empleó la prueba OTO Test para detectar residuos de cloro en el agua antes de ser usada en el laboratorio, también antes de dar paso a los reservorios dentro del laboratorio, el agua pasó por un filtro especial de arena para absorber partículas extrañas que aún estuvieran presentes. Para ser usada en el cultivo de larvas, el agua cumplió con parámetros que fueron mantenidos durante todo el ciclo: 28-31°C de temperatura, pH de 7.4-8.5, oxígeno superior a los 5ppm y 28-35 ups de salinidad.

Las larvas se criaron en pilas de concreto con dimensiones de 2m x 4m con 2 metros de profundidad, con una capacidad de 10 toneladas de agua y con un sistema propio de aireación. Se emplearon 4 pilas en total para desarrollar las larvas. Durante el día, se realizaron recambios de agua (cuando fue necesario), esta se sifonó por medio de un tubo de PVC recubierto con malla 150 micras, así las larvas no escaparon por el desagüe ubicado al centro del laboratorio. La limpieza de las pilas se realizó diariamente, exceptuando los primeros tres días siguientes a la siembra de Nauplios pues se agregan las microalgas. En las pilas de T<sub>1</sub> se añadió el probiótico desde la siembra hasta

la cosecha en PL3 y se aplicaba cada 24 horas. En T<sub>0</sub> se realizó el tratamiento para enfermedades usual en la Estación empleando yodo y formalina. La alimentación de las larvas para ambos tratamientos se ejecutó como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Alimentación durante el experimento.

Alimento	Microalga		No. De veces / día	Ración		
	Estadio	Cantidad (g)				
Artemia	Zoea III	5	4 <sup>2</sup>	Congelada <sup>3</sup>		
	Mysis I a III	10-15				
	Postlarva 1	20				
	Postlarva 2 a 6	25-80				
Alimento artificial	Estadio	Cantidad (g)	No. De veces / día	Dilución <sup>6</sup> (Lts)	Diámetro del tamiz <sup>7</sup> (Mesh)	
	Mix	Zoea III	5	2 <sup>5</sup>	5-10	150
		Mysis I a III	8-10	4 <sup>8</sup>		56
	Mix 2	Postlarva 1	10	4 <sup>8</sup>	5-10	56
		Postlarva 2 a 4	10-15			56
		Postlarva 5-6	15-25			Sin tamizar

<sup>1</sup>Las cantidades de microalgas se mantuvieron siempre que hubiera disponibilidad en la Estación. La cantidad proporcionada depende del estadio en que se encuentra la larva, en este caso, los primeros estadios necesitan mayor cantidad y a que es su alimentación principal

<sup>2</sup>Horario: 3:00 am, 9:00 am, 3:00 pm y 9:00 pm.

<sup>3</sup>Disuelto en 10 litros de agua de mar tratada.

<sup>4</sup>Disuelto en 19 litros de agua de mar tratada.

<sup>5</sup>Horario: 12 am y 12 pm.

<sup>6</sup>En agua salada tratada.

<sup>7</sup>El alimento se tamizaba antes de diluirlo. 150 Mesh equivalente a 108 micrómetros.

<sup>8</sup>Horario: 6 am, 12 pm, 6 pm y 12 am.

En ambos tratamientos se realizaron de 2 a 3 conteos volumétricos de sobrevivencia, empleando el método utilizado en la Estación en tres momentos durante el ciclo: SV1 (día en que las larvas fueron “sembradas”), SV2 (cuando las larvas estaban en estadio de Mysis I) y SV3 (día en que las larvas fueron cosechadas). Para este, se utilizó un beaker de 250ml para tomar 4 muestras del medio acuático en puntos representativos de la pila completando 1 litro y así calcular la equivalencia de larvas vivas en 1 litro a la capacidad total de la pila de 10,000 litros. En cada momento se realizaron 3 muestreos de 1 litro. En conjunto se llevaron registros de cada una de las pilas, en esta bitácora se detallaron aspectos como temperatura, alimento suministrado, horarios de alimentación, salinidad entre otros. El probiótico utilizado fue un producto comercial que contiene *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp y *LactoBacillus* sp., con un mínimo de 3x10<sup>12</sup> ufc. La cantidad de probiótico se proporcionó acorde al estadio larval, la calidad de agua y a las condiciones de las larvas; su aplicación fue cada 24 horas y durante las noches en todo el ciclo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Gramos de probiótico utilizados.

