

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN LA
ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)
EN EL MUNICIPIO DE TUMACO**

**LORENA PATRICIA ORTEGA VILLOTA
KARINA FUERTES ROMERO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN LA
ALIMENTACIÓN DE LARVAS DE CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)
EN EL MUNICIPIO DE TUMACO**

**LORENA PATRICIA ORTEGA VILLOTA
KARINA FUERTES ROMERO**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola**

Presidente:

**ÁLVARO JAVIER BURGOS ARCOS
Zoot, M. Sc., Ph.D Biotecnología**

Codirector:

**MARCO ANTONIO IMUÉS FIGUEROA
Zoot, M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

ALVARO JAVIER BURGOS ARCOS, Zoot, M. Sc., Ph.D
Director

CAMILO LENIN GUERRERO ROMERO
Ingeniero en Producción Acuícola
Jurado Delegado

ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN, BM, Esp
Jurado

Dedicado a:

Primordialmente a Dios, que me ha acompañado durante toda mi vida guiándome para alcanzar todas mis metas y que siga adelante pese a las dificultades que se me presentaron durante todo mi periodo de estudio en la Universidad y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis Padres, CLARA ELIZA VILLOTA y MARCIAL ORTEGA quienes son las personas que más quiero en la vida y que gracias a ellos a su comprensión, apoyo y sobretodo la crianza; me han enseñado los valiosos valores como son la honradez, la humildad, la responsabilidad y la generosidad que son los pilares fundamentales de una gran persona.

A mis hermanos VIVIANA ORTEGA, CARLOS ORTEGA Y GIOVANNY ORTEGA que han sido mis amigos, confidentes y que con su apoyo incondicional también han aportado su granito de arena para que mi sueño de ser profesional se cumpla.

A Daniel Castro, mi novio, el amor de mi vida por enseñarme a ponerle una sonrisa a la vida, indicándome que cuanto más oscura se pone la noche, es porque el amanecer se avecina, le agradezco infinitamente por su comprensión, ayuda desinteresada, paciencia y por su gran amor; a doña Claudia, Omar a mis cuñados que a pesar de la distancia han sido un apoyo fundamental para poder culminar esta etapa de mi vida satisfactoriamente muchas gracias.

A mis amigos y demás compañeros con quienes compartí anécdotas, vivencias y muchos momentos agradables durante el periodo de estudio de mi carrera.

A mis profesores por formar día a día profesionales en esta maravillosa rama de la ciencia.

LORENA PATRICIA ORTEGA VILLOTA

Dedicado a:

Principalmente quiero dar mis agradecimientos a Dios, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el proceso de investigación.

De igual manera, todo mi cariño y amor para mi madre MIRIAM ROMERO DELGADO, por ser el pilar más importante demostrándome siempre su amor y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias, además por ser la persona que hizo todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a usted, por siempre mi corazón y mi agradecimiento. A mi padre LEONEL DEMETRIO FUERTES que a pesar de nuestra distancia física siento que estás conmigo siempre y aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos sé que este momento hubiera sido tan especial para ti como lo es para mí. A mis hermanos CAROLINA, YECENIA, DANILO, ROBINSON Y BRAYAN por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuestos a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi novio Fabián Villota, que has sido el impulso durante todo el transcurso de mi tesis y el pilar principal para la culminación de la misma, que con tu apoyo constante y amor incondicional te has convertido en amigo y compañero inseparable, fuente de sabiduría, calma y consejo en todo momento, gracias por estar a mi lado. A mis amigos, que son personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, ahora debo regresarles un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado, con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes.

Ing. Camilo Rodríguez y nuestro presidente de tesis, Álvaro Burgos, a ustedes solo me queda darles gracias por su valiosa guía y asesoramiento en la misma. Finalmente, a todos mis maestros que en este andar por la vida influyeron con sus lecciones y experiencias en mi formación personal y profesional preparándome para los retos que impone la vida; a todos y cada uno de ellos les dedico estas páginas.

KARINA FUERTES ROMERO

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

ÁLVARO JAVIER BURGOS ARCOS	Zootecnista, Esp, PhD. Profesor de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
CAMILO LENIN GUERRERO ROMERO	Ingeniero en Producción Acuícola Técnico de Laboratorio Universidad de Nariño.
ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN	BM, Esp. Profesor de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
MARCO ANTONIO IMUÉS FIGUEROA	Zootecnista, Esp, MSc. Profesor de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.
DOLLY MARGOT REVELO ROMO	Bióloga, Esp, MSc. Profesora de Microbiología Universidad de Nariño.
WILMER RENE SANGUINO ORTIZ	Ingeniero en Producción Acuícola, Director del Departamento de Recursos Hidrobiológicos. Programa de Ingeniería en Producción Acuícola.
ANGEL ALIRIO RODRÍGUEZ	Biólogo, Laboratorista de Microbiología Universidad de Nariño.
LUIS ALFONSO SOLARTE PORTILLA	Zootecnista, Esp. Secretario Académico de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.

PIEDAD MEJÍA SANTACRUZ

Secretaria del Departamento de
Recursos Hidrobiológicos

OSCAR MEJÍA SANTACRUZ

Auxiliar del Centro de Documentación
Especializada del Departamento de
Recursos Hidrobiológicos Universidad
de Nariño

A los demás profesores y funcionarios de la Universidad de Nariño, que contribuyeron para la ejecución de esta investigación y a todas las personas que de una u otra forma prestaron su apoyo.

CONTENIDO

		Pág.
1.	INTRODUCCIÓN	22
2.	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GENERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.	MARCO REFERENCIAL	25
3.1	BIOLOGÍA DEL CAMARÓN	25
3.1.1	Clasificación taxonómica.	25
3.1.2	Estadios larvales.	25
3.2	ALIMENTACIÓN EN LARVAS DE CAMARÓN	32
3.3	INMUNOESTIMULANTES	34
3.3.1	Beta-glucanos.	34
3.3.2	Péptidoglicanos (PG).	34
3.3.3	Lipopolisacáridos (LPS).	35
3.4	PROBIÓTICOS	35
3.4.1	Importancia de los probióticos.	39
3.4.2	Mecanismos de acción.	40
3.4.3	Selección de los probióticos.	41
3.4.4	El uso de probióticos en la acuicultura.	42

3.4.5	Los probióticos y la calidad del agua en la acuicultura.	44
3.4.6	Limitaciones que presenta el estudio en probióticos destinados para la acuicultura.	44
3.4.7	Encapsulación de probióticos.	45
3.4.8	Posibles modos de acción de los probióticos.	46
3.4.9	Bacterias que predominan en el tracto digestivo de organismos acuáticos.	47
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.1	LOCALIZACIÓN	49
4.2	MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS	51
4.2.1	Materiales.	51
4.2.2	Equipos.	51
4.2.3	Insumos.	52
4.3	MATERIAL BIOLÓGICO	52
4.4	PERIODO DE ESTUDIO	53
4.5	PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	53
4.5.1	Obtención de la muestra.	53
4.5.2	Proceso de siembra.	54
4.5.3	Purificación e identificación de bacterias.	55
4.5.4	Mediciones de crecimiento bacteriano.	56
4.6	PLAN DE MANEJO	57
4.6.1	Adecuación de instalaciones.	57

4.6.2	Monitoreo de los animales.	57
4.6.3	Incorporación de probiótico al alimento y alimentación.	58
4.7	MUESTREO DE EJEMPLARES Y MONITOREO DE PARAMETROS	58
4.8	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	58
4.8.1	Tratamientos.	59
4.8.2	Formulación de hipótesis.	59
4.8.3	Variables a evaluar.	60
4.8.3.1	Tasa de crecimiento simple (TCSL)	60
4.8.3.2	Supervivencia (% S)	60
4.8.3.3	Relación beneficio/costo (RBC)	60
5.	RESULTADOS.	62
5.1	PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LA CEPA Y SU CRECIMIENTO.	62
5.1.1	Tinción de Gram.	62
5.1.2	Agar Mac Conkey.	63
5.1.3	Tinción de Endospora.	63
5.1.4	Prueba de Catalasa.	64
5.1.5	Prueba de motilidad.	64
5.1.6	Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).	66
5.2	TASA DE CRECIMIENTO SIMPLE PARA LONGITUD (TCSL).	68
5.3	SUPERVIVENCIA DE LOS CAMARONES.	69

5.4	PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA.	70
5.4.1	Temperatura.	70
5.4.2	Oxígeno disuelto.	71
5.4.3	Salinidad.	71
5.4.4	Amonio.	72
5.5	RELACIÓN BENEFICIO / COSTO.	73
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	75
6.1	TASA DE CRECIMIENTO SIMPLE PARA LONGITUD (TCSL).	75
6.2	SUPERVIVENCIA	77
6.3	PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA	83
6.3.1	Temperatura.	83
6.3.2	Oxígeno disuelto.	83
6.3.3	Salinidad.	83
6.3.4	Amonio.	84
6.4	ANALISIS DE COSTOS	84
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
7.1	CONCLUSIONES	86
7.2	RECOMENDACIONES	87
8	BIBLIOGRAFÍA	88
	ANEXOS	92

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Nauplio.	25
Figura 2. Zoea.	26
Figura 3. Mysis I.	28
Figura 4. Mysis II.	28
Figura 5. Mysis III.	29
Figura 6. Post larva.	30
Figura 7. Juvenil.	31
Figura 8. Empresa ECOMAR	49
Figura 9. Universidad de Nariño, Pasto-Ñariño	49
Figura 10. Recolección de la muestra	53
Figura 11. Proceso siembra	54
Figura 12. Diluciones seriadas esquema de colonia de bacterias	56
Figura 13. <i>Bacillus sp</i> Objetivo 100x	61
Figura 14. <i>Bacillus sp</i> con endospora 100x	63
Figura 15. Motilidad positiva	64
Figura 16. Curva de crecimiento bacteriano de <i>Bacillus sp</i>	60
Figura 17. Resultados de las diluciones seriadas	61
Figura 18. Curva de temperatura promedio diario (C°).	69

Figura 19.	Curva del comportamiento diario de Oxígeno disuelto (mg/L)	70
Figura 20	Comportamiento diario de Salinidad (ppM)	71
Figura 21.	Curva del comportamiento diario de Amonio (mg/L)	71
Figura 22.	Tasa de crecimiento simple para longitud (TCSL)	75
Figura 23.	Porcentaje de supervivencia en los diferentes tratamientos	77
Figura 24.	Relación beneficio costo	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución de alimento más el probiótico en los Tratamientos	58
Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas	65
Tabla 3. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	67
Tabla 4. Tasa de Crecimiento Simple cm/hora	68
Tabla 5. Porcentaje de supervivencia en los tratamientos durante la investigación	69
Tabla 6. Costos parciales	72
Tabla 7. Relación Beneficio/ Costo	73

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Microorganismos utilizados como probióticos.	39

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Protocolo de la tinción de Gram	92
Anexo B. Muestreo de talla para cada uno de los tratamientos	93
Anexo C. Incremento de talla promedio por tratamiento	98
Anexo D. Análisis de Varianza para TCS	101
Anexo E. Supervivencia Prueba de Brand-Snedecor	103
Anexo F. Parámetros físico químicos	104
Anexo G. Datos promediados de temperatura de los tratamientos	105
Anexo H. Análisis de varianza para temperatura 6am. 12M y 5pm	106
Anexo I. Datos Oxígeno Disuelto durante el proyecto	109
Anexo J. Análisis de varianza para Oxígeno Disuelto 6am y 5pm	110
Anexo K. Datos Salinidad durante el proyecto	112
Anexo L. Análisis de Varianza para Salinidad	113
Anexo M. Amonio durante el proyecto	114
Anexo N. Análisis de varianza para Amonio	115

GLOSARIO

ADHERENCIA: proceso de unión de bacterias a células u otras superficies, previo a la proliferación.

COLONIZACIÓN: capacidad de las bacterias para establecerse y multiplicarse en la piel y/o mucosas del huésped en cantidades suficientes que permitan mantener un cierto número poblacional; sin que su presencia determine respuestas clínicas ni inmunológicas.

DOSIS PROBIÓTICA: concentración de microorganismos probióticos (en número de células/ml probiótico) que está disponible para el organismo acuático.

HOSPEDERO: organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí.

MICROBIOTA: se refiere a la comunidad de microorganismos vivos residentes en el intestino.

PROBIÓTICO: suplemento microbiano formado por un cultivo simple o mixto de microorganismos seleccionados que al adicionarlo al agua o al alimento, disminuye la presencia de patógenos.

PROMOTOR: factor que promueve o induce un efecto particular.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA: expresión del número viable de bacterias por muestra.

VIABILIDAD: capacidad de la bacteria de dividirse y formar una colonia en medio de cultivo, expresada como UFC.

RESUMEN

Esta investigación evaluó bacterias con potencial probiótico, las cuales se obtuvieron a partir del aislamiento del tracto digestivo de juveniles silvestres de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y este a su vez fue comparado con un probiótico comercial con el fin de mejorar la supervivencia y el crecimiento de larvas de la misma especie desde las primeras 96 horas post eclosión hasta alcanzar la fase de postlarva (PL12). La primera fase de este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Acuícola del Programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño y la segunda fase se desarrolló en la empresa productora de larvas de camarón Ecomar situada el Municipio de Tumaco.

Se emplearon 4500 ejemplares con una longitud promedio de 0.2 cm estos fueron sembrados en 15 recipientes a una densidad de 100 animales por litro; Se aplicó un diseño completamente aleatorio distribuidos en cinco tratamientos y cada uno con tres replicas ordenados de la siguiente manera: T₀= alimento comercial con 50% de proteína; T₁= 1mL de probiótico comercial/1 gr de alimento comercial; T₂= 1 mL probiótico aislado/1 gr de alimento comercial; T₃= 2 mL probiótico aislado/1 gr de alimento comercial y T₄= 3 mL probiótico aislado/1 gr de alimento comercial.

Se utilizó un diseño completamente al azar donde se realizó un ANOVA, prueba de "Tukey" y "Brand-Snedecor". Las variables estudiadas fueron; tasa de crecimiento simple longitud; porcentaje de supervivencia y análisis parcial de costos.

En las variables tasa de crecimiento simple longitud y supervivencia, el análisis de varianza indicó que existen diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$); evidenciándose en el T₄ con 0,00477 cm/hora en comparación con el T₀ en longitud; para supervivencia fue de 94,67% para T₄, comparada con T₀ = 37,11%. Los resultados señalan que la incorporación de las bacterias con posible potencial probiótico en el alimento mejora notablemente la tasa de crecimiento, la supervivencia y la mejor relación beneficio costo de las fases de Mysis hasta postlava 12 de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

ABSTRACT

This research evaluated bacteria with probiotic potential which were obtained from the isolation of digestive tract of wild juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* and this in turn was compared with a commercial probiotic with the aim of improving the survival and growth of larvae of the same species from the first 96 hours post-eclosion/ until reaching a post-larva phase (PL12). The first phase of this project was conducted in the laboratory of Aquaculture Health in the program of Aquaculture Production Engineering of the University of Nariño (Universidad de Nariño) and the second phase was carried out in the larva-producing company Ecomar located in the municipality of Tumaco.

With an average length of 0.2 cm, 4,500 specimens were used and these were seeded in 15 containers at a density of 100 animals per liter. A fully randomized design was applied, distributed among five treatments, each with three replicas arranged as follows: T₀=commercial food with 50% protein; T₁=1mL of commercial probiotic/1g of commercial food; T₂= 1mL of isolated probiotic/1g of commercial food; T₃=2mL of isolated probiotic/1g of commercial food, and T₄= 3gr of isolated probiotic/1mL of commercial food.

A design was used at random in which ANOVA, “Tukey” test, and “Brand-Snedecor” were applied. The variables studied were simple length growth rate, survival percentage, and cost analysis.

In the variables simple length growth rate and survival rate, the variance analysis displayed significant statistical differences ($p < 0.05$) which were evidenced in the T4 with 0.00477 cm/h, compared with the T0 in length; as for survival, it was 94.67% for T4, compared to T0=37.11%. The results indicate that the inclusion of bacteria with possible probiotic potential in the food improves outstandingly the growth and survival rates, as well as the best relation benefit – cost of the phases Mysis up to postlarva 12 of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

1. INTRODUCCIÓN

La camaronicultura es una de las actividades de la producción acuícola de mayor crecimiento en las últimas tres décadas a nivel mundial, reportándose la existencia de granjas camaroneras en más de 50 países, aunque la mayor producción en los últimos veinte años está centrada en 12 países entre el sudeste de Asia y América Latina. A pesar de lo anterior, los problemas sanitarios, bajas supervivencias y altas conversiones alimenticias entre otros, continúan siendo cuellos de botella en la pérdida potencial de la producción¹.

“En la actualidad, el nivel de la producción de camarón de cultivo representa el segundo reglón en importancia dentro de la acuicultura nacional, superado por el volumen de la producción del sector piscícola. No obstante, a diferencia de este último sector, la cadena de camarón de cultivo se encuentra bastante integrada en todos sus eslabones tanto de manera horizontal como vertical”². Actualmente la camaronicultura es una actividad importante por el aspecto económico hacia los núcleos poblacionales en Tumaco, la zona costera del pacífico y las divisas que genera; por lo anterior, es de vital importancia la búsqueda de tecnologías que permitan mejorar los parámetros productivos de camarón, por cuanto el manejo de animales correctamente alimentados y cultivados bajo condiciones de buena calidad de agua mediante procesos biotecnológicos innovadores como los microorganismos probióticos incidirán en mayores posibilidades de resistir y superar el ataque de posibles agentes patógenos sin el uso de sustancias antibióticas.