Estadio	Días promedio por estadio	Probiótico (g / 100,000 larvas sembradas)	Total de probiótico g/ millón/ día
Nauplio	2	5,0	50
Zoea	4	4,0	40
Mysis	4	3,0	30
Postlarva	4	3,0	30

### Metodología diagnóstica

Las variables siguientes se utilizaron como técnicas diagnósticas de laboratorio para detección de patógenos:

Análisis microbiológico del agua: Detección de *Vibrio* sp, *Salmonella* sp, *Clostridium* sp y *E. coli* del agua remanente de las pilas e hisopados de las paredes y fondo. Se realizaron al final del ciclo larval.

Reacción de la Cadena de polimerasa (PCR): Se utilizaron especímenes PL3. La prueba se realizó por personal de los laboratorios de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Este se realizó al final del experimento, el día de la cosecha de larvas.

### Metodología estadística

Se utilizó la prueba de T de Student con parcelas pareadas para igual y diferente número de muestras ya que este se ajustó a la naturaleza del experimento, además que facilita el manejo de los tratamientos y la medición de las variables en estudio. En donde T<sub>0</sub>: testigo o control (tratamiento rutinario de larvas en la Estación de Los Cóbano) y T<sub>1</sub>: Aplicación del probiótico en el ciclo larval. Cada tratamiento contó con dos repeticiones físicas: T<sub>0</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> y T<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, donde se realizaron de 16 a 36 repeticiones en tiempo.

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

## Metodología económica

El análisis estadístico se acompañó de un análisis económico para evaluar la nueva tecnología investigada, para lo cual se hizo uso de la metodología propuesta por el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT, 1988), el cual consistió en un análisis de presupuesto parcial.

## Resultados y Discusión

### Sobrevivencia larval

Los resultados alcanzados en el análisis de esta variable, permiten afirmar que la aplicación del probiótico experimentado alcanzó una sobrevivencia del 42% contra un 30% del tratamiento testigo. Estadísticamente los tratamientos en estudio produjeron efectos diferentes en la sobrevivencia de larvas de camarón marino *Litopenaeus vannamei* ( $P \leq 0.05$ ).

Las larvas tratadas con probiótico mostraron en el estadio de Zoea un hilo fecal más largo que las del tratamiento testigo, indicador de un mayor consumo de alimento (microalgas), por lo que se decidió complementar con alimento artificial, y a su vez comenzar con los recambios de agua.

En el momento en que los recambios de agua formaron parte importante de la rutina, la bomba que extrae el agua de mar, sufrió desperfectos, imposibilitando los recambios de agua donde se desarrollaba el camarón durante la fase larval de Zoea I a Mysis II. Durante dos días consecutivos, no se eliminaron los desechos producidos por las larvas y microalgas, estas últimas al tener un ambiente favorable para la replicación, crecieron excesivamente y llegaron a colonizar el exoesqueleto de las larvas denominado fouling epibionte.

Otro factor que influyó en la sobrevivencia fue la mala calidad y carencia de microalgas como alimento. Una baja calidad del agua y de microalgas desencadenan una disminución en la sobrevivencia y crecimiento, retraso en la muda o estadio, deformidades anatómicas e incremento del fouling epibionte.

Está demostrado que en el estadio de Zoea se han asociado altas mortalidades con la calidad de alga que se brinda y una insuficiente concentración de la misma puede producir una falta de las reservas necesarias para completar su muda a Mysis (FAO, 2004).

A pesar de la baja sobrevivencia en todas las pilas, las larvas del tratamiento probiótico mostraron una diferencia superior del 12% (Fig. 1), demostrando lo mencionado por Aguirre y Ascencio, (2003), que el empleo de probióticos como alternativa, puede aumentar la sobrevivencia y mejorar el crecimiento de las larvas juveniles y adultas.

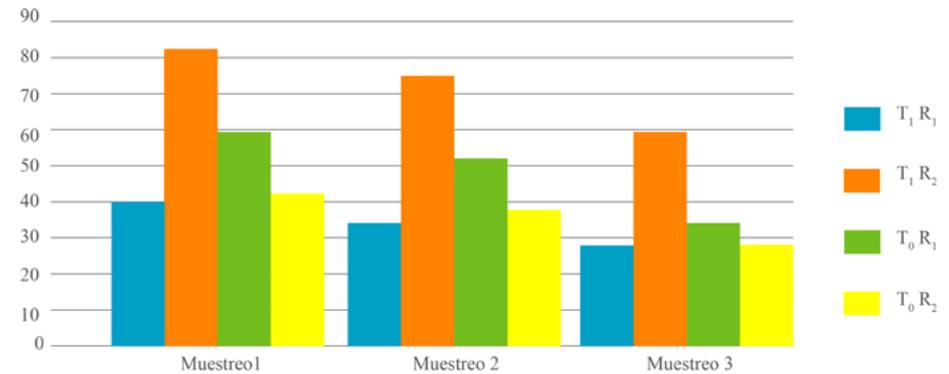


Figura 1. Muestras de sobrevivencia de larvas de camarones por tratamientos.

### Temperatura

La temperatura fue tomada una vez al día en ambos tratamientos. Se concentraron los datos en dos grupos de 8 días cada uno: primera y segunda semana. De los 32 datos obtenidos por tratamiento al final del experimento se compararon entre ambos para saber si hubo alguna variación.

Del pareo de los datos de T1 con T0, resultaron 12 pruebas de T donde se comparan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> y T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> entre sí.

Los tratamientos estadísticamente manifestaron efectos diferentes ( $P \leq 0.05$ ), reportándose las menores temperaturas en el tratamiento probiótico, y las mayores en el tratamiento control. Sin embargo, en T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> comparado con T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> en la primera semana y T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> contra T<sub>1</sub>R<sub>2</sub> de la segunda semana, se observó variación, debido a que el calentador en T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> presentó desperfectos de funcionamiento manifestando una diferencia de temperatura aproximadamente de 1°C.

Existen leves variaciones en las comparaciones de T<sub>1</sub> y T<sub>0</sub>, pero estas no afectaron el desarrollo larval del camarón pues se mantiene dentro de los rangos normales, tal como sostiene Brock y Main, (1994) quienes confirman que los intervalos óptimos para la cría de camarón oscilan entre 23°C a 30°C,

pero en 2004, FAO hace un énfasis que la temperatura para larvicultura debe ser mantenida entre 28°C y 32°C. En el cuadro 3 se muestran los promedios de temperatura registrados en la investigación. El tratamiento con mayor temperatura promedio en el experimento fue T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> con 31 °C, mientras que el tratamiento que se mantuvo con una temperatura menor fue T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> con 29.4 °C de promedio (Cuadro 3). La temperatura promedio durante todo el experimento de T<sub>1</sub> fue de 29.8 °C y en T<sub>0</sub> de 30.6 °C.

Cuadro 3. Promedio de temperatura en ambos tratamientos durante el experimento.

Tratamiento	T° primera semana	T° segunda semana	T° promedio durante el experimento
T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	29.9°C	29.0°C	29.4°C
T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	30.5°C	29.8°C	30.2°C
T <sub>0</sub> R <sub>1</sub>	31.0°C	31.0°C	31.0°C
T <sub>0</sub> R <sub>2</sub>	30.0°C	30.4°C	30.2°C

### Salinidad

La alta tolerancia de *L. vannamei* a diversas salinidades hacen que esta especie sea un excelente candidato para cultivarlo en diversos países del mundo (Lucas, 2009). Por lo general cada etapa del desarrollo tiene un rango óptimo de salinidad para su normal desarrollo: así, las larvas se desarrollan a salinidades entre 28 y 35 % mientras que las postlarvas tienen una tolerancia más amplia a los cambios de estas variables (Zein-Eldin, 1969).

De las lecturas diarias de la salinidad, se obtuvieron 32 datos por T de Student durante todo el experimento. Se hicieron dos grupos correspondientes a la primera semana y segunda semana, y se parearon todos los datos entre T<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> y T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> obteniendo 12 pares.