El ambiente deteriorado y las condiciones de cultivo son factores predispuestos que estresan al animal disminuyendo su capacidad de crecimiento y supervivencia. Además el brote de bacterias puede causar importantes mortalidades en granjas de camarón y las bacteriosis deben ser controladas mediante el tratamiento con antibióticos, sin embargo su uso representa un riesgo ambiental, así como la propagación de genes resistentes a éstos, por ende los probióticos han merecido especial atención por parte de los investigadores que

¹KIM, S; y ABELE, G. Importancia del camaron en America. Ecuador. Disponible en internet URL: http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020148423/1020148423_02.pdf

²ESPINAL C, MARTÍNEZ H y GONZÁLEZ F. La Cadena Del Camarón De Cultivo En Colombia Una Mirada Global De Su Estructura Y Dinamica, Bogota. Disponible en internet URL: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511215737_caracterizacion_camaron_cultivo.pdf
fecha

buscan alternativas al uso de factores de crecimiento tradicionales en el campo de los microorganismos benéficos³.

De acuerdo con Cutting⁴, el uso de especies de bacterias probióticas formadoras de esporas como los *Bacillus sp*, han sido utilizadas en suplementos dietéticos en la alimentación animal. Cabe resaltar que su estabilidad al calor y la capacidad de supervivir a la barrera gástrica los hace atractivos como aditivos alimenticios, a la vez su uso se está expandiendo rápidamente con el aumento de investigaciones que demuestran su capacidad para: la estimulación inmunológica, actividades antimicrobianas y exclusión competitiva; a pesar de que aún no han aclarado de manera contundente cómo actúan.

En la producción camaronera el propósito del uso de bacterias probióticas es mejorar o compensar las funciones de la población microbiana autóctona que habitan en el tracto digestivo o la superficie del cuerpo de las larvas y postlarva de camarón, con la consecuente mejora de sus parámetros productivos; por lo tanto con una mejor relación beneficio/costo, para este sector productivo; por lo tanto, el uso de probióticos está siendo cada vez más utilizado, como una opción moderna al uso de sustancias poco amigables con el medio ambiente en organismos hidrobiológicos, por lo anteriormente expuesto se realizó la presente investigación.

³ KIM, S; y ABELE, G. op cit.

⁴ CUTTING, S. Bacillus probiotics. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, no 2, p. 214-220.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar bacterias con potencial probiótico en la alimentación de larvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en el Municipio de Tumaco.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar, Identificar y masificar el cultivo de posibles microorganismos probióticos obtenidos a partir de la microbiota del tracto digestivo de juveniles silvestres *L. vannamei* provenientes de la bahía de Tumaco.
- Evaluar los parámetros zootécnicos del uso de un probiótico comercial y el probiótico extraído de las larvas silvestres de camarón *L. vannamei*.
- Determinar la relación beneficio costo.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 BIOLOGÍA DEL CAMARÓN

3.1.1 Clasificación taxonómica. La clasificación taxonómica de los camarones *Peneidos* americanos la realizó el especialista Burkenroad, reportada por Fabricio⁵. La posición taxonómica de los camarones *Peneidos* se define como:

PHYLUM	Artrópoda
CLASE	Crustacea
SUBCLASE	Malacostrácea
SERIE	Eumalostraca
SUBORDEN	Eucarida
ORDEN	Decapada
SUBORDEN	Natantia
SECCION	Penaeidae
FAMILIA	Penaeidae
SUBFAMILIA	Penaeidae
GENERO	<i>Litopenaeus</i>
ESPECIE	<i>Vannamei</i>

3.1.2 Estadios larvales. Jiunn L, et. al⁶ y Morales⁷ afirman que la identificación diaria de los estadios de larvas de camarón es de suma importancia porque permite saber el tipo de alimento que se debe agregar y la concentración del mismo, además mencionan las siguientes etapas larvales:

⁵FABRICIO, B. *Los peneidos* en la acuicultura semi-intensiva. Mexico: departamento de investigaciones del litoral, 2000 (citado el 14 de noviembre del 2008). Disponible en internet URL: www.Investigacionesporautorwikipediacuicultura.com

⁶JIUNN, L; GARCIA, M.; MONCADA, L. 1992. Introducción a la reproducción de Larvas de camarones *Penaeusvannamei*. San Lorenzo. Valle, Honduras

⁷MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de De Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

- **Nauplio:** es el primer estadio larvar, posee una forma piriforme y presenta sólo tres pares de apéndices cefálicos: anténulas, antenas y mandíbulas, con los que nada como se muestra la figura 1. A medida que van mudando y desarrollándose van incorporando segmentos entre las mandíbulas y la región final del cuerpo.

Figura 1. Nauplio



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

- **Zoea:** existen tres sub estadios de zoea. En zoea la larva empieza a alimentarse. La transición de nauplio V a zoea I es la etapa más crítica del desarrollo larvario, ya que las más grandes mortalidades pueden ocurrir en este período, su principal característica son los maxilipedos como primordiales apéndices natatorios como se indica la figura 2.

Figura 2. Zoea



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

- **Mysis:** según reportes de la FAO⁸ determina que la larva en esta fase presenta un cuerpo alargado haciéndose más parecido a un pequeño camarón y con rasgos específicos más definidos. Este estadio tiene 4 subestadios determinados por respectivas mudas. La longitud total varía entre 2,6 y 5,0 mm. Los rasgos más notorios y característicos que definen al estadio son la presencia de exopoditos setosos, nadadores y bien desarrollados en los maxilípedos y pereiópodos, y el desarrollo en forma paulatina, de los pleópodos rudimentarios en el abdomen, pero sin sedas.

El cefalopereion presenta un rostro puntiagudo que se proyecta entre los ojos y los sobrepasa, y un par de espinas supra-orbitales de menor tamaño. Los bordes antero-laterales del caparazón presentan una serie de 5 a 7 espinitas. El resto del caparazón es liso y en vista lateral puede distinguirse el “órgano dorsal” en forma de una elevación, ubicado en el tercio posterior. A partir del segundo estadio de mysis aparecen un par de espinas hepáticas, mientras que las espinas rostrales superiores se presentan a partir de la tercera mysis.

La anténula presenta tres segmentos basales y dos ramas terminales, una externa y una interna, y cuya estructura no varía a lo largo del desarrollo del estadio. La antena, contrastando con el estadio anterior, posee el exopodito transformado en escama, y en forma espatular, bordeado de sedas o setas y a partir del 2° subestadio el proceso más externo se diferencia en una fuerte espina. El endopodito siempre alargado, en el último subestadio, mide casi el doble de la

⁸ Boschi, E., Scelzo, M. La Acuicultura en America Latina. disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/AC866S/AC866S35.htm>

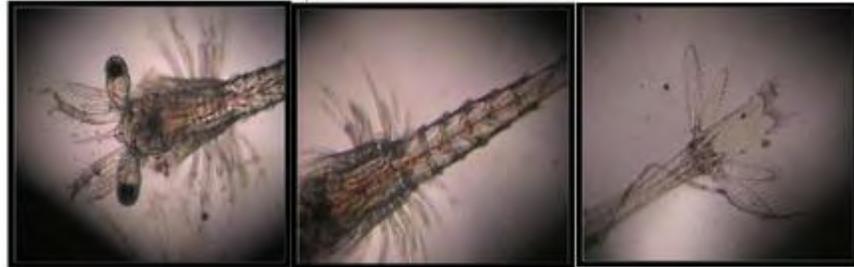
escama, siendo además segmentado. La estructura de los apéndices bucales, como mandíbula, maxílula y maxila y los maxilípedos 1° y 2° no varían mayormente. Son funcionales el 3° par de maxilípedos y los 5 pares de pereiópodos a partir de la segunda mysis, y de estos los tres primeros son quelados. Tanto los maxilípedos como los pereiópodos tienen muy desarrollados los exopoditos.

El pleon o abdomen se caracteriza por presentar los cinco primeros segmentos de tamaño y estructura similares. El 6° segmento es más desarrollado. Los segmentos 3, 4, 5 y 6 presentan en la línea media dorsal y posterior, una espina muy desarrollada que en algunos ejemplares es poco evidente o falta en algunos segmentos, especialmente en los primeros, aunque esto puede atribuirse a variaciones intraespecíficas. El borde posterolateral (placa tergo lateral) de los somitos 5° y 6° presenta además una prominente espina. En la región ventral de los somitos 1° – 5° del abdomen y a partir de la segunda mysis hacen aparición los pleópodos, siempre en forma rudimentaria y sin setas o sedas. El diferente grado de desarrollo caracteriza cada subestadio, aunque se observa cierto grado de variación en el tamaño de los mismos.

La parte caudal está formada por el telson y los urópodos. El telson sufre variaciones de forma en los distintos subestadios, es espatular, bordeado por ocho procesos pares y con una escotadura central en los primeros subestadios, desapareciendo está totalmente en la última mysis. Tanto las formas de la placa como la de la escotadura central y su relación con los procesos externos, caracterizan cada subestadio. Uno de los rasgos más particulares de los estadios de mysis es la forma de natación. La agitación de los últimos maxilípedos y principalmente los exopoditos de los pereiópodos, permiten una eficaz y veloz natación a la larva en este estadio. La natación se produce, en su mayor parte, con la cabeza hacia abajo y avanzado hacia atrás con el abdomen hacia adelante.

a. Mysis I: en la figura 3 se muestra un sub estadio crítico, ya que ocurren cambios drásticos, los uropodos crecen más, pereiópodos funcionales aparecen. Pequeños brotes que serán los pleópodos. Longitud promedio 3.4 mm.

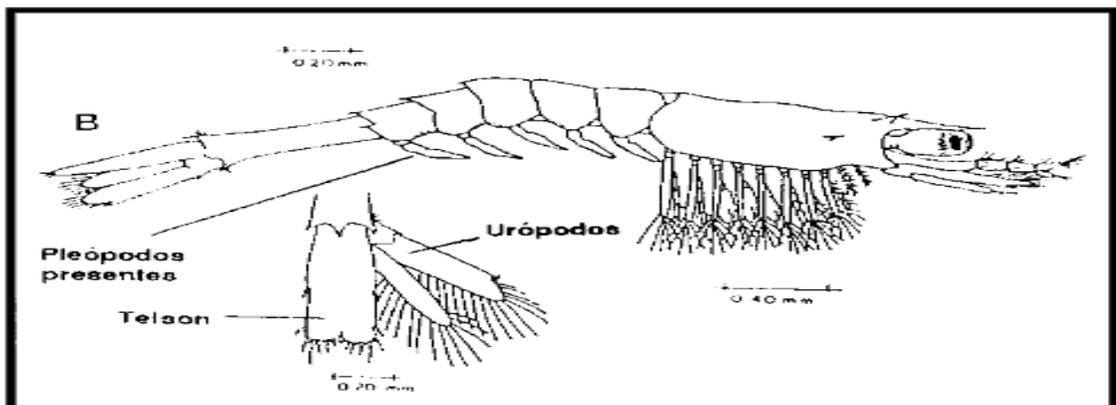
Figura 3. Mysis I.



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

b. Mysis II: en la figura 4 aparecen los pleopodos en los segmentos abdominales como proyecciones en forma de gancho. Longitud del cuerpo 4 mm.

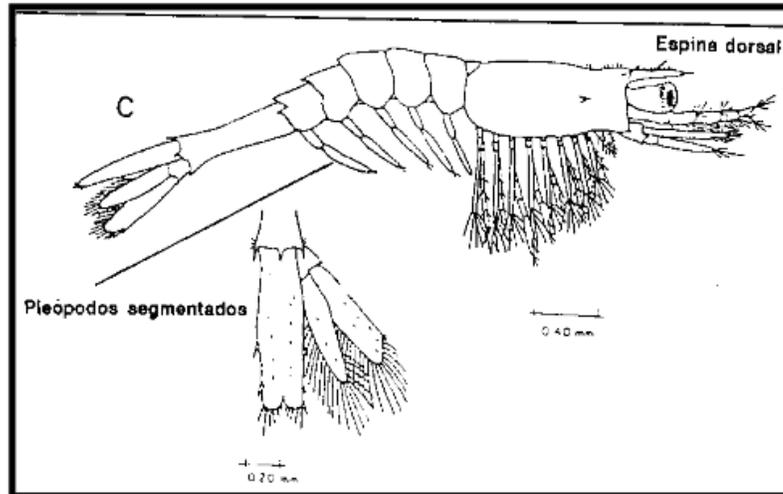
Figura 4. Mysis II.



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

c. Mysis III : según la figura 5 tienen formado los pleopodos aparecen las primeras espinas dorsales en el rostrum.

Figura 5. Mysis III.



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

- **Post larva** Jiunn L, et. al⁹ menciona que al final del proceso del desarrollo larval en el camarón está marcado por la aparición de la postlarva, de aspecto muy semejante al juvenil y adulto. El rasgo morfológico más notorio es la presencia de un rostro romo y de pleópodos setosos, además de diferencias menores en cuanto a la forma de la anténula, antena, maxilípedos, pereiópodos, pleópodos y forma del telson. Contrariamente a lo que se podía esperar, los exopoditos de los periópodos no se reducen bruscamente en la primera postlarva, como ocurre en otras especies de peneidos, sino que la reducción es gradual a lo largo de las distintas mudas de las postlarvas, como se muestra en la figura 6.

⁹ JIUNN, L; GARCIA, M.; MONCADA, L. op cit

Figura 6. Post larva.



a. Parte anterior de la post larva observación de ojo, anténula, antena; b. Parte central de la Post larva pereiópodos, pleópodos. Parte posterior telson

MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

- **Juvenil y Adulto:** según Méndez¹⁰ en esta etapa el camarón se encuentra bien diferenciado en todos sus componentes anatómicos, el rostro posee dos dientes ventrales como se observa en la figura 7.

¹⁰MÉNDEZ, M. 1981. Claves de investigación y distribución de los langostinos y camarones (Crustácea: Decapoda). Del mar y ríos de la costa del Perú. Callao, Perú.

Figura 7. Juvenil.



MORALES, V. 1995. Levantamiento larvario de camarones peneidos. Temas de Acuicultura. No1. PRADEPESCA.

3.2 ALIMENTACIÓN EN LARVAS DE CAMARÓN

Calderón¹¹ menciona que, una vez que los nauplios han sido transferidos a los tanques de cultivo, el alimento que se suministre variará según la fase de desarrollo. Se pueden realizar cultivos mono específicos (laboratorio destinado a su producción) o blooms naturales de algas (dentro del tanque de larvicultura). Las algas monoespecíficas más utilizadas son *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* spp. Estos cultivos son llevados desde cepas (tubos de ensayo con algas escogidas por su calidad) hasta el volumen final por inoculación sucesiva en tanques de volumen cada vez mayor. La densidad final es de 300.000– 1.000.000 cel/mL dependiendo del tamaño de la célula, en tanques de una a dos toneladas de agua.

Los blooms naturales son realizados directamente dentro del tanque de larvas; el agua con la que se llena el tanque no se filtra, permitiendo de esta forma un afloramiento de algas que se encuentran en el medio natural proveyendo de esta manera una diversidad de algas. Para mantener las poblaciones se utilizan

¹¹ CALDERÓN, J. El Estado Actual de la Acuicultura en Ecuador y Perfiles de Nutrición y Alimentación. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. Ecuador. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab487s/AB487S08.htm>

fertilizantes inorgánicos. En los tanques de larvicultura se trata de mantener una concentración de algas entre 50,000– 300,000 cel/mL a lo largo de todo el cultivo. Diariamente se contabiliza la concentración en el tanque y en base a lo existente se agrega el volumen necesario para mantener la concentración deseada.

La mayoría de los laboratorios cultivan sus propias algas y son pocos los que las compran de otros laboratorios. El número de laboratorios que realizan blooms de algas dentro del tanque mismo de larvas es reducido.

A medida que se va desarrollando la larva, ésta tiene la capacidad de ingerir otro tipo de alimento y posee otros requerimientos nutricionales. Estos requerimientos son cubiertos con alimento artificial y/o con alimento vivo. Entre los alimentos vivos más conocidos esta la *Artemia* sp. que representa una excelente fuente de ácidos grasos y su utilización está ampliamente difundida en el área; se cuenta con grandes distribuidores comerciales de quiste de artemia siendo el principal país de origen los Estados Unidos de Norteamérica.

Dependiendo del requerimiento de *Artemia* de cada laboratorio y de las dimensiones del mismo, se contará con una sala destinada específicamente a su incubación. La *Artemia* decapsulada se utiliza para alimentar a las larvas más pequeñas (ya que las larvas son de menor tamaño y más lentas en el nado que los nauplios de artemia) o para posterior incubación disminuyendo el riesgo de contaminación con bacterias presentes en el corión y el riesgo de que la larva ingiriera un quisle con corión.

Nutricionalmente la artemia es altamente digerible y aparentemente cubre la mayoría de los requerimientos de macro y micro nutrientes de larvas de peces y crustáceos. Los diferentes tipos y orígenes de cada artemia determinan la calidad de los mismos; el único punto en el cual coinciden todos los tipos es en la existencia de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), la cantidad que contengan será determinante en la supervivencia y crecimiento de las larvas.

Una manera de aumentar el nivel nutricional de la artemia (pudiéndose incorporar por este método también profilácticos, pigmentos, terapéuticos y vitaminas) es por medio del bioenriquecimiento. La artemia bioenriquecida pueden tan solo utilizarse para alimentar post-larvas o camarones mayores, pues es necesario que la artemia ingiera el bioenriquecedor, siendo posible solamente con artemias de 72 horas, las cuales son demasiado grandes para las etapas larvales. Los

enriquecedores pueden ser Chlorella, levadura, aceite de bacalao, y otros productos como Selco (marca comercial).