Estadísticamente la salinidad en los tratamientos en estudio produjeron efectos iguales, es decir que las salinidades se comportaron de igual manera para T<sub>1</sub> y T<sub>0</sub> exceptuando las comparaciones de la T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> contra T<sub>0</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>2</sub> contra T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> y T<sub>1</sub>R<sub>2</sub> contra T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> medidas en la primera semana del experimento producto de un cambio momentáneo en la salinidad del mar. Sin embargo el rango de salinidad estaba dentro de los parámetros por lo que no se percibió ningún problema (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de salinidad en ambos tratamientos.

Tratamiento	Primera semana	Segunda semana	Promedio durante el experimento
T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	33.3 ups	33.8 ups	33.5 ups
T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	32.9 ups	33.1 ups	33.0 ups
T <sub>0</sub> R <sub>1</sub>	34.4 ups	34.0 ups	34.3 ups
T <sub>0</sub> R <sub>2</sub>	34.8 ups	34.1 ups	34.0 ups

La pila que presento menos salinidad fue T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> de tratamiento probiótico con una salinidad media de 33 ups mientras que la de mayor salinidad fue T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> con una salinidad promedio de 34 ups.

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

### Análisis microbiológico

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

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

Durante el experimento tanto en el tratamiento probiótico como en testigo se detectó ausencia de *Vibrio* sp. consecuentemente se observó ausencia de luminiscencia al realizar las observaciones de nivel 1 estipuladas por la FAO en 2004.

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

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

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

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

### Hisopado

Según Garriques y Arévalo (1995), mencionan la existencia de teorías que explican el papel de los probióticos en los sistemas acuícolas cuando cepas seleccionadas de bacterias beneficiosas son inoculadas intencionalmente en los tanques de larvicultura, entre las cuales el mecanismo de acción de exclusión competitiva, en el presente experimento tuvo mayor relevancia. Ya que al agregar un microorganismo benéfico al medio acuático donde se encuentran las larvas se ve disminuida la proporción de bacterias patógenas que pueden presentarse, además la capacidad que poseen los probióticos

para competir por espacio de crecimiento en el medio y en las superficies solidas del cultivo (Fuller, 1989; Wang *et al.* (*sf*) y Gatesoupe, 1999).

Como se puede observar en el cuadro 5, la única bacteria que se aisló fue *E. coli*. La presencia de esta bacteria en el hisopado pudo deberse a factores tanto de manejo como de la flora normal del camarón marino. La *E. coli* es una bacteria común del tracto digestivo del hombre y de animales de sangre caliente. La mayoría de cepas que se encuentra en el intestino pueden causar daño al incrementarse los niveles normales de la población que forma parte de la flora intestinal. De la misma manera, la calidad del agua es esencial, no solamente para cubrir los requerimientos físicos y químicos de la especie de camarón que se va a cultivar, sino también para asegurarse de que no hay contaminación del agua, esta puede aislar bacterias debido a un inadecuado tratamiento de aguas o a la mala manipulación de la misma (Chávez Sánchez e Higuera Ciapara, 2003). Sin embargo, en el análisis la presencia de *E. coli* se mantuvo dentro de los rangos normales <1.1 NMP.

Cuadro 5. Resultados del análisis de hisopados.

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

### Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR)

Las enfermedades solicitadas para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa fueron Virus de la cabeza amarilla (YHV), virus de taura (TSV), virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus de mancha blanca (WSSV) para ambos tratamientos.

Al final de la investigación se realizó un solo análisis de las enfermedades planteadas: YHV, IHHNV y TSV, no fue posible la realización de WSSV debido a la falta de disponibilidad de materiales (kit para WSSV).

En uno de los resultados se observa la presencia positiva de IHHNV en T1R2 (tratada con probiótico). Las posibles razones por las que se obtuvo este resultado son variadas, entre estas un manejo inadecuado de las

hembras grávidas en el laboratorio, que según Lightner (1996) sostiene que los tejidos exudados durante el desove de hembras hacinadas y sus heces, pueden contener altos niveles de virus (IHHNV, enfermedad de parvovirus hepatitis hepatopancreática (HVP), enfermedad de *baculovirus penaei* (BP), etc.) e infectar hembras sanas. Cabe mencionar que estas hembras grávidas durante el desove, por falta de recursos en el laboratorio, se manejaban en grupos de hasta cuatro reproductoras por recipiente de 150 Lts de agua, considerándose una cantidad inadecuada, siendo el mismo Lightner (1996) quien menciona que deberían ser de 300 Lts de agua por hembra.