Según En cuanto a los alimentos artificiales para larvicultura en la actualidad existen varios alimentos promocionados como suplemento del alimento natural con la siguientes composiciones proteína cruda de 50%, grasa de 10 a 15%, fibra de 2%, cenizas de 9 al 10%, humedad de 10%.

3.3 INMUNOESTIMULANTES

Los autores Rendón y Balcázar¹² afirman que las sustancias inmunoestimulantes tienen la cualidad de alertar al sistema inmune no específico y son por regla general extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram positivas (péptidoglicanos) y de hongos, levaduras y algas (β -glucanos) y se incluyen las bacterias benéficas, denominadas probióticos.

3.3.1 Beta-glucanos. Son estructuras polisacáridas de paredes celulares de hongos y levaduras compuestas por unidades de glucosa que son enlazados a través de β -1,3- β -1,6. El β -1,3 glucano está presente en la pared celular de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*). El β -glucano es una micropartícula con un diámetro de alrededor de 2-4 μ m, compuesta de más de un 95% de glucosa. Este componente se encuentra en la pared celular de levaduras y hongos los cuales tienen dos componentes: fibrilares y amorfos. Los primeros contienen la quitina y la celulosa conformando las microfibrillas; mientras que los amorfos o matriciales contienen el glucano.

3.3.2 Péptidoglicanos (PG). Alrededor de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas se encuentra una rígida pared celular de péptidoglicano que da forma a la bacteria. El péptidoglicano consiste de una columna vertebral de polisacárido alternando residuos de N-acetilglucosamina (NAG) y N-ácido acetilmurámico (NAM) con pépticos.

¹² RENDÓN , L. BALCÁZAR J. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Disponible en internet: http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/19_4.pdf

3.3.3 Lipopolisacáridos (LPS). Estos se encuentran formando parte de las paredes de las bacterias Gram negativas, inducen efectos inflamatorios y por ende activan los mecanismos de defensa del huésped. Por otra parte, estudios realizados demuestran que los LPS causa un aumento exponencial en el número de hemocitos circulantes en camarones *Litopenaeus schmitti*.

Los crustáceos no poseen un sistema inmunitario específico ni con capacidad de memoria, lo que impide la utilización de vacunas. En la respuesta inmune de los crustáceos se distinguen los efectores celulares y humorales, que actúan en conjunto para eliminar los agentes extraños. El empleo de estimulantes del sistema inmune, como agentes preventivos, viene siendo materia de investigación a fin de determinar con precisión sus mecanismos de acción y cuantificar su efecto en cultivos comerciales de camarón. La estimulación se provoca al nivel de los efectores humorales y no específicos. La inmunoestimulación se proyecta como una alternativa de prevención a los agentes virales, ya que existen evidencias publicadas que señalan el efecto protector de los β -glucanos y péptidoglicanos contra el WSSV.

Los problemas virales para los cuales no existe la alternativa de los antibióticos, han incrementado el interés en la prevención mediante inmunoestimulación. En años recientes, los inmunoestimulantes han sido usados para aumentar la resistencia de camarones contra bacterias e infecciones virales.

3.4 PROBIÓTICOS

El término probiótico ha sufrido modificaciones en su significado a lo largo de los años. De esta manera en 1968, se definió como un suplemento microbiano que se suministra a animales y humanos. Fuller¹³ lo redefinió como un microorganismo vivo que se administra al hospedero suplementado en el alimento para beneficiar el balance microbiano intestinal. Posteriormente, el término fue usado para referirse a un adyuvante dietario microbiano administrado de tal manera que se mantenga vivo dentro del tracto gastrointestinal, y que beneficie la fisiología del hospedero modulando el sistema inmune, así como mejorando el balance

¹³FULLER R. Problems and prospects. In: Fuller R. (ed.) Probiotics – The scientific basis. London: Chapman and Hall; 1989. p. 377-386.

microbiano mediante la prevención de la colonización de bacterias indeseables en el tracto intestinal. Verschuere et al.¹⁴ dieron una definición más amplia de los probióticos como microorganismos vivos que tienen efectos benéficos en el hospedero mediante la modificación de la microbiota asociada, el incremento del aprovechamiento de la comida, el mejoramiento de la respuesta a enfermedades y de la calidad del ambiente. Sin embargo, en este punto es importante señalar que las bacterias que simplemente cumplen alguno de estos roles, tales como la producción de nutrientes esenciales para el aprovechamiento de las especies cultivadas, o bacterias que solamente ejercen una función específica de bio-remediación en el medio ambiente, no deben considerarse como probióticos. La aplicación de probióticos como control biológico es una alternativa viable dada la habilidad que poseen las cepas seleccionadas para impedir el crecimiento de bacterias oportunistas e influir en general en el establecimiento de la comunidad microbiana tanto en los individuos como en el agua de cultivo.

Según Azevedo, Tavares y Nava¹⁵ los requisitos que un organismo probiótico debe cumplir son:

- a. La seguridad biológica, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- b. La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal.
- c. La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino.
- d. La sinergia con la microflora endógena normal del intestino.
- e. La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

¹⁴VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 2000; 64(4) 655-671.

¹⁵AZEVEDO R y TAVARES G. Use Of Probiotics in Aquaculture, Disponible en internet URL: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/use-of-probiotics-in-aquaculture>

f. La adhesión: la mucosa que cubre las células intestinales, es la superficie de contacto inicial para los microorganismos ingeridos. Es considerado un importante sitio para la adhesión y colonización bacteriana¹⁶. Vazquez et al citados por Tovar et al¹⁷ demostraron que las levaduras tienen un gran potencial para adherirse a la mucosa intestinal de peces, gracias a la producción de adhesinas específicas.

g. Capacidad de colonización tal como lo define Fuller citado por Guillian¹⁸, la colonización es el proceso por el cual los microorganismos ingresan en el huésped y se mantienen viables siendo aquellos de rápido crecimiento los que presentan mayor habilidad de penetración. La sobrevivencia del probiótico dentro del huésped, no solo depende de su viabilidad y adaptación a las condiciones del órgano colonizado, si no que en muchos casos, los microorganismos deben resistir los mecanismos antibacteriales, enzimáticos y mecánicos que dificultan la llegada al órgano destino. Aguirre¹⁹ menciona que la verdadera colonización ocurre cuando la cepa permanece por largo tiempo en el intestino del huésped y forma parte del ecosistema del tracto intestinal.

“La colonización y adhesión son los principales procesos para que los organismos probióticos puedan ejercer su efecto benéfico en el tracto gastrointestinal de las especies hidrobiológicas del cultivo”²⁰.

¹⁶VINE, G; LEUKES, D; KAISHER, H; BAXTER, J and HECHT, T. competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. [on line]. South Africa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. P. 320. (citado el 13 de mayo del 2014). Disponible en internet: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x>

¹⁷ TOVAR, D; ZAMBONINO, J; CAHU, C; GATESOUBE, F y VÁZQUEZ- JUARÉZ, R. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. En: Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán. México. 2000, p.34.

¹⁸ GUILLIGAN, M. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei*. Trabajo de grado. (Magister en Ciencias). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar. [on line]. Ecuador: CENAIM, 2001. p.3. (citado 25 de Julio de 2014). Disponible en internet: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/maestria/2001/guilligan.pdf>.

¹⁹AGUIRRE, Gabriel. Aplicación de probióticos en acuicultura. En: Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Avances en nutrición acuícola I: México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 1992. p. 335.

²⁰ TOVAR, D; ZAMBRANO, J; CAHU, C; GATESOUBE, F; VAZQUEZ-JUAREZ, R. efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. En: Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Mérida, Yucatán. México. 2000, p.34.

h. Mantenerse con vida durante un largo periodo de tiempo, durante el transporte, el almacenamiento, por lo que puede colonizar el anfitrión de manera eficiente.

i. Producción de sustancias antimicrobianas contra las bacterias patógenas.

Las especies utilizadas normalmente como probióticos en la alimentación animal son por lo general no patógenos con microflora normal, tales como las bacterias del ácido láctico (*Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*) y levaduras como *Sacharomyces*spp. Los probióticos comúnmente usados en camarones incluyen un amplio rango, desde la bacteria láctica hasta las levaduras, algunos ejemplos son: *Pediococcus*, *Carnobacterium*, Bacillares, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, del genero *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Roseobacter*, *Aeromonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Vibrio* y levaduras *Debrymyces*, *Sacharomyces* como se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1. Microorganismos utilizados como probióticos.

Aspergillus	<i>A. Niger</i> , <i>A. orizae</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. Coagulans</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B.circulans</i> .
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. Animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longun</i> , <i>B. thermophyllum</i> , <i>B. lactis</i> .
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. celloobiosis</i> , <i>L. fermentarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuterii</i> , <i>L. delbruekii</i> , <i>L. carnobacterium</i> spp.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilacticii</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. damnosus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevesiae</i> , <i>S. boulardii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. thermophyllum</i> , <i>S. diacetylatis</i> .

Fuente: AZEVEDO R y TAVARES G. Use of Probiotics in Aquaculture, Disponible en internet
 URL: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/use-of-probiotics-in-aquaculture>

Según Azevedo y Tavares²¹ menciona que los principales problemas patológicos en larvicultura del camarón son ocasionados por bacterias, para manejar estas patologías, el protocolo tradicional de cría larvaria incluye el uso de antibióticos, los cuales además de inducir el desarrollo de resistencia bacteriana, disminuyen el establecimiento de cepas no patógenas.

Moriarty y Verchueren citados por el mismo autor²² afirman que los probióticos como organismos vivos que tienen un efecto benéfico para los camarones, mediante la modificación de la comunidad microbiana asociada con él, a través de una mejora en el uso del alimento o el crecimiento de su valor nutricional, frente a una respuesta del huésped a las enfermedades, o a través del mejoramiento de la calidad de su ambiente. Esto implica que un amplio rango de organismos pueden ser empleados como probióticos para los animales acuícolas, a diferencia de los animales terrestres.

Los avances en nutrición de camarones, han hecho que las tendencias actuales son las de restringir o reducir el uso de antibióticos debido a la aparición de resistencia bacteriana, problemas ecológicos, restricciones en las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de los camarones y su incidencia en la salud humana.

Los probióticos actualmente son utilizados como una alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de exclusión competitiva. Es una herramienta viable, ya que las bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como directamente del tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que son patógenos o que pueden convertirse en nocivos.

3.4.1 Importancia de los probióticos. Para Salazar y Montoya²³ las cepas de microorganismos probióticos deben presentar y mantener unas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento que lo contiene o al que

²¹ AZEVEDO R y TAVARES G. op cit.

²² AZEVEDO R y TAVARES G. Op cit.

²³ SALAZAR, B., MONTOYA, O. Importancia de los Probióticos y Prebióticos. En: Vial, revista de la facultad de química farmaceutica. Vol.10, N° 2. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. 2001.p.20-26.

se adiciona; entre esas características están: viabilidad durante el proceso y almacenamiento del alimento (capacidad que tienen estos microorganismos de permanecer vivos tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado), estabilidad frente a ácidos gástricos y biliares (resistir las concentraciones de ácido y sales biliares del estómago o intestino delgado del consumidor), adherencia a la mucosa intestinal (los microorganismos del probiótico deben colonizar el ecosistema del tracto intestinal fijándose al epitelio del mismo, esto se logra gracias a un flujo lento del probiótico a través del tracto, y producción de sustancias antimicrobianas (cuando estos microorganismos metabolizan carbohidratos y sintetizan compuestos como: ácido láctico, fórmico, acético entre otros).

Según Milian mencionado por el anterior autor, plantea que son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos más usados son *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino son quizás los más conocidos, son bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico; este aumento de ácido láctico disminuye el pH intestinal a unos niveles bajos así como disminuye la supervivencia de microorganismos como *E. coli*, *Salmonellas* entre otros. Los probióticos producen ácido láctico y ácido acético los cuales crean una alteración del pH que funcionan como un antiséptico del sistema digestivo y al mismo tiempo minimiza la proliferación de microorganismos patógenos, al competir por nutrientes y alojamiento en las paredes intestinales.

3.4.2 Mecanismos de acción. Los mecanismos de acción de los bacillos Gram - positivos utilizados como probióticos, aunque todavía no se ha aclarado completamente, se describen según Fuller²⁴, Balcázar²⁵ y Jin²⁶ como:

²⁴FULLER R. Problems and prospects. In: Fuller R. (ed.) Probiotics – The scientific basis. London: Chapman and Hall; 1992. p. 377-386.

²⁵BALCÁZAR JL, Blas I, Zarzuela-Ruiz I, Cunningham D, Vendrell D, Músquiz JL. The role of Probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 2006; 114(1).p. 173-186.

²⁶JIN LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Probiotics in poultry: modes of action. World'sPoultry Science Journal 1997; 53(4).p.351-368.

a. Los probióticos: las bacterias se adhieren en la mucosa intestinal, formando una barrera física que previenen las bacterias patógenas.

b. Producción de sustancias antibacterianas: las bacterias probióticas sintetizan los compuestos como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que tiene acción antibacteriana, sobre todo en relación a bacterias patógenas. También producen ácidos orgánicos que reducen el medio ambiente y el pH del tracto gastrointestinal, la prevención del crecimiento de diversos patógenos y desarrollo de ciertas especies de *Lactobacillus*.

c. La competencia por los nutrientes: la falta de nutrientes disponibles que pueden ser utilizados por las bacterias patógenas es un factor limitante para su mantenimiento.

d. La estimulación del sistema inmunológico: algunas bacterias probióticas están directamente relacionados con la estimulación de la respuesta inmune, mediante el aumento de la producción de anticuerpos, la activación de los macrófagos, la proliferación de células T y la producción de interferón. Los interferones son unas proteínas producidas naturalmente por el sistema inmunitario de la mayoría de los animales como respuesta a agentes patógenos, tales como virus y células cancerígenas.

3.4.3 Selección de los probióticos. Para el uso de un microorganismo dado como probiótico, es necesario su aislamiento, caracterización y pruebas de certificación de su eficiencia probiótica.

a. En primer lugar se debe seleccionar una fuente de microorganismos (por ejemplo tracto digestivo de los animales sanos).

Los microorganismos seleccionados son aislados e identificado por medio de cultivo selectivo.

Según Bailey y Scott²⁷ los medios selectivos para *Bacillus* se desarrollan bien en agar sangre al 5 %, agar chocolate, medios de rutina para hemocultivos y caldos

²⁷ BAILEY, SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana, Argentina, 2002. p. 330.

nutritivos usados con frecuencia, sin embargo estos microorganismos no crecen en agar Mac Conkey, porque este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo e inhiben el crecimiento de la mayor parte de la flora Gram positiva y los que son sensibles al ácido nalidíxico no se desarrollan en CNA.

b. Con las nuevas colonias aisladas de interés se realizan evaluaciones *in vivo* generalmente bajo condiciones de laboratorio. Por último, el probiótico que presente los mejores resultados satisfactorios pueden ser utilizados y producido comercialmente

3.4.4 El uso de probióticos en la acuicultura. Verschuer, et al²⁸ Ochoa et al²⁹, establecen que los microorganismos presentes en el medio ambiente acuático están en contacto directo con los animales, con las branquias y con los alimentos suministrados, con fácil acceso a la zona digestiva del animal; entre los microorganismos presentes en el agua que son patógenos son considerados como oportunistas, es decir, se aprovechan de la situación de un animal (de alta densidad, la mala alimentación) para causar infección e incluso la muerte.

“El uso de probióticos busca bacterias benéficas que sean residentes normales de la micro flora de los organismos acuáticos con lo que se espera asegurar la permanencia de estas cepas en las diferentes mucosas del huésped, constituyendo una barrera de protección en branquias, en el tracto gastro intestinal e inclusive la piel”.³⁰

Según reportes de la (FAO) los animales acuáticos difieren de los animales terrestres en el nivel de interacción entre la microbiota intestinal y el ambiente que los rodea. Las bacterias presentes en el ambiente acuático influyen la composición de la microflora del intestino y viceversa. Esta influencia ambiental es mucho mayor para el camarón y otros invertebrados, que para los peces. La composición de la comunidad bacteriana del tracto intestinal de los animales acuáticos es diferente a lo que se encuentra en los animales terrestres. Las anaerobias

²⁸VERSCHUER L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 2000; 64(4).p. 655-671.

²⁹ OCHOA, L., OLMOS, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. 2006

³⁰ GASTESOUPE, F. Uso de Probióticos en Acuicultura. En: Civera – Cerecedo, R., Perez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz- Suarez, L .E. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Noviembre 15 -18, 1998. La Paz, B.C.S., Mexico. 2000.p.152.

facultativas Gram-negativa generalmente se encuentran en el tracto digestivo de peces y mariscos; las anaerobias obligadas o facultativas Gram-positiva dominan el tracto de los humanos y animales terrestres (Gatesoupe). Los animales acuáticos son poiquiloterms y su microbiota asociada puede variar con los cambios de temperatura; cambios en la salinidad del ambiente de crianza también afectan a la microbiota. Una consecuencia importante es que la mayoría de probióticos eficientes usados por la acuicultura diferirán de los usados en especies terrestres.

En consecuencia, la adición de un probiótico dado en el agua para el cultivo de organismos acuáticos debe ser constante, debido a que las condiciones del medio ambiente sufren cambios periódicos; por lo tanto, la variedad de los microorganismos presentes, deben considerarse en la elección de los probiótico para ser utilizado en la acuicultura.

Zian, Nejad, Rezaei y Takami³¹ establecen que los beneficios observados en la administración de suplementos de probióticos en la acuicultura incluyen:

- a. Aumento del valor nutricional de los alimentos.
- b. Contribución a la digestión enzimática.
- c. La inhibición de patógenos.
- d. Factores promotores del crecimiento.
- e. Mejora de la respuesta inmune.
- f. La calidad del agua.

Entre los estudios más recientes apuntan a que el efecto de la utilización de los probióticos para diversos organismos acuáticos destacan aquellos para los peces según Verschuere et al³², camarones según Ziaei et al³³ y moluscos según Macey y Coyne³⁴ Merrifield et al³⁵.

³¹ZIAEI-NEJAD S, REZAEI M, TAKAMI G, Lovett D, MIRVAGHEFI A, SHAKOURI M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as Probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 2006; 252(2-4).p. 516-524.

³²VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Op, cit.

³³ZIAEI-NEJAD S, REZAEI M, TAKAMI G, LOVETT D, MIRVAGHEFI A, SHAKOURI M. Op cit.

³⁴MACEY BM, COYNE VE. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliothismida* through probiotic treatment. Aquaculture 2005; 245(1-4).p. 249-261.

3.4.5 Los probióticos y la calidad del agua en la acuicultura. Boyd³⁶ menciona que los aumentos en la carga orgánica, los niveles de fósforo y compuestos de nitrógeno son preocupaciones en la acuicultura, y menciona efecto beneficioso en la utilización de los probióticos en la descomposición de la materia orgánica en la acuicultura la cual ayudo a mejorar la calidad del agua en los cultivos; Verschuere et al³⁷ afirman que entre las bacterias Gram-negativas y las bacterias Gram-positivas estas últimas están convirtiendo mejor la materia orgánica en CO₂. Por lo tanto, durante un ciclo de producción, los niveles altos de las bacterias Gram positivas pueden minimizar la acumulación del oxígeno disuelto y carbono orgánico durante el ciclo de cultivo, mientras que las floraciones del fitoplancton es más estable a través del aumento de la producción de CO₂.

3.4.6 Limitaciones que presenta el estudio en probióticos destinados para la acuicultura. Denev et al³⁸ mencionan que:

Algunos de los fracasos de la investigación con microorganismos probióticos se atribuyen a factores como: la inadecuada selección de cepas probióticas, a los métodos de producción, a la dosificación y la duración del tratamiento con el probiótico". "Sin embargo, en los organismos acuáticos hay que tener en cuenta que el efecto del probiótico también dependerá de la especie del pez que se esté evaluando, del estatus fisiológico del hospedero, de las condiciones de cultivo, de los factores medio ambientales y del objeto específico de la aplicación del probiótico (nutrición, resistencia a enfermedades, alimentación, entre otros)³⁹.

³⁵ MERRIFIELD, D; RINGO, E. Aquaculture Nutrition gut health, Probiotics and Prebiotics. 2014. p. 290-318

³⁶ BOYD CE. Aquaculture sustainability and environmental issues. World Aquaculture 1999; 30(2).p. 10-72.

³⁷ VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Op, cit.

³⁸ DENEV, S; STAYKOV, Y; MOUTAFCHIEVA, R; y BEEV, G. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. International aquatic research, 2009. Vol.1.no.1. p.29.

³⁹ MERRIFIELD, D., DIMITROGLOU, A., FOEY, A., DAVIES, S., BAKER, R., BOGWALD, J., CASTEX, M., y RINGO, E. the current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 2010. Vol.302. No. 1-2. p. 1-18.

Merrified et al⁴⁰ y Burr y Gatlin⁴¹, comentan que dentro de los inconvenientes que afronta el trabajo con microorganismos probióticos está la pérdida de la viabilidad del probiótico durante el proceso de elaboración de los piensos, dado que las condiciones de procesamiento de alimentos acuícolas son físicamente más intensivos en comparación con el alimento para animales terrestres. Por lo tanto, la incorporación de probióticos en los alimentos acuícolas sigue siendo limitado a nivel industrial, particularmente debido a la estabilidad térmica.

Kolndadacha et al citado por Betancourt⁴² afirma que incluso los resultados obtenidos de una cepa probiótica a partir de pruebas de laboratorio no puede ser extrapolado a otra cepa, aunque pertenezcan a la misma especie. Por esta razón el efecto de los probióticos candidatos para la acuicultura también deben evaluarse en vivo, esto implica la administración del probiótico en el organismo, el monitoreo de su crecimiento, colonización y sobrevivencia.

Finalmente “uno de los obstáculos es la producción de productos probióticos a escala industrial, debido a que las especies candidatas deben cumplir con una reglamentación muy estricta y demostrar su eficiencia y seguridad en los animales, los consumidores y el medio ambiente”⁴³.

3.4.7 Encapsulación de probióticos. Según Makridis⁴⁴ et al, las bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal deben resistir la acción de las enzimas digestivas, la respuesta inmune del hospedador y los ácidos del estómago y de la

⁴⁰ Ibid., p. 36

⁴¹BURR, G., GATLIN, D. Microbial ecology of gastrointestinal tract of fish and the potencial application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2005. Vol. 36. No. 4. p. 425-436.

⁴²BETANCOURT, D. Efecto de *Lactovacillus plantarum* lab9 sobre el crecimiento y sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) (trabajo de grado biología.) Pasto. Colombia. Universidad e Nariño. Facultad de ciencias naturales y exactas. Biología. 2013. p. 30.

⁴³ MERRIFIELD. Et al. op. cit. p. 56.

⁴⁴ MAKRIDIS, Pavlos; MARITINS, Silvia; TSALAVOUTA, Matina; CATALA, Lidia; KOTOULAS, Girgios; MAGOULAS, Antonis and DINIS, Maria. Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese ole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. [on line]. Portugal: Blackwell publishing ltd, 2005. P. 1626. (citado el 13 de mayo del 2006). Disponible en internet: <http://www.Blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2005.01388.x>

bilis; además tiene que sobrevivir durante los procesos de manufactura y almacenamiento y que al mezclarse con alimentos o excipientes no pierdan su capacidad probiótica.

En este sentido Kailasapathy⁴⁵, al encapsular bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. infantis* en una matriz de alginatos, determino que eran más resistentes a las condiciones de temperatura y pH en alimentos en procesados, por lo tanto es una importante alternativa para garantizar una mayor viabilidad a los probióticos que se someten a procesos industriales y por ende lograr un mejor efecto en el organismo que lo consume.

3.4.8 Posibles modos de acción de los probióticos. Considerando el posible efecto del probiótico *In vivo*, Verschuere et al⁴⁶ proponen que se debe hacer una distinción entre la habilidad intrínseca de las cepas para influenciar positivamente al hospedador y su capacidad para llegar y mantenerse en el sitio donde ejercerá su efecto positivo. Si el candidato probiótico no es capaz de proliferar eficientemente en el intestino, después de haber sido ingerido, es improbable que pueda ejercer su acción probiótica, a menos que sea adicionado con regularidad a través de la dieta. Por lo tanto, los posibles modos de acción, requieren implícitamente que los candidatos probióticos puedan llegar y ubicarse en los sitios donde su efecto es requerido. Esos modos son: producción de sustancias inhibitoras, competencia por nutrientes y energía, aumento de la respuesta inmunológica del hospedero, competición por los sitios de adherencia, producción de macro y micronutrientes y contribución enzimática de los procesos digestivos del hospedador.

- **Aumento de la respuesta inmunológica:** “en un intestino saludable los probióticos producen efectos benéficos y en un intestino enfermo pueden reducir la posibilidad de translocación de los microorganismos patógenos, cuando el mecanismo de defensa del huésped se ha debilitado”⁴⁷. Según Contardo,

⁴⁵KAILASAPATHY, Kaila. Protecting probiotics by microencapsulation.[on line]. Australia: microbiology Australia, 2003. 47p. (citado el 2 de junio de 2006). Disponible en internet: <http://www.theasm.com.au/links>.

⁴⁶VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS, and VERSTRAETE W. Op, cit. p.663

⁴⁷ VINE, G; LEUKES, D; KAISER, H; BAXTER, J and HECHT, T. op cit. p.319-326.

Bustamante y Rodríguez⁴⁸, varios estudios han demostrado que los probióticos modifican la respuesta inmune no específica y específica, aumentando el número de linfocitos circulares, estimulando la fagocitosis, el rol defensivo de la mucosa y la protección contra el daño estructural y funcional secundario de patógenos enterovirulentos.

3.4.9 Bacterias que predominan en el tracto digestivo de organismos acuáticos. Según Monroy et al⁴⁹ de manera general se acepta que el tracto digestivo de algunos peces alberga aproximadamente 10^7 – 10^8 bacterias/g, no obstante se observan cambios a lo largo de las diferentes regiones del intestino, es decir, en la zona cercana al estómago se aloja un reducido número de microorganismos que se adhieren a la superficie de la mucosa, considerándose alrededor de 10^2 bacterias/g de contenido, debido a que las secreciones ácidas y biliares destruyen la mayor parte de microbios; también la actividad peristáltica impide una colonización de la luz intestinal. El número de bacterias se incrementa en la parte posterior del tracto donde se han contabilizado poblaciones de hasta 10^{12} bacterias/g de contenido luminal, ya que en ésta zona disminuyen las secreciones ácidas y biliares, además el tránsito es lento lo que brinda a los microorganismos la oportunidad de proliferar, fermentando los sustratos disponibles derivados de la dieta o de las secreciones endógenas (Al-Harbi y Uddin).

Gracias a las nuevas técnicas de detección e identificación bacteriana, como el aislamiento de ADN_r16S, el análisis del ADN polimórfico (RAPD), pruebas de PCR, Inmunohistoquímica y sondas moleculares para fluorescencia, se han podido identificar otras especies como *Lactobacillus sp*, *Bacillus sp*, *Citrobacter gillenii*, *Shewanella marinus*, *Kluyvwwra* intermedia entre otras, antes no descritas por lo que se siguen efectuando estudios para la identificación de las especies que predominan en la microbiota intestinal de diversos organismos (Balcazar; Navarrete et al; Tapia-Paniagua et al). En el caso de los crustáceos como el camarón, se ha demostrado que tanto en intestino, como el agua y sedimento de su entorno, se encuentra presente una diversidad de especies de los generos

⁴⁸CONTARDO, Maria; BUSTAMANTE, Gonzalo y RODRIGUEZ, Jaime. Probioticos en niños con diarrea aguda. [on line]. Chile: Revista Pediátrica Electronica, 2005.p.33. (citado el 13 de mayo del 2006). Disponible en internet: <http://www.revistapediatría.cl/vol1num1/pdf/editorial.pdf>

⁴⁹MONROY, Maria; CASTRO, Talia; CASTRO, Jorge; CASTRO, Germanand LARA, Ramon. Beneficios del uso de los probioticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos acuáticos. [on line].(citado el 12 de febrero del 2012). Disponible en internet: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/85/pdfs/probioticos.pdf>

Vibrio y Aeromonas como: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus* *V. vulnificus*; *Aeromonas veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. schubertii*, las cuales son de importancia sanitaria para los peces y el ser humano (Alvarez et al., 2000). Con respecto a los moluscos se ha descrito la presencia de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, en el ostión *Crassostrea corteziensis* (Campa-Cordova et al., 2011) y en el caso del Abalon se han detectado *Vibrio* fluviales, *Vibriocampbellii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio metschnikovii* y *Flexibacterspp.* (Nie y Wang).

Según Ochoa et al, 2006⁵⁰ en sus trabajos de investigación afirma que algunas de las cepas de *Bacillus* sp aislados tienen un amplio potencial de aplicación, tanto en la fermentación de alimentos como cepas probióticas. En este sentido, las cepas aisladas tienen la capacidad de producir enzimas necesarias para el crecimiento y la alimentación de los camarones. En cuanto a los 'alimentos funcionales' el enfoque conceptual es claro puesto que hay un nicho importante para probióticos, prebióticos o su combinación (simbióticos). El uso de ambos probióticos y prebióticos a voluntad probablemente aumentará dramáticamente en todo el mundo, debido a unos fuertes intereses comerciales en la prestación de estos suplementos a los animales acuáticos. Además, los estudios que examinan las relaciones entre la nutrición, las enfermedades y los factores ambientales se debe dar más atención, es importante tener en cuenta que probióticos, prebióticos y bacterias simbióticos son los suplementos de productos alimenticios y no drogas o antibióticos. En futuro la evaluación de probióticos en los alimentos para camarones se centraran con mayores porcentajes de supervivencia en condiciones de cultivo.

⁵⁰ OCHOA, L., OLMOS, J. Op. cit.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en la empresa productora de larvas de camarón Ecomar que se encuentra situada el Municipio de Tumaco, ubicado al suroeste de Colombia a 1°48'24" de latitud norte; 78°45'53" de longitud al meridiano de Greenwich, se ubica en la Costa Pacífica de Nariño a 304 kilómetros al sur occidente de la ciudad de San Juan de Pasto, a 2 msnm, con una temperatura media de 28 grados centígrados que en determinadas épocas oscila en 16 y 33 grados centígrados; humedad relativa es de 83.86% con una precipitación anual de 2.531 milímetros; el área municipal es de 3.760 kilómetros cuadrados⁵¹ como se muestra la figura 8. Para la extracción de las bacterias con posible potencial probiótico se realizó en los laboratorios del programa de ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño ubicada en la ciudad de San Juan de Pasto, en coordenadas geográficas 1° 12' 52.48" norte, 77° 16' 41.22" oeste, a 2527 msnm⁵² temperatura promedio de 13.3°C y una humedad relativa de 60 a 88%⁵³ como se muestra en la figura 9.

⁵¹ALCALDÍA DE TUMACO. Municipio de Tumaco en Nariño, Unidad Por Tumaco Progreso Para Todos. Colombia. 2014. Disponible en: <http://www.tumaco-narino.gov.co/presentacion.shtml>

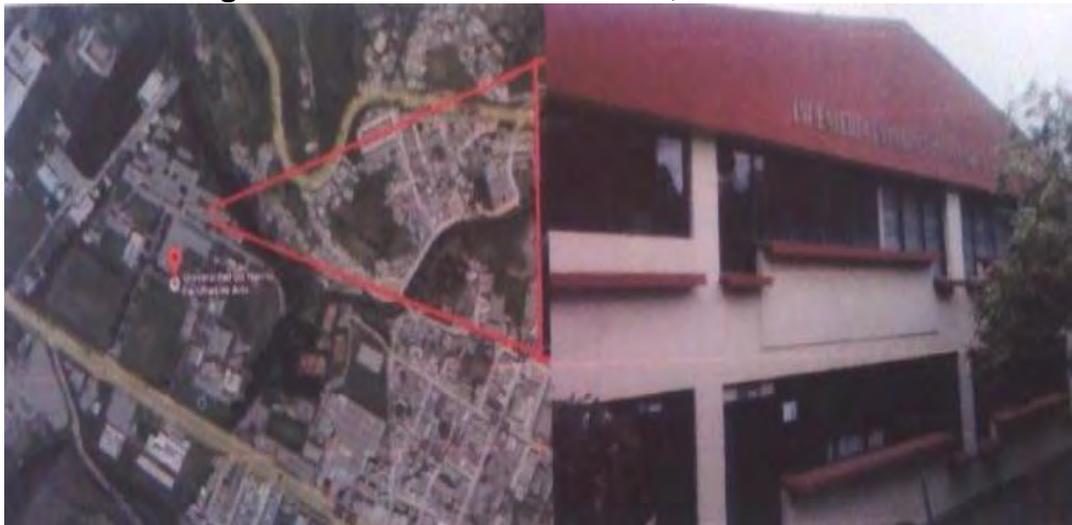
⁵²ALCALDIA DE PASTO. Infortmaciongeneral.San Juan de Pasto. Colombia, Pasto. (fecha de consulta: 19de octubre del 2014). Disponible en internet: http://www.pasto.gob.co/index.php?option=com_content&view=article&id=60&Itemid=61.

⁵³COLABORADORES DE WIKIPEDIA. San Juan de Pasto. . (fecha de consulta: 1de octubre del 2014). En: Wikipedia la enciclopedia libre. Disponible en internet: http://es.wikipedia.org/wiki/san_juam_de_pasto.

Figura 8. Empresa ECOMAR



Figura 9. Universidad de Nariño, Pasto-Ñariño



4.2 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS

4.2.1 Materiales.

- Recipientes de vidrio de 5 litros
- Tamices
- Cristalería (beaker de 300 mL, probetas de 10 Y 100 mL, erlermeyer de 2 L, tubos de ensayo, Cajas Petri
- tubos ependor
- Laminas portaobjetos
- Laminillas cubreobjetos.
- Papel aluminio
- Papel vinipel
- Papel craf
- Asas de vidrio y aluminio
- Puntas azules.
- Mangeras para aireación diámetro 3/16"
- Piedras difusoras
- Espátula
- Tijeras
- Cinta de enmascarar
- Cinta pH
- Gradilla
- Mortero

4.2.2 Equipos.

- Balanza OHAUS PA313 310 g \pm 0.001 g.
- Balanza OHAUS Scout Pro SP4 001 4000 g \pm 0.1 g
- Baño maria Equitron 139
- Estufa Haceb cocineta EM-1
- Nevera Samsung modelo S606ECSWCN/SCL
- Incubadora Schutzart DIN 40050-IP 20
- Cabina flujo laminar C4 modelo: FLOW 85 H
- Autoclave modelo No 25x
- Espectofotometro HACH DR 2010
- Bortex Janke y Kunkel VF2

- Blower 0,042 MPAL 100 RESUN
- Transfer pipeta BOECO 100-1000 µL
- Computador portátil hp
- Cámara fotográfica canon 8 Mp
- Termostatos 75 watts H229
- Oxímetro YSI 550A
- Microscopio Olympus CX 21

4.2.3 Insumos.

- Probiotico comercial
- Alimento molido
- Alcohol
- Hipoclorito
- Juego de colorantes para tinción de Gram.
- Peróxido de hidrogeno
- Medio de cultivo TSA (Trypticasa- Soya- Agar)
- Agar Mac Conkey
- Caldo nutritivo TSB (Trypticasa- Soya- Broth)
- Citocromo oxidasa
- Agar sangre
- Sal
- Agua destilada
- Kit de amonio.