Otra de las causas de enfermedad pudo ser la contaminación del alimento vivo para reproductores por medio de los utensilios empleados para alimentar, por lo que Lightner (1996) sostiene que todo el equipo utilizado para alimentación de reproductores debe estar en condiciones asépticas antes, durante y después de su manipulación. Además el alimento fresco brindado a los reproductores debe estar certificado libre de las enfermedades víricas TSV, WSSV y YHV mediante técnicas especializadas de laboratorio para no ser un riesgo en la bioseguridad del lugar. No obstante, en la Estación no se cuenta con una infraestructura adecuada para la preparación del alimento, además la higiene no es apropiada pues no se utilizan soluciones adecuadas para la desinfección de cuchillos, redes, recipientes, etc.

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

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

a. Debido a la muestra: Una situación que puede dar lugar a un resultado falso positivo es la presencia en la muestra de ADN libre o de células muertas o irreversiblemente dañadas, ya que la PCR no es capaz de distinguirlo de las células vivas.

b. Falsos positivos debidos al sistema de detección de PCR (primers y

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

### Análisis económico

Toda investigación debe acompañarse de un análisis económico que nos permite considerar la mejor tecnología con base a sus costos y beneficios netos. Como se observa en el cuadro 6 del presupuesto parcial, las larvas de T<sub>1</sub> claramente presenta un mayor beneficio neto el cual, logra superar al testigo por una diferencia de \$749.22, mostrando que el ingreso puede ser mayor al emplear probióticos en el ciclo larvario. Esto confirma lo dicho por Alabi (2000), los probióticos son una herramienta que soluciona las grandes tasas de mortalidad en los primeros estadios del desarrollo larvario de crustáceos, por causa de bacterias oportunistas.

Cuadro 6. Análisis de presupuesto parcial\*.

ITEM	T0	T1
<b>Rendimiento medio (cantidad de larvas)</b>	540,000	756,000
<b>Rendimiento ajustado (10%, cantidad de larvas)</b>	486,000	680,400
<b>Beneficio Bruto**</b>	\$1944	\$2721.6
<b>Costos variables</b>		
<b>Flake</b>	\$1.74	\$1.74
<b>Calamar</b>	\$0.50	\$0.50
<b>BP</b>	\$4.33	\$4.33
<b>Espirulina</b>	\$1.37	\$1.37
<b>Artemia</b>	\$6.00	\$6.00
<b>Probiotico</b>	\$0.00	\$28.38
<b>Nauplio***</b>	\$450.00	\$450.00
<b>Costo total</b>	\$913.94	\$942.32
<b>Beneficio Neto</b>	<b>\$1,030.06</b>	<b>\$1779.28</b>

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

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

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

## Conclusiones

El uso de probióticos durante el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei* tiende a prescindir de la aplicación de químicos empleados para la prevención y tratamiento de enfermedades del camarón marino como yodo o formalina, haciendo de estos una alternativa amigable al medio ambiente y al consumidor final, contribuyendo a garantizar la inocuidad de este alimento.

Los resultados alcanzados en el análisis de la sobrevivencia larval del camarón marino permiten afirmar que el tratamiento con probiótico alcanzó una sobrevivencia del 42%, contra un 30% de sobrevivencia del tratamiento testigo.

Los parámetros temperatura y salinidad en ambos tratamientos no presentaron significancia estadística, manteniéndose dentro de los rangos normales, descartando ambos parámetros como posibles intermediarios en la sobrevivencia larval.

Los análisis microbiológicos de los tratamientos en estudio muestran la ausencia de patógenos recurrentes en camaricultura durante el levantamiento larvario, esto concuerda con las pruebas hechas a las larvas al final del ciclo, descartando agentes patógenos como causa de baja sobrevivencia.

El análisis de Reacción de la Cadena de Polimerasa mostró ser positivo a la enfermedad de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, lo que indica la presencia del virus únicamente en una de las repeticiones del tratamiento probiótico.

En la evaluación económica el beneficio neto del tratamiento probiótico superó en \$749.22 al tratamiento testigo, ya que se obtuvo de beneficio neto \$1,030.06 y \$2,779.28 en el tratamiento testigo y con probiótico respectivamente. Por tanto se considera que en el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei* puede reducir los costos de producción al prescindir de sustancias químicas como formalina para tratamiento de enfermedades.