4.3 MATERIAL BIOLÓGICO

La obtención de las cepas con posible potencial probiótico se aislaron a partir del tracto digestivo de juveniles silvestres de camarón *L. vannamei* que fueron obtenidas de la captura por parte de pescadores.

En la fase experimental se utilizaron 4.500 animales en fase de mysis I con una talla de 0,2 cm, provenientes del laboratorio de camarón blanco ECOMAR.

4.4 PERIODO DE ESTUDIO

La investigación se realizó durante 12 meses tiempo en el cual se elaboró el aislamiento de la cepa con potencial probiótico, adquisición del material biológico, periodo de adaptación, trabajo de campo (15 días) y elaboración del informe final.

4.5 PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

Como primera medida se realizó la desinfección del área de laboratorio y autoclavado del material de acuerdo al manual de bioseguridad de los laboratorios de la Universidad de Nariño.

4.5.1 Obtención de la muestra. Las muestras se recolectaron de juveniles silvestres de camarón *Litopenaeus vannamei*; estos fueron previamente empacados en doble bolsas de plástico calibre 24 con sus respectivos parámetros y se transportaron desde Tumaco hacia los laboratorios del programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño; los camarones fueron seleccionados por características como una mayor movilidad y en buen estado de salud, realizando observaciones al estereoscopio del hepatopáncreas, intestino y coloración en general. Los animales seleccionados se les realizó un proceso de limpieza con cinco lavados sucesivos con agua destilada, posteriormente se sometieron a una extracción del intestino, de cuya masa biológica se extrajeron 500 mg diluidos en 5000 μ L de agua destilada estéril para el proceso de maceración en un mortero estéril con refrigeración hasta obtener una muestra homogénea, posteriormente se tomó 1 mL de esta muestra y se realizó diluciones seriadas, agitando en el bortex tanto la muestra madre como los tubos de las diluciones para posteriormente realizar la siembra como se observa en la Figura 10.

Figura 10. Recolección de la muestra



4.5.2 Proceso de siembra. A partir de la muestra obtenida anteriormente, se realizó la siembra de un inóculo de 100 μ L, sobre la superficie de cajas petrí, con medio nutritivo universal TSA con adición de 0,85% de NaCl figura 11, las cuales se incubaron a 36°C durante 24 horas con el fin de obtener colonias para su respectiva caracterización. A partir de la primera siembra, se efectuó tres resiembras sucesivas adicionales tomando las colonias más representativas por su morfología y frecuencia, con el fin de aislar e identificar dicha bacteria.

Figura 11. Proceso de siembra



4.5.3 Purificación e Identificación de bacterias. Para la identificación presuntiva del género *Bacillus* sp se llevó a cabo el protocolo descrito por España⁵⁴

- a. Se observó cepas sembradas que presentaban características del género *Bacillus* (Bordes irregulares, Color blanco a crema, Rugosas, Colonias grandes).
 - b. Coloración de GRAM: esta tinción se llevó a cabo empleando el protocolo anteriormente mencionado donde la secuencia de la tinción se describe en el Anexo A. Una vez tomada la muestra del cultivo de bacterias con posible potencial probiótico sometidas a la tinción de Gram se llevaron al microscopio para su visualización.
-
- a. Siembra en Mac Conkey: este medio se utilizó para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae se desarrollan en el mismo.

⁵⁴ ESPAÑA, A. Guía de Laboratorios de Microbiología. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Citado el 5 de octubre de 2014. disponible en internet: <https://es.scribd.com/doc/176432601/Practicas-de-Laboratorio-Micobiologia-Alex>.

b. Prueba de endospora o también conocida tinción de Scheffer Fulton se tomó una cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y se transfirió a un portaobjetos, este fue flameado hasta formar una suspensión homogénea, se añadió el verde de malaquita por 1 minuto y se esperó que este líquido genere vapores por la adición de calor por el mechero; pasado este tiempo se lavó con abundante agua y se añadió safranina por 3 segundos, finalmente se enjuagó y se dejó secar para luego ser observadas en el microscopio; hay que resaltar que la muestra debe tomarse después de haber cumplido las primeras 24 horas de haber sido sembrada.

c. Pruebas de motilidad SIM A partir de una colonia aislada se sembró con un asa recta en el centro del tubo el inóculo, con una profundidad de 2/3 del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realizó en línea recta y se dejó incubar por 24 horas a una temperatura de 35 a 37°C. Esta prueba indica si las bacterias son móviles (presencia de flagelo) o inmóvil.

d. Prueba de catalasa se tomó una colonia aislada del cultivo bacteriano y se colocó sobre un portaobjetos, en ella se dejó caer una gota de peróxido de hidrogeno, este procedimiento determina si las bacterias son aerobias o anaerobias puesto que la catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias.

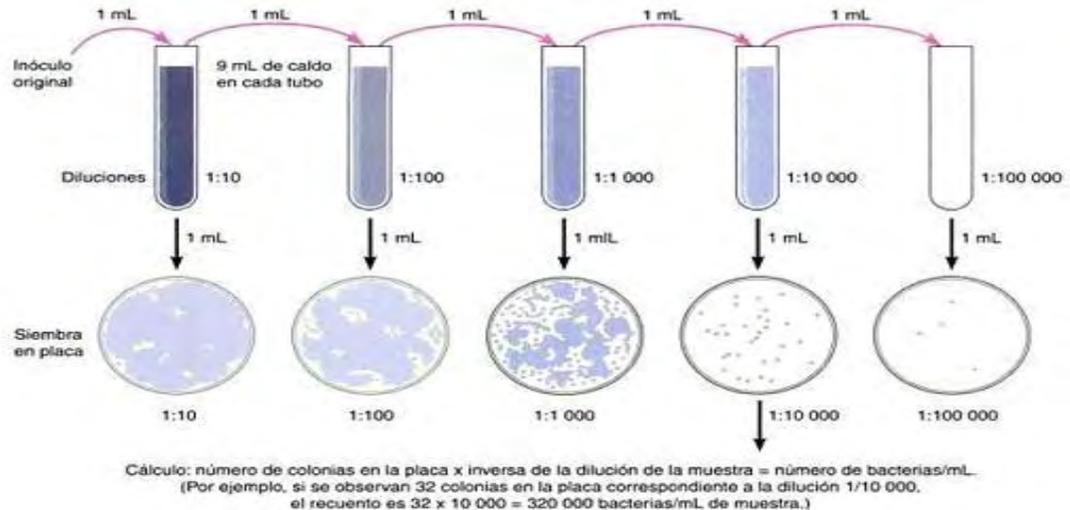
4.5.4 Mediciones de crecimiento bacteriano. Para analizar el crecimiento bacteriano se realizó una curva de crecimiento por medio de la técnica de espectrofotometría con una longitud de onda de 600 nm que indicó cada uno de los tiempos de las fases que presenta la curva como son: de adaptación, exponencial, estacionaria y declive o muerte; este método ayudo a obtener el tiempo óptimo para determinar las concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC).

- **Diluciones seriadas** según Furtado y Avila⁵⁵ este método se realiza con una serie de diluciones decimales seriadas, el protocolo es el siguiente: sembrada la cepa en una caja petri se tomó una colonia representativa la cual se sembró en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo (TSB) este representa la muestra madre, se dejó incubar a una temperatura de 36°C en el tiempo que se estimó en la curva de crecimiento que fue a las 15, 20 y 24 horas, transcurrido el tiempo se

⁵⁵FURTADO, S. y AVILA, O. Diluciones Seriadas. Disponible en: <http://es.wikihow.com/hacer-diluciones-seriadas>

tomó 1 mL de la muestra madre y adición a tubos con 9 ml de caldo nutritivo a su vez estas se repitieron hasta 10^{-10} y se realizó el protocolo como se muestra la figura 12; de cada tubo de ensayo se sembró nuevamente en cajas Petri para determinar el número de unidades formadoras de colonias.

Figura 12. Método de diluciones seriadas para recuento en placa de colonias.



Tortora, G., Funke, B & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9 Ed). Buenos Aires: Médica Panamericana.

4.6 PLAN DE MANEJO

4.6.1 Adecuación de instalaciones. Para la desinfección de los recipientes y materiales se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración de 2000ppm, se enjuago con agua dulce a presión y se dejó secar para su posterior uso, posteriormente se llenaron los recipientes con agua proveniente de los reservorios, se instaló aireación permanente y termostatos, además se repartió homogéneamente las densidades propuestas para cada según los tratamientos.

4.6.2 Monitoreo de los animales. Se realizó observaciones por medio de un recipiente plástico de 100mL, el cual fue diseñado para extraer la muestra de Las unidades experimentales de esta manera fue factible determinar el estadio de los animales y algunos cambios en tamaño de las larvas, su comportamiento y forma

de nadar, esto se corrobora observando 10 animales en el microscopio realizó cada tres días registrando la talla.

4.6.3 Incorporación de probiótico al alimento y alimentación. Para la incorporación en el alimento de la bacteria con posible potencial probiótico *Bacillus sp*, se requiere tamizar el balanceado por una apertura de 60 y 100 micras, posteriormente se activó las bacterias sembrándolas en medio TSA, pasadas las 24 horas de incubación, se procede a sembrar en tubos de ensayo con caldo nutritivo TSB; teniendo en cuenta la curva de crecimiento y con el fin de obtener las UFC/mL requeridas, se incubó durante un periodo de 24 horas; una vez transcurrido este tiempo se procedió a tomar el volumen requerido del caldo que representara las UFC/g para cada tratamiento, impregnando, homogenizando y secando el alimento balanceado a 36°C, finalizado este tiempo se alimentó seis veces al día en cada una de las unidades experimentales según la tabla de alimentación del laboratorio de camarón ECOMAR.

4.7 MUESTREO DE EJEMPLARES Y MONITOREO DE PARAMETROS.

Cada tres días se tomó una muestra de los ejemplares de cada unidad experimental, tomando 10 ejemplares y se llevó el registro de talla; analizando además las características externas como motilidad e internas como la observación de intestino. Se tuvo un control diario de los parámetros fisicoquímicos del agua entre ellos: temperatura, oxígeno, salinidad y amonio, según el comportamiento de estos se realizó un recambio de agua para cada uno de los tratamientos con sus respectivas replica.

4.8 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante la utilización de un Diseño completamente aleatorio (DIA); donde se evaluaron cinco tratamientos cada uno de los cuales estuvieron constituidos por tres replicas, para un total de 15 unidades experimentales el modelo matemático que representa a este diseño, es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + t_i + \varepsilon_{j(i)} + \beta_{k(ji)} + N_{(ijk)}$$

Dónde:

Y_{ij} Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental

μ Efecto de la media general

α_i Efecto del i-esimo tratamiento

ϵ_{ij} Efecto del error experimental asociado a la i-esima unidad experimental

$N_{(ijk)}$ Error observacional (error de muestreo)

4.8.1 Tratamientos. Se evaluaron 5 tratamientos con 3 replicas en las cuales se utilizarán 300 larvas por replica.

La concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Bacillus sp* fue de un mínimo de 130.000.000 UFC por mL tal como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de alimento más el probiótico en los Tratamientos

TRATAMIENTOS	
Tratamiento 0	Alimento sin probiótico.
Tratamiento 1	Alimento con probiótico comercial
Tratamiento 2	Alimento con probiótico aislado con 130.000.000 UFC
Tratamiento 3	Alimento con probiótico aislado con 260.000.000 UFC
Tratamiento 4	Alimento con probiótico aislado con 390.000.000 UFC

4.8.2 Formulación de hipótesis. Las hipótesis plateada fueron:

Hipótesis nula (Ho). No existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos.

$$H_0: \mu T0 = \mu T1 = \mu T2 = \mu T3 = \mu T4$$

Hipótesis alterna (H1). Al menos la media de uno de los tratamientos será diferente.

$$H1: \mu T0 \neq \mu T1 \neq \mu T2 \neq \mu T3 \neq \mu T4$$

4.8.3 Variables a Evaluar. Los parámetros zootécnicos a evaluar son los siguientes:

4.8.3.1 Tasa de crecimiento simple (TCS): permite determinar la ganancia de talla diaria promedio expresada como porcentaje; se calcula mediante la siguiente formula:

$$TCS = \left(\frac{LnLlf - LnLli}{T} \right)$$

Donde la TCS tasa de crecimiento simple; *Llf*: longitud final muestreo de las larvas (cm); *Lli*: longitud promedio inicial muestreo de las larvas (cm); T: periodo de tiempo en horas.

4.8.3.2 Supervivencia (% S)= calcula la supervivencia en porcentaje.

$$\%S = NF/NI * 100$$

%S= porcentaje de supervivencia

NF= número de individuos sobrevivientes al final del periodo de estudio

NI= número inicial de individuos en el periodo de estudio.

4.8.3.3 Relación beneficio/costo (RBC): permite referenciar si una producción es aceptable o no, desde el punto de vista técnico, utilizando un indicador (1.0) que expresa el nivel de viabilidad como se indica a continuación

$$RBC = \text{relación beneficio/costo}$$

$B/C > 1$, aconsejable
 $B/C = 1$, indiferente
 $B/C < 1$, no es aconsejable

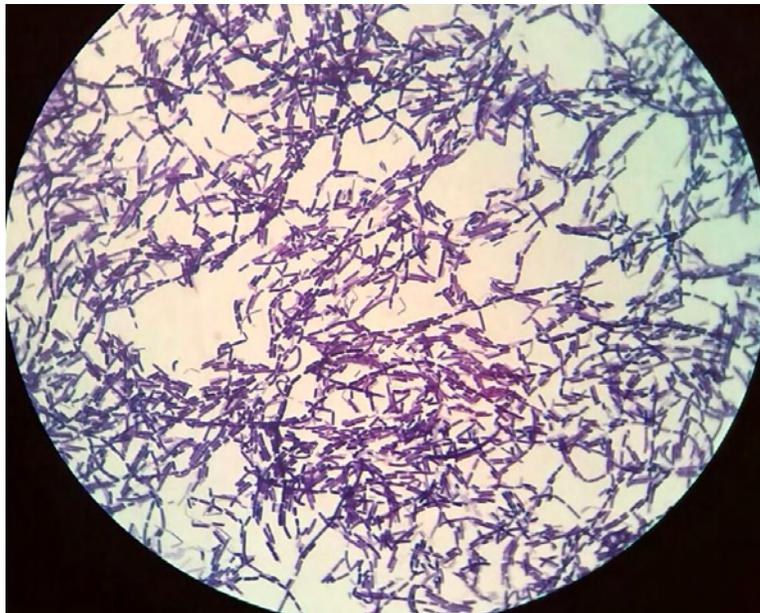
5. RESULTADOS

Para obtener los resultados de la primera variable planteada, inicialmente fue necesario evaluar la morfología de las colonias (ver figura 24) las cuales fueron aisladas, e identificadas a partir de la extracción del tracto digestivo de juveniles de camarón. Para la identificación de la especie bacteriana se realizó pruebas bioquímicas y se interpretó de acuerdo a los manuales de Brock⁵⁶ y Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.⁵⁷

5.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE LA CEPA CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO Y SU CRECIMIENTO

5.1.1 Tinción de Gram. De acuerdo a la tinción de Gram se puede afirmar que se observó bacterias Gram positivas; de color violeta con forma alargada correspondiente a un bacilo como se observa en la Figura 13.

Figura 13. *Bacillus* sp Objetivo 100x



⁵⁶ BROCK, T. Microbiología. Sexta edición. Universidad de Madrid.1991. Mexico. p. 954

⁵⁷ KRLEY, N., HOLT, J. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Vol. 2. Editorial Williams y wilkins. USA. 1986. p. 1105.

5.1.2 Agar Mac Conkey. Según la UCV⁵⁸ afirma que este medio selectivo diferencial es utilizado, para el aislamiento y diferenciación de bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Por esta razón a la hora de sembrar el inóculo en este medio el resultado fue negativo porque no hubo un crecimiento, lo que demuestra y afirma que la bacteria que se pretendió evaluar no es Gram negativa.

5.1.3 Tinción de Endospora. En la figura 14 se puede observar que los resultados obtenidos en la investigación en cuanto a la tinción, el bacilo que se evaluó es una bacteria esporulada, de acuerdo con Madigan et al⁵⁹, Cutting⁶⁰, Brock⁶¹, definen que esta es una característica del género *Bacillus sp*, además de presentar la condición de una espora terminal, que determina a esta bacteria a resistir a ambientes adversos (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos), los mismos autores resaltan que la capacidad para formar endosporas debe constituir una ventaja para un microorganismo ya que puede soportar ambiente muy variable en términos nutricionales. De ahí que esta estructura es capaz de permanecer latente durante largos periodos y mantener una supervivencia en la naturaleza.