## Recomendaciones

Aplicar probióticos en el ciclo larvario de *Litopenaeus vannamei*, ya que promueven su desarrollo en condiciones saludables disminuyendo los costos de producción de esta etapa al reducir la utilización de otros tratamientos de elevados costos.

Continuar investigando el uso de probióticos en camaricultura para generar más información en el país, evaluando su comportamiento en estanques de engorde de camarón y con diferentes tipos de probióticos.

Para evitar contaminación iatrogénica se recomienda que las instalaciones de maduración se encuentren separadas del laboratorio de levantamiento larvario e implementar un área de cuarentena adecuada para los reproductores, evitando posibles infecciones y contagios.

Poner en práctica los estándares de higiene al momento de preparar el alimento fresco de los reproductores, manteniendo en su debido orden e higiene todo el material utilizado para no contaminar con patógenos el área de maduración.

Para reducir la contaminación, se sugiere separar al personal que labora en cada área del laboratorio.

## Bibliografía

- Aguirre, G.; F. Ascencio. 2003. Probióticos, herramienta alternativa para los acuicultores. Enfoque acuícola 2(5) MX. P. 48
- Alabi, A. O. 2000. "The use of probiotics techniques for controlling bacterial diseases in marine invertebrates hatcheries". Journal of Shellfish Research, 19(1): 65-100
- Brock, J.A.; Main, K.L. 1994. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A. 241 p.
- Chávez-Sánchez M.C.; Higuera-Ciapara, I. 2003. Manual de Buenas Prácticas de Producción Acuícola de Camarón para la Inocuidad Alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) [Por encargo de SENASICA], A.C. MX. pp. 30-31.
- CIMMYT. 1988. Formulación de recomendaciones a partir de datos Agronómicos: Manual Metodológico de Evaluación Económica. MX, D.F. P 13-25.
- Escuela Politécnica Superior Universidad de Almería (UAL). 2010. Cuaderno de prácticas de microbiología de productos, España. P. 18

- FAO, Servicio de Recursos de Aguas Continentales y Acuicultura. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. [en línea]. Roma [citado 26 de abril del 2011]. Disponible en ASCII: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5040s/y5040s00.pdf>
- FDA. 2008. Enhanced Aquaculture and Seafood Inspection - Report to Congress. [citado 24 de octubre del 2011] United States [en línea] Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/ProductSpecificInformation/Seafood/SeafoodRegulatorProgram/ucm150954.htm>
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. AFRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378.
- Garrigues, D.; Arevalo, G. 1995. An Evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: BROWDY C.L. & HOPKINS, J.S. (eds.) Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, US, 53-59.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. Aquaculture, 180: 147-165
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases in penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, US.
- Lucas, A. 2009. Requisitos para el cultivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, criados en aguas de baja salinidad: el agua modificación y estrategias nutricionales para mejorar la producción [en línea]. US [citado 26 de julio del 2012], disponible en <http://www.royluke@auburn.edu>.
- Microbial. 2009. Los falsos positivos del PCR : ¿Solamente falsas alarmas?. Revista de estudios Newsletter Microbial, (5): 1-2.
- NORMA SALVADOREÑA OBLIGATORIA NSO 13.07.01:08. 2009. Agua, Agua potable (Segunda actualización). [citado en 14 de junio del 2012] El Salvador [en línea] disponible en: [http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/normas/NORMA\\_AGUA\\_POTABLE\\_2\\_a.pdf](http://usam.salud.gob.sv/archivos/pdf/normas/NORMA_AGUA_POTABLE_2_a.pdf)
- Wang, X.H.; Li, H.R.; Feng, J.; Han, L.L.; Qi, Z.Z.; Li, J.; Li, Y.; Zhang, X.H.; Ji, W.S.; Xu, H.S.; Yang, X.S.; Ma, J.K.; Yu, X. Z., Sun, X.X. fide. Sf. Feasibility Study on the Delivery of a Probiotic Flora to *Penaeid* Larvae and the Bacterial Flora in the Digestive Tract of Adult Shrimp. Ocean University of Qingdao, P.R. CN.
- Zein-Eldin, G. 1969. Penaeid nutrition. Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, editado por G.D.