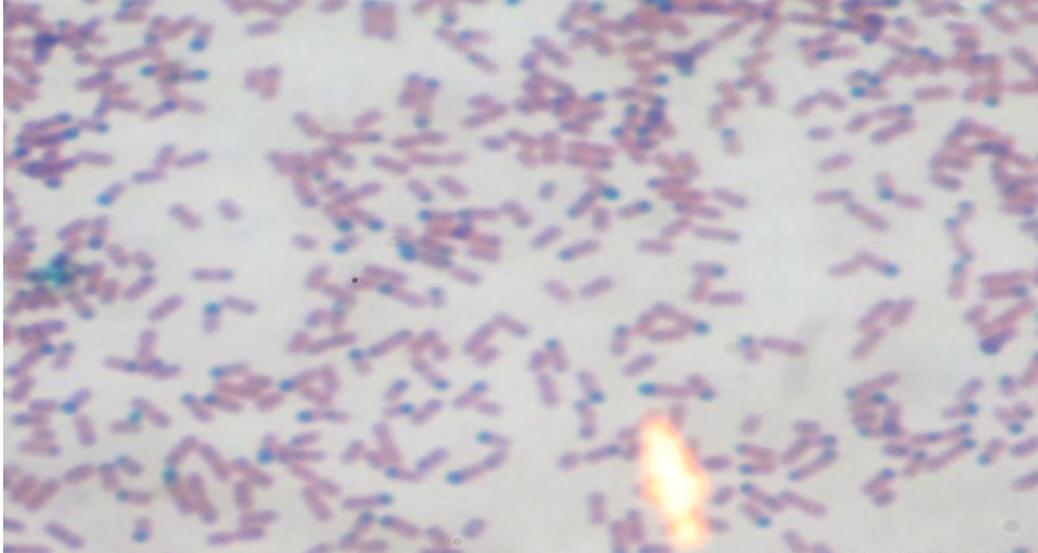
⁵⁸UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. Agar Macconkey. Disponible en internet: URL: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/macconkey.pdf

⁵⁹ MADIGAN, M. MARTINKO, J. DUNLAP, P. CLARK, D. Brock biología de los microorganismos. Pearson educación. 2009. España. p. 496.

⁶⁰ CUTTING, S. op.cit.

⁶¹ BROCK, T. op. Cit. p. 85

Figura 14. *Bacillus* sp con endospora 100x



5.1.4 Prueba de Catalasa. Se observó el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno lo que indicó que la prueba es positiva y se afirma que la bacteria evaluada es un bacillo aerobio por la presencia de la enzima catalasa la cual descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, esto lo afirma Gonzales⁶², cabe resaltar que la mayoría de los bacillos tienen esta enzima y la poseen las bacterias aerobias.

5.1.5 Prueba de motilidad. Según Brock⁶³ define que las bacterias son móviles y esta capacidad para desplazarse independientemente en general, es debida a la presencia de un organelo especial para la motilidad, el flagelo; además resalta que en todos los casos de motilidad en estos microorganismos, el proceso ocasiona que la célula sea capaz de alcanzar diferentes regiones de su microambiente en la lucha por la supervivencia, el poder desplazarse a otro lugar puede significar la diferencia entre la supervivencia y la muerte de la célula, por lo tanto al realizar esta prueba demostró que la bacteria evaluada presenta una motilidad positiva

⁶²GONZALES, M. op cit. p 42.

⁶³ BROCK, T. op cit. p.69

como se observa en la figura 15 y como lo afirma Koneman⁶⁴ que la mayoría de bacterias motiles son de morfología bacilar ósea *Bacillus*

Figura 15. Motilidad positiva



La tabla 2 respalda lo señalado por Rengpipat et al⁶⁵ y Ochoa et al⁶⁶ donde afirman que las pruebas realizadas en este presente estudio son suficientes para la identificación de las bacterias evaluadas, cabe resaltar que tanto el trabajo realizado por estos autores y la presente investigación se identificó la cepa como *Bacillus sp* por los resultados que arrojaron las pruebas bioquímicas realizadas.

⁶⁴KONEMAN, Pruebas bioquímicas para la identificación de diagnóstico bacteriológico texto y atlas a color 6ed, panamericana, argentina. 2006. disponible en internet: www.microbiotot.wordpress.com/2011/09/27pruebas-bioquimicas-primarias/

⁶⁵RENGPIPAT, S., PHIANPHAK, W., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 1998. disponible en internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848698003056>

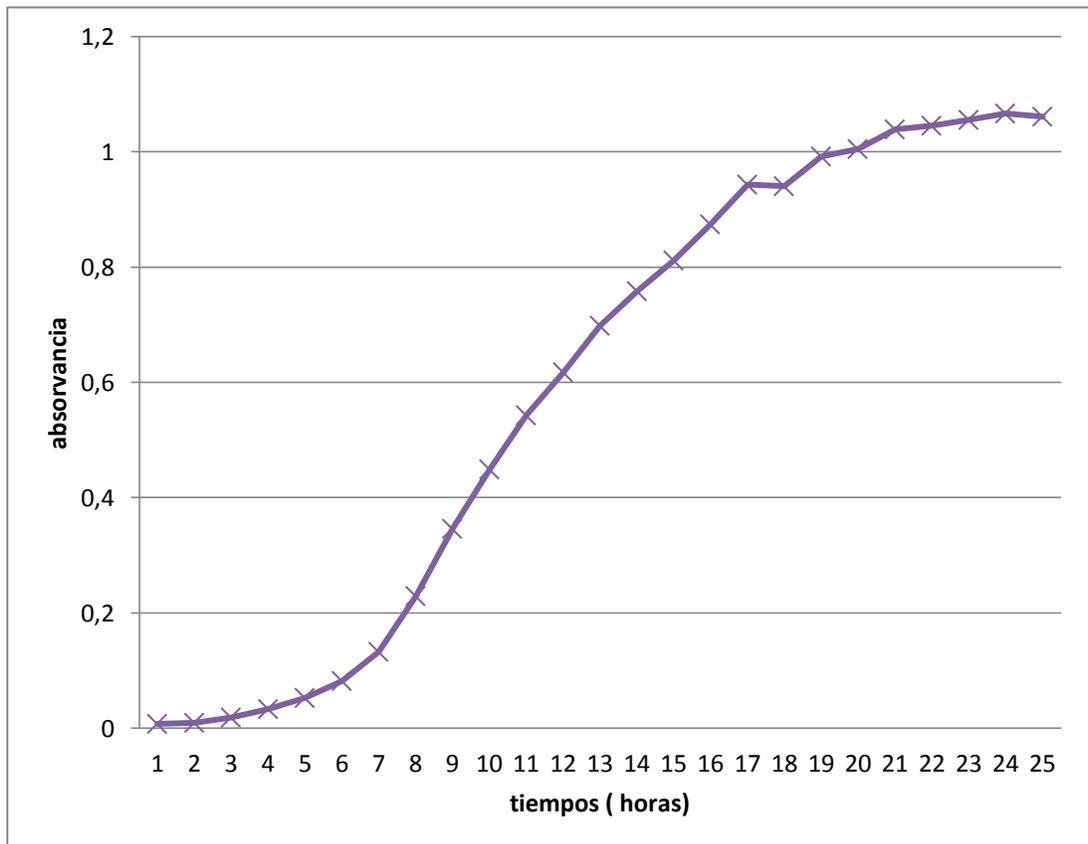
⁶⁶OCHOA-SOLANO, J; OLMOS-SOTO, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. *Food microbiology*, 2006, vol. 23, no 6. p. 519-525.

Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas

PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESULTADOS		OBSERVACIONES
	POSITIVO	NEGATIVO	
TINCION DE GRAM	+		Bacilos alargados
PRUEBA Mac Conkey		-	
TINCION DE ENDOSPORA	+		Endospora ubicada en posición terminal
PRUEBA CATALASA	+		
PRUEBA MOTILIDAD	+		

5.1.6 Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las mediciones de crecimiento bacteriano se indican en la figura 16 donde se observa las fases de crecimiento de la cepa.

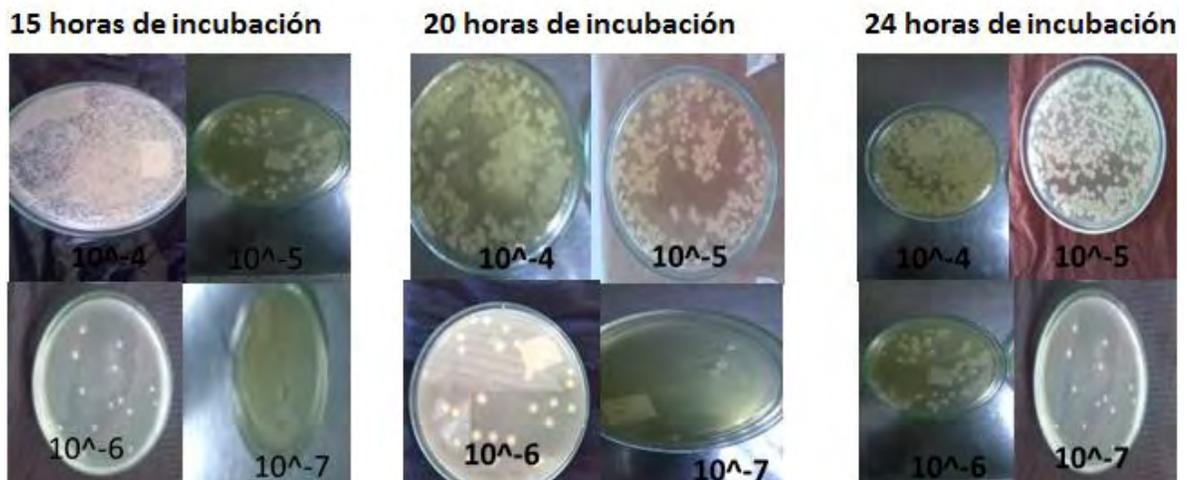
Figura 16. Curva de crecimiento bacteriano de *Bacillus sp.*



Una vez determinado el tiempo de incubación que fue de 15, 20 y 24 horas se identificaron las cepas como se muestra en la figura 17.

En la tabla 3 se indica el resultado del conteo que se expresó como UFC/ml, para ello se encontró que la mayor cantidad de unidades formadoras de colonia fue a las 24 horas de haber sembrado la muestra con una cantidad de 130×10^6 UFC/mL. A partir de esta cantidad de UFC se suministró a los diferentes tratamientos del presente estudio de la siguiente manera $T_2= 1$ mL para cada una de las réplicas con un total de 130×10^6 UFC, para el $T_3= 2$ mL con un total de 260×10^6 UFC, para el $T_4= 3$ mL correspondiente a 390×10^6 UFC. Autores como Villaseñor et al,⁶⁷ concluyen en sus investigaciones que al extraer un *Bacillus sp* de camarón blanco adultos sanos se realizó un conteo de UFC donde aplicaron concentraciones diaria de 1×10^5 UFC/ mL, a los tratamientos obteniendo altas supervivencias, lo cual se compara con las dosis del trabajo realizado ya que dichas concentraciones fueron mayores y por tal motivo se obtuvo una similitud en cuanto al parámetro de supervivencia.

Figura 17. Resultados de las diluciones seriadas.



⁶⁷IRASEMA, E., VILLASEÑOR, L., RODRÍGUEZ, M., GÓMEZ, B., Gil, ASCENCIO, F.,-Valle, CAMPA, Á., -Córdova Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S. 23096, Mexico. 2011.p.1.citado el 13 de abril de 2015. Disponible en internet:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611006843>

Tabla 3. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

DILUCION	Tiempos de incubación					
	15 horas		20 horas		24 horas	
	UFC	UFC	UFC	UFC	UFC	UFC
10 ⁻¹	>300		>300		>300	
10 ⁻²	>300		>300		>300	
10 ⁻³	>300		>300		>300	
10 ⁻⁴	>300		>300		>300	
10 ⁻⁵	93	93 * 10 ⁵	270	270 * 10 ⁵	>300	
10 ⁻⁶	9	9 * 10 ⁶	20	20 * 10 ⁶	130	130 * 10 ⁶
10 ⁻⁷	0	0	3	3 * 10 ⁷	15	15 * 10 ⁷

5.2 TASA DE CRECIMIENTO SIMPLE PARA LONGITUD (TCSL)

Mediante un análisis de varianza se evaluó el parámetro que relaciona la tasa de crecimiento simple, presentándose diferencias significativas ($0.02 < 0.05$) entre tratamientos, (Anexo D), por lo cual se realizó la prueba de rangos múltiples (Tukey) con el fin de establecer las diferencias estadísticas entre los tratamientos, de acuerdo con esta prueba se establece que el valor promedio más bajo lo reportó el tratamiento T₀ con 0.0042 cm/hora donde se suministró alimento concentrado sin bacterias probióticas, seguido del T₂ con 0.0044cm/hora, constituido por alimento concentrado, la dosis más baja de probiótico evaluado; los tratamientos T₁, T₃ y T₄ registraron incremento de longitud homogéneas y mayores que los anteriores con medias de 0,00471, 0,00470, 0,00477cm/hora respectivamente. Cabe resaltar que el tratamiento T₄ presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al T₀, tal como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Tasa de Crecimiento Simple cm/hora

Muestreo (cm/hora)						
tratamiento	1	2	3	4	5	Promedio
0	0,00389	0,00461	0,00465	0,00417	0,00406	0,00428 X
1	0,00458	0,00487	0,00474	0,00487	0,00447	0,00471 XX
2	0,00499	0,00471	0,00453	0,00410	0,00404	0,00447 XX
3	0,00489	0,00508	0,00486	0,00453	0,00414	0,00470 XX
4	0,00492	0,00526	0,00516	0,00445	0,00409	0,00477 X

X diferencia significativa
XX medias homogéneas

5.3 SUPERVIVENCIA DE LOS CAMARONES

La prueba de Brand y Snedecor estableció diferencias significativas entre algunos tratamientos con relación al parámetro de supervivencia, con un 95% de confianza, (Anexo E); las medias de los tratamientos T₁, que correspondió a un probiótico comercial con supervivencia del 93.56% y los tratamientos T₂ y T₃ que presentaron promedios de 88.33 y 91.44% respectivamente, son estadísticamente homogéneas; mientras que el tratamiento testigo T₀ obtuvo un valor inferior (37.11%), y se resalta que el mayor valor de supervivencia se presentó en el tratamiento T₄ con un promedio de 94,67%, donde se suministraron 3 ml del probiótico evaluado, equivalente a una concentración de 390.000.000 UFC/ml., como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de supervivencia en los tratamientos durante la investigación

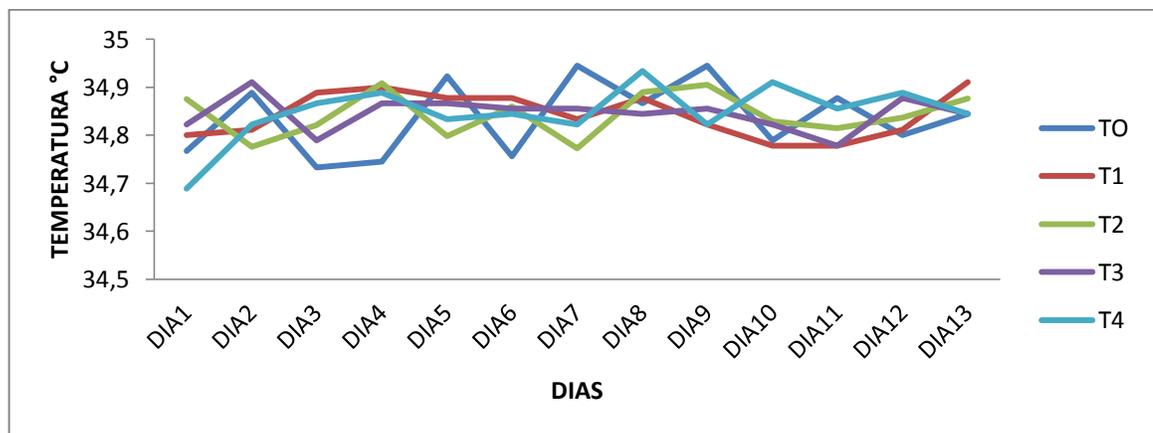
TRATAMIENTOS	NUMERO DE ANIMALES INICIALES	NUMERO DE ANIMALES FINALES	MORTALIDAD	SUPERVIVENCIA%
T0	900	334	566	37,11 X
T1	900	842	58	93,56 XX
T2	900	795	105	88,33 XX
T3	900	823	77	91,44XX
T4	900	852	48	94,67 XXX

X Diferencias Significativas
 XX Datos Homogéneos
 XXX Diferencias Significativas

5.4 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA

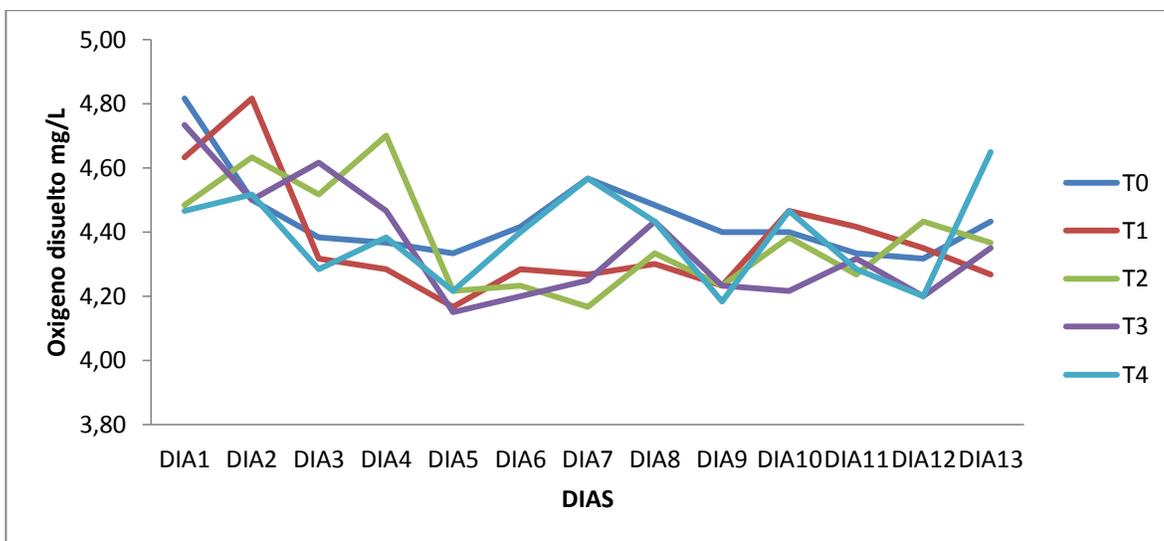
5.4.1 Temperatura. Se registró una temperatura promedio durante el periodo de estudio de 34.84 °C (Figura 18), presentándose temperaturas mínimas y máximas de 34.84 °C y 34.85 °C respectivamente. El análisis de varianza estableció que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos mañana (0.23 > 0.05), medio día (0.72 > 0.05), y tarde (0.65 > 0.05). (Anexo H).

Figura 18. Curva de temperatura promedio diario (C°).



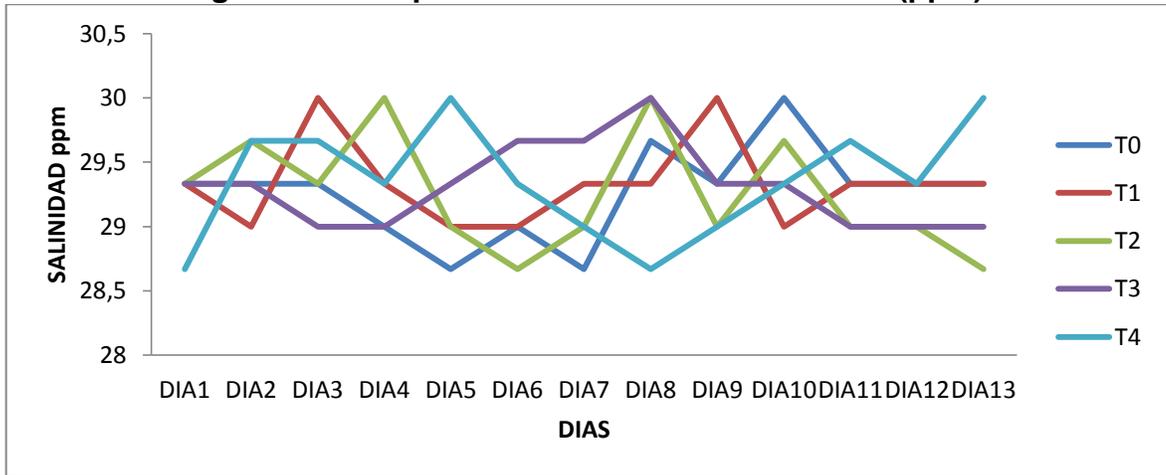
5.4.2 Oxígeno disuelto. Se efectuó un análisis de varianza para dos jornadas, mañana ($0.87 > 0.05$) y tarde ($0.55 > 0.05$); no presentó diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95% (Anexo J). El valor promedio para oxígeno disuelto fue de 4.39 mg/L. con un valor mínimo de 4,36 mg/L y un máximo de 4,44 mg/L la curva que se obtuvo en la recolección de datos se observa en la figura 19.

Figura 19. Curva del comportamiento diario de Oxígeno disuelto (mg/L)



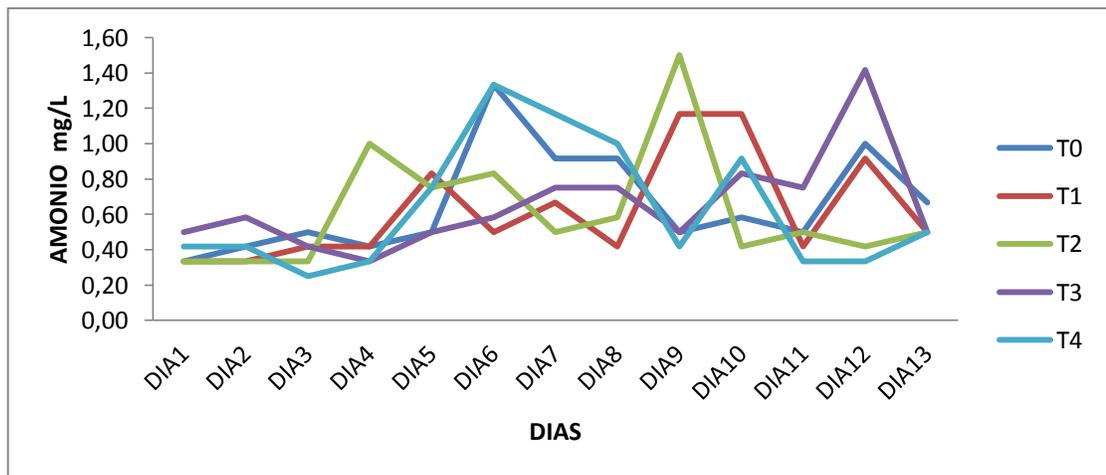
5.4.4 Salinidad. La figura 20 muestra el comportamiento de salinidad la cual estuvo entre 29.26 y 29.36 con un promedio de 29.30. El análisis de varianza presento ($0.95 > 0.05$) lo que indica que este parámetro no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Anexo L).

Figura 20. Comportamiento diario de Salinidad (ppM).



5.4.5 Amonio. El comportamiento del amonio durante el periodo experimental estuvo entre los valores de 0.62 y 0.66 con un promedio de 0.63 como muestra la figura 21. El análisis de varianza presento ($0.97 > 0.05$) donde este parámetro no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Anexo N).

Figura 21. Curva del comportamiento diario de Amonio (mg/L)



5.5 RELACIÓN BENEFICIO / COSTO

Los mayores costos fueron generados por los medios de cultivo que representa aproximadamente el 69,76%, seguidos por los materiales de laboratorios del 9,57% y el más bajo fue la compra de los elementos como las nasas del 0,14%. Los costos de la investigación generaron una inversión parcial \$5,017.000, los porcentajes de la investigación se observan en la tabla 6.

Tabla 6. Costos parciales

Detalle	Cantidad	UNI de medida	Valor unitario	Valor total	%
Animales	4500	UN	5	22500	0,45
Alimento	1	Kg	75000	75000	1,49
Piedras difusoras	15	UNIDAD	1500	22500	0,45
Nasas	2	UNIDAD	3500	7000	0,14
Probiótico comercial	1	Kg	90000	90000	4,98
Recipientes de vidrio de 5 litros	16		30000	480000	9,57
Medios de cultivos	5	Lb	700000	3500000	69,76
Materiales de laboratorio	1		500000	500000	9,97
Papelería	2	UNIDAD	20000	40000	0,80
Impresión	10	UNIDAD	12000	120000	2,39
total				5017000	100

En este análisis se consideró los costos por alimento, mano de obra, cantidad de probióticos, compra de larvas, y demás elementos para los diferentes tratamientos y se determinó la relación beneficio costo. La mejor relación en cuanto a beneficio/costo se registraron en el tratamiento T4 registró el mejor resultado en cuanto a esta variable, indicando que por unidad monetaria invertida se tienen 1,68 pesos de ingreso además de presentarse una mayor supervivencia reflejada en una mayor rentabilidad en comparación con los demás tratamientos como se indica en la (Tabla 7) seguido por los tratamientos T1 y T3 con un valor de 1.66 y 1.63 respectivamente. Para el tratamiento T2 se aprecia una relación beneficio costo de

1.58 por lo tanto estos tratamientos son viables económicamente, excepto el tratamiento T0 que obtuvo un 0.67 lo que muestra que no es viable.

Tabla 7. Relación Beneficio/ Costo

	COSTOS TOTALES	NUMERO DE ANIMALES	PRECIO DE VENTA	INGRESO BRUTO	INGRESO NETO	Beneficio/costo
T0	5022,31	334	10	3340	-1682,31	0,67
T1	5085,10	842	10	8420	3334,90	1,66
T2	5036,35	795	10	7950	2913,65	1,58
T3	5050,39	823	10	8230	3179,61	1,63
T4	5064,43	852	10	8520	3455,57	1,68

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 TASA DE CRECIMIENTO SIMPLE PARA LONGITUD (TCSL).

Esta investigación demostró que la administración del probiótico de *Bacillus sp* mejoró significativamente el crecimiento de las larvas de camarón, tal como lo indica la figura 22, cuyo efecto podría atribuir a su alta capacidad de colonización y al fenómeno conocido como exclusión competitiva en el epitelio del tracto gastrointestinal, tal como lo refieren Wang⁶⁸; Sahu et al⁶⁹; Lara-Flores⁷⁰; Nimrat et al⁷¹, Nejad et al⁷², Chiu et al⁷³; en sus investigaciones donde aseguran que bacterias del género *Bacillus sp* en el ambiente del tracto digestivo del camarón blanco pueden formar asociaciones simbióticas mediante las cuales mejoran la respuesta fisiológica del huésped. Además comentan que después de la colonización, las bacterias probióticas generalmente utilizan una variedad de sustancias para su crecimiento y al mismo tiempo liberan enzimas digestivas pertinentes y otros factores de crecimiento necesarios que facilitan la asimilación de nutrientes, previniendo trastornos intestinales y un mayor crecimiento, es por esta razón, también que los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que la cepa aislada y evaluada presenta características probióticas similares y/o

⁶⁸ WANG, Y. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2007, vol. 269, no 1. p. 259-264.

⁶⁹ SAHU, M.K., SWARNAKUMAR, N.S., SIVAKUMAR, K., THANGARADJOU, T., KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian journal of microbiology*, 2008, vol. 48, no 3. p. 299-308

⁷⁰ LARA-FLORES, M. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *Int Res J Microbiol*, 2011, vol. 2, no 12. p. 471-478.

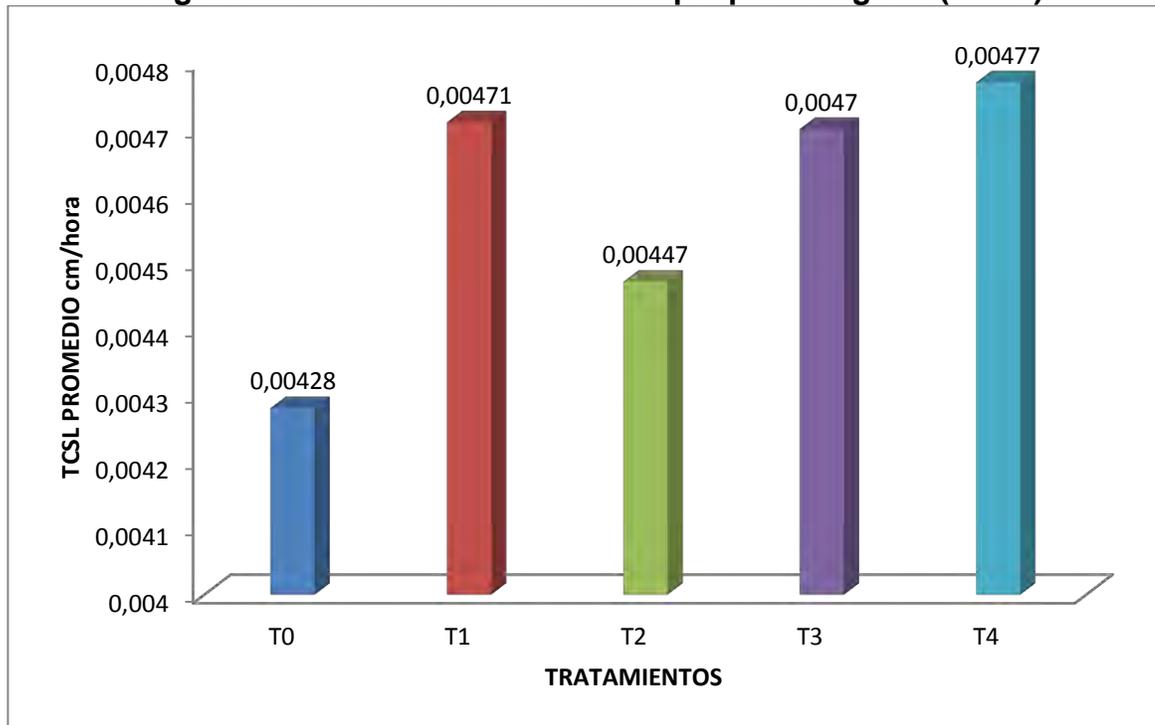
⁷¹ NIMRAT, S., SUKSAWAT, S., BOONTHAI, T., VUTHIPHANDCHAI, V. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary microbiology*, 2012, vol. 159, no 3. p. 443-450.

⁷² ZIAEI-NEJAD, S., REZAEI, M., TAKAMI, G., LOVETT, D., MIRVAGHEFI, A., SHAKOURI, M. The Effect Of *Bacillus* Spp. Bacteria Used As Probiotics On Digestive Enzyme Activity, Survival And Growth In The Indian White Shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, University of Tehran, Karaj, Iran, 2006. Disponible en internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848605004825>

⁷³ LIU, K; CHIU, H; SHIU, Y; CHENG, W; LIU, H. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, vol. 28, no 5. p. 837-844.

mejores a las reportadas por los autores arriba citados, reflejado en el óptimo crecimiento de los diversos tratamientos, especialmente del T4.

Figura 22. Tasa de crecimiento simple para longitud (TCSL)



Por otra parte, Nejad et al,⁷⁴ comprobó que el uso de probióticos tipo *Bacillus sp* en camarón blanco, aumentaron significativamente las actividades enzimáticas de lipasas, proteasas y amilasas, por lo que argumentan una correlación directamente proporcional entre el efecto probiótico y un mayor crecimiento en las larvas tratadas. Así mismo, Ramos⁷⁵ establece que las tasas de crecimiento obtenidas variaron entre 0.00054 y 0,0052 cm/hora, con un valor medio de 0.002 cm/hora, confirmando que el crecimiento es mayor en las primeras etapas de desarrollo individual, resultados que concuerdan con los datos encontrados en la

⁷⁴ ZIAEI-NEJAD, S., REZAEI, M., TAKAMI, G., LOVETT, D., MIRVAGHEFI, A., SHAKOURI, M. op. cit.

⁷⁵ RAMOS, Sebastián. Composición por tallas, edad y crecimiento de *litopenaeus vannamei*. Oaxaca, México: Instituto Nacional de Pesca. Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP).p.5

presente investigación, con valores de 0,0048 y 0,0047cm/hora correspondientes a los tratamientos T4 y T3 respectivamente.

Es importante resaltar, que este crecimiento mencionado es mayor al reportado por ese autor lo que podría indicar que al añadir mayores concentraciones del probiótico al alimento mejora significativamente el crecimiento de las larvas tratadas a diferencia del tratamiento T₀ (0,0043cm /hora) donde no se adicionó la bacteria probiótica, en este mismo sentido en el tratamiento T₂ con menores valores para el crecimiento pueden estar relacionados con la menor concentración de la dosis del probiótico, afectando posiblemente su buena capacidad de colonización y exclusión competitiva en el epitelio del tracto gastrointestinal del camarón.

6.2 SUPERVIVENCIA

En la figura 23 se puede ver que el probiótico comercial presentó resultados similares comparado con las dos primeras dosis (tratamientos T₂ y T₃) del probiótico aislado y evaluado en la presente investigación., aunque más importante aún son los datos del tratamiento T₄ (94.67%) parámetros que son superiores a los reportados por la literatura tanto en la producción de camarón en el periodo de cultivo como en el proceso de larvicultura (Uriel ⁷⁶; Ziaei-Nejad et al⁷⁷, Moriarty⁷⁸, Thompson et al⁷⁹; Verschuere et al⁸⁰ Rengpipat et al⁸¹)

⁷⁶ URIEL, Francisco. Comparacion de la tasa de supervivencia de *Penaeus vannamei* en verano. Mexico: Universidad Autonoma de Mexico. p. 20.

⁷⁷ ZIAEI-NEJAD, S., REZAEI, M., TAKAMI, G., LOVETT, D., MIRVAGHEFI, A., SHAKOURI, M. op. cit.

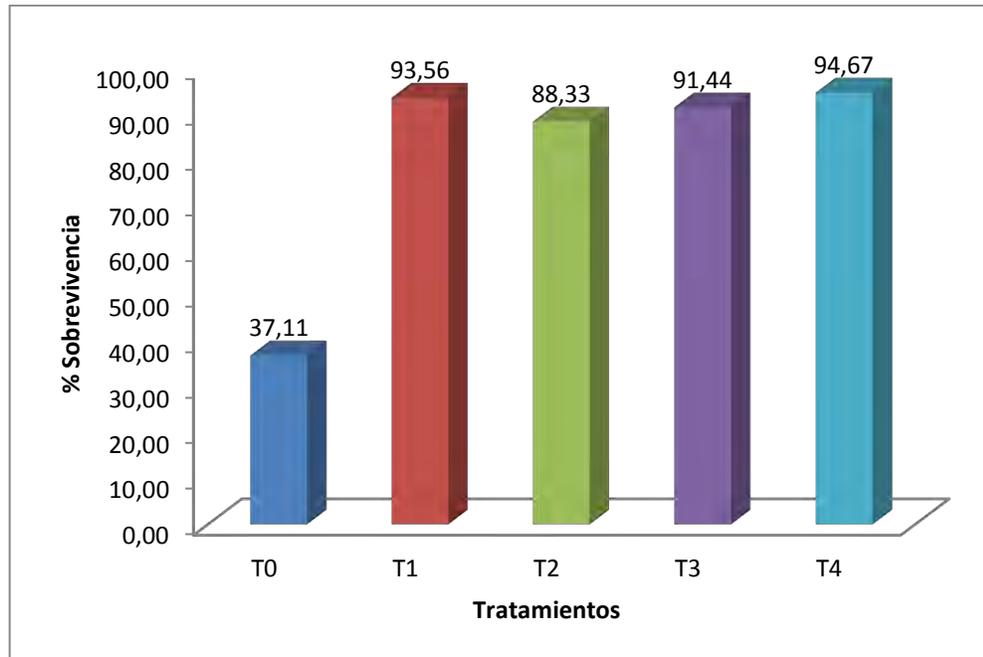
⁷⁸ MORIARTY, D. Microbial biotechnology: a key ingredient for sustainable aquaculture. Info fish Int. 4, 1996. p. 29– 33.

⁷⁹ THOMPSON, Fabiano L.; ABREU, Paulo C.; CAVALLI, Ronaldo. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* is larvae. *Aquaculture*, 1999, vol. 174, no 1. p. 139-153.

⁸⁰ VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2000, vol. 64, no 4. p. 655-671.

⁸¹ RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASAVETA, P., Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, vol. 191, no 4. p. 271-288.

Figura 23. Porcentaje de supervivencia en los diferentes tratamientos



Las evidentes ventajas del uso de probióticos vienen siendo investigadas por autores como Nejad et al,⁸² quienes también obtuvieron resultados positivos en los incrementos de supervivencia de camarón blanco en la etapa de mysis 1 a postlarva PI14.

Otro aspecto a tener en cuenta en el análisis de estos resultados es lo comentado por Rengpipat et al⁸³, b,2000⁸⁴ quienes además de encontrar altos niveles de supervivencia en larvicultura por el uso de probióticos donde obtuvo un 100% de supervivencia; mientras que el tratamiento control tenía sólo el 26% de

⁸²ZIAEI-NEJAD, S., REZAEI, M., TAKAMI, G., LOVETT, D., MIRVAGHEFI, A., SHAKOURI, M. op. cit.

⁸³RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA, P., 1998b. Probiotics in aquaculture: a case study of probiotics for larvae of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). In: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

⁸⁴RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASAVETA, P., Op. cit. p. 271-288

supervivencia, justifican que en la acción benéfica actúan exoenzimas digestivas, y, además agregan que los probióticos son capaces de mejorar el sistema inmunológico de los animales aumentando su resistencia a la presencia de bacterias oportunistas disminuyendo los niveles de mortalidad, tal como se reporta en el presente trabajo.

Los resultados aquí reportados son ratificados por estos autores en el sentido de que las bacterias evaluadas en camarón mejoran los parámetros zootécnicos de crecimiento y supervivencia. También es interesante comparar los resultados obtenidos con los hallazgos de Zokaeifar et al⁸⁵ quienes evaluaron dos cepas probióticas de *Bacillus subtilis* en el desempeño del crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas, sistema inmunológico, expresión génica y la resistencia a las enfermedades del camarón blanco juvenil (*Litopenaeus vannamei*), demostrando diferencias estadísticas significativas al comparar con el tratamiento control en cuanto a una mayor supervivencia y mejoría en otros parámetros en los camarones tratados con cepas de bacterias probióticas de los bacilos mencionado anteriormente.

Por otra parte, en los resultados obtenidos en esta investigación se observan bajos porcentajes de supervivencia en el tratamiento T₀ (37.11 %), que coinciden con los resultados obtenidos por los autores antes citados, quienes en el tratamiento control reportan un 36.37 % de supervivencia, sin embargo es oportuno resaltar que los valores de supervivencia aquí reportados, especialmente en el tratamiento T₄ superan ampliamente a los resultados de dichos autores quienes con dosis de *Bacillus subtilis* de 10⁵ y 10⁸ UFC/ml encontraron supervivencias del 80 % y 66.7 % respectivamente.

Además de lo anterior, también autores como Balcazar et al⁸⁶, Zhu et al⁸⁷, Chiu et al⁸⁸, y Mohammadpour et al⁸⁹ resaltan que la administración de bacillus sp en el

⁸⁵ZOKAEIFAR, H., BALCÁZAR, J., SAAD, C., KAMARUDIN, M., SIJAM, K., ARSHAD, A., NEJAT, N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. 2012. Disponible en internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464812001957#bib12>

⁸⁶BALCAZAR, J., ROJAS, T. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current microbiology*, 2007, vol. 55, no 5, p. 409-412.

alimento de larvas de camarón blanco mejoraron significativamente la supervivencia, tal como se reporta en el presente trabajo, y que dicha bacteria ha traído resultados altamente prometedores para la acuicultura del camarón. Esta bacteria probiótica, Gram positiva, no patogénica y formadora de esporas que se ha utilizado para mejorar el crecimiento, la salud de los camarones y prevenir algunas enfermedades son capaces de producir una amplia gama de sustancias extracelulares y péptidos antimicrobianos contra una gran variedad de microorganismos, aunque autores como Zhu et al⁹⁰, Wang et al⁹¹ y Wang⁹², han demostrado los efectos beneficiosos de los probióticos en el desempeño productivo en camarones, el mecanismo exacto de acción no se conoce bien. La primera explicación podría estar relacionada con la acción de la exclusión competitiva (Merrifield et al⁹³, Ibrahim⁹⁴, Lara-Flores⁹⁵, Thompson et al⁹⁶; Verschuere et al⁹⁷, Fuller⁹⁸), por el que los probióticos pueden crear un ambiente

⁸⁷SHEN, W., FU, L., LI, W., ZHU, Y. SHEN. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 2010, vol. 41, no 11. p. 1691-1698.

⁸⁸TSENG, D., HO, P., HUANG, S., CHENG, S., SHIU, Y., CHIU, *et al*. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shell fish Immunology*, 2009, vol. 26, no 2. p. 339-344.

⁸⁹KEYSAMI, M., MOHAMMADPOUR, M., SAAD, C. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* in juvenile fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at different methods of administration to the feed. *Aquaculture International*, 2012, vol. 20, no 3. p. 499-511.

⁹⁰W.-Y. Shen, L.-L. Fu, W.-F. Li, Y.-R. Zhu. *op. cit.*

⁹¹LIU, C., CHIU, S., Ho, P., WAND, W. Improvement in the growth performance of whiteshrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of applied microbiology*, 2009, vol. 107, no 3, p. 1031-1041.

⁹²WANG, Y. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 2007, vol. 269, no 1. p. 259-264.

⁹³ MERRIFIELD, D; RINGO, E. *Aquaculture Nutrition gut health, Probiotics and Prebiotics*. 2014. p. 290-318

⁹⁴ IBRAHEM, M. Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospective. 2013

⁹⁵ LARA-FLORES, Maurilio. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *Int Res J Microbiol*, 2011, vol. 2, no 12. p. 471-478.

⁹⁶ THOMPSON, F; ABREU, P; CAVALLI, R. *op. cit.* p. 139-153.

⁹⁷ VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. *op. cit.* p.655– 671.

hostil para la colonización de patógenos y mejorar aspectos nutricionales, tal como se analiza a continuación.

En este sentido, la mejora del parámetro de supervivencia de larvas de camarón por *B. subtilis* según las investigaciones reportadas y por el *Bacillus sp*, evaluado en este trabajo, puede ser debido a la inducción de exoenzimas, que incluyen proteasas, lipásas y amilasas, que en consecuencia estimulan la actividad de las enzimas digestivas natural del huésped, ya que se obtiene una mejor digestibilidad de proteínas, carbohidratos y lípidos tal como lo afirman Ochoa et al⁹⁹, y también ratificado por Wang et al¹⁰⁰ y Wang¹⁰¹.

Por otro lado la presencia del probiótico evaluado *Bacillus sp*, mejora la supervivencia de larvas de camarón debido a que a la hora de administrar el probiótico esta bacteria es dominante y es capaz de colonizar los ambientes tanto en la columna del agua como en tracto digestivo del camarón además puede remplazar *Vibrio spp* aumentando así la supervivencia en camarones, dichas bacterias compiten por nutrientes y espacio y a la vez pueden excluir otras bacterias a través de la producción de los antibióticos (Rengpipat et al¹⁰²).

Además Balcázar¹⁰³ manifiesta que diversas investigaciones han demostrado que la calidad del agua ha sido asociada especialmente con *Bacillus sp*; por cuanto las bacterias Gram positivas son buenas metabolizando la materia orgánica. Durante el ciclo productivo del estanque los altos niveles de estas bacterias pueden minimizar las partículas de carbono orgánico. Los mismos autores, concretamente han reportado que el uso de *Bacillus sp* mejora la calidad del agua, la supervivencia, y el estado de salud de los camarones juveniles *P. monodón*, y

⁹⁸ FULLER, R. op. cit, p. 377-386.

⁹⁹ OCHOA, L., OLMOS, J. The functional property of *Bacillus* for shrimp feeds. 2006

¹⁰⁰ C.H. Liu, C.S. Chiu, P.L. Ho, S.W. Wang. op. cit

¹⁰¹ Wang, Y. op. cit

¹⁰² RENGPIPAT, S., RUKPRATANPORN, S., PIYATIRATITIVORAKUL, S., MENASVETA, P. op. cit

¹⁰³ BALCAZAR, L., The role of probiotics in aquaculture. USA: Universidad de Zaragoza, 2006.p. 174.

reduce los *vibrios* patógenos, los anteriores reportes ratifican los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a los altos niveles de supervivencia obtenidos. Ochoa et al ¹⁰⁴ y Verschuere et al ¹⁰⁵ mencionan que los contenidos de proteínas en alimentos concentrados para camarones puede afectar la calidad del agua obtenido por las altas liberaciones de nitrógeno, metabolitos y como consecuencia la proliferación de enfermedades por esta razón existe un mayor interés en: el desarrollo ecológico, los contenidos de los alimentos funcionales, esto con el fin de obtener un crecimiento óptimo en los camarones, siendo mejor la adición de proteínas de origen vegetal y bacterias probióticas.

Por último según Uriel ¹⁰⁶ la supervivencia en *P. vannamei* en cuatro tratamientos, utilizando concentrados con 25% y 32% en proteína con inmunoestimulantes al 1% del alimento, se obtuvo un 80% de supervivencia en dos tratamientos, los cuales presentaron mejores rendimientos productivos en la combinación de alimentos ricos en proteína con inmunoestimulantes; y el menor porcentaje de supervivencia fue de 47% que se debió a la falta de proteínas en el alimento; de acuerdo al análisis anterior la supervivencia obtenida en la presente investigación con el probiótico evaluado presentó un 94.67%, en el tratamiento T4 y al comparar con la obtenida por este autor se puede observar que existe una similitud en cuanto a resultados, es decir que el parámetro de supervivencia mejora a medida que se aumenta la dosis de probiótico al alimento, cabe resaltar que el valor más bajo fue de 37.11% en el tratamiento T0, y es menor en comparación al porcentaje de 47% que obtuvo Uriel en su investigación.

¹⁰⁴ OCHOA, L., OLMOS, J. op. cit

¹⁰⁵ VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W. op. cit. p. 655– 671.

¹⁰⁶ URIEL, F. Comparación de la Tasa de Supervivencia de *Penaeus vannamei* en Verano. Mexico: Universidad Autónoma de México. p. 20.

6.3 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

6.3.1 Temperatura. Según Cordoba¹⁰⁷ este parámetro influye en el metabolismo de todos los organismos acuáticos con un rango óptimo de temperatura en el cual desarrollan sus funciones metabólicas, en el caso del camarón blanco *Litopenaeus vanameii*, para este autor puede sobrevivir a una temperatura de 25 a 30°C. Sin embargo los valores promedio por muestreo de temperatura obtenidos en esta investigación oscilaron entre 34-35 °C, valores que corresponden al protocolo de la empresa donde se realizó esta investigación respaldada en las recomendaciones de Morla¹⁰⁸.

6.3.2 Oxígeno disuelto. Boyd et al¹⁰⁹ y Cordoba¹¹⁰ mencionan que este parámetro es importante que se encuentre en niveles adecuados para poder sobrevivir, los niveles óptimos de oxígeno disuelto recomendado para camarones varían entre 4 y 5mg/L, dependiendo de diversos factores tales como la densidad de siembra, biomasa, salinidad, temperatura, entre otros. Los valores obtenidos durante el periodo experimental están dentro del rango establecido por los autores mencionados, y se consideran adecuados para la larvicultura de camarón.

6.3.3 Salinidad. Cordoba¹¹¹ y la FAO¹¹², afirman que esta variable tiene relación con el equilibrio osmótico que debe existir entre los fluidos del organismo y el medio. Fuera de su rango el desempeño biológico disminuye y, aunque pueden

¹⁰⁷ CORDOBA, R. Camaronicultura Sustentable; manejo y evaluación. Editorial: trillas. 2009. Mexico.p.20.

¹⁰⁸ MORLA, F. Metodología de Cultivo Comercial de Camarón en Ecuador. Disponible en internet: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8888/1/Clase02.pdf>.

¹⁰⁹ BOYD, C; LIN, C; PANTOJA, C; LIGHTNER, D; BROCK, J; JOHNSON, K; TREECE, G. Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Camarón. 2005. Disponible en internet: http://www.crc.uri.edu/download/PKD_good_mgt_field_manual.pdf

¹¹⁰ CORDOBA, R. op. cit, p.21.

¹¹¹ Ibid., p.21

¹¹² ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Consultoría en cultivo de camarón. 1ra misión del 16/07/88 al 24/12/88. FAO, <http://www.fao.org/docrep/field/003/ac397s/AC397S05.htm>

sobrevivir en algunos casos, su crecimiento se ve afectado, ya que gastan parte de la energía en mantener el equilibrio osmótico; para su desarrollo óptimo se da entre 15 y 30 ppm, durante el periodo de investigación los valores de salinidad oscilaron entre 29,26 y 29,36ppm, rangos que son adecuados para dicha especie en la etapa larval.

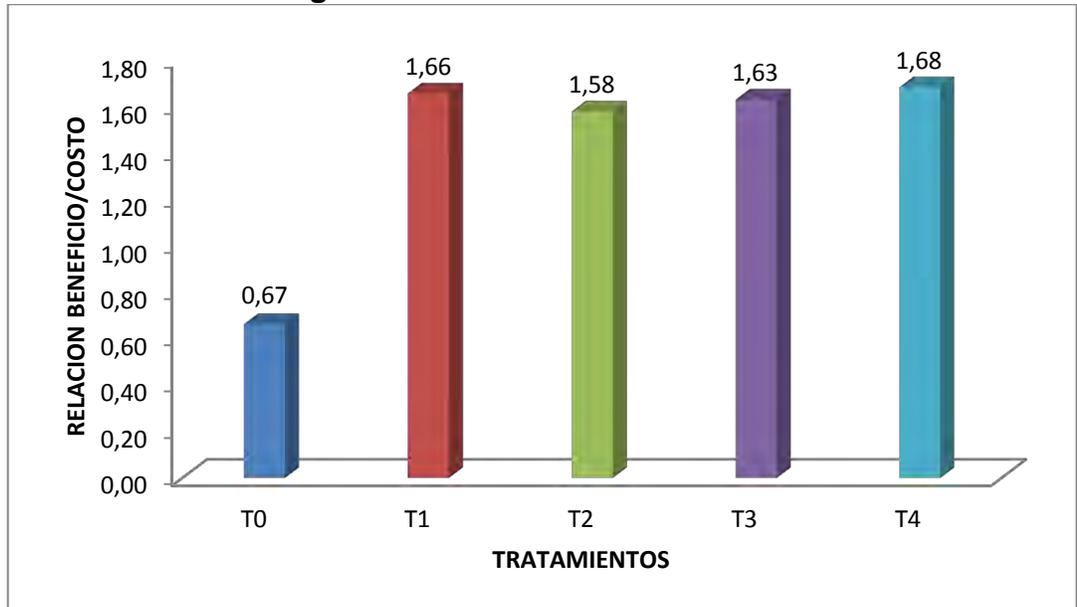
6.3.4 Amonio. Olivera¹¹³ afirma que esta variable, es importante puesto que a niveles mayores a 1mg/l se afecta al crecimiento de los organismos hidrobiológicos, llegando a causar la muerte, por lo tanto se puede afirmar que los resultados obtenidos en la presente investigación con respecto a la concentración de amonio (0.63mg/l) al igual que los demás parámetros fisicoquímicos del agua utilizada en el proceso de larvicultura no afectaron los resultados obtenidos en la presente investigación y que los efectos medidos correspondieron a las variables evaluadas.

6.4 ANALISIS DE COSTOS

En este análisis se consideró los costos por alimento, mano de obra, cantidad de probióticos, compra de larvas, para los diferentes tratamientos y se determinó la relación beneficio costo. La mejor relación en cuanto a beneficio/ costo se registraron en el tratamiento T₄ registró el mejor resultado en cuanto a esta variable, indicando que por unidad monetaria invertida se tienen 1,68 pesos de ingreso además de presentarse una mayor supervivencia reflejada en una mayor rentabilidad en comparación con los demás tratamientos como se indica en la Figura 24, seguido por los tratamientos T₁ y T₃ con una valor de 1.66 y 1.63 respectivamente. Para el tratamiento T₂ se aprecia una relación beneficio costo de 1.58 por lo tanto estos tratamientos son viables económicamente, excepto el tratamiento T₀ que obtuvo un 0.67 lo que muestra que no es viable como se indica en la figura 33.

¹¹³ OLIVERA, A. Curso de Calidad de Aguas y Manejo de Larvicultura de *Litopenaeus vannamei*. Ceniagua. 2006. Colombia. p. 16.

Figura 24. Relación beneficio costo



7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7. 1 CONCLUSIONES

Se logró realizar el aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas de la bacteria *Bacillus* sp considerada como un microorganismo con posible potencial probiótico en la alimentación de larvas de camarón blanco (*L. vannamei*).

Existe viabilidad productiva al incorporar probiótico en el alimento concentrado para mejorar los parámetros de crecimiento y supervivencia de larvas de camarón blanco (*L. vannamei*).

Las mejores tasas de crecimiento simple en larvas de camarón se obtuvieron en el T₄, al adicionar $3,9 \times 10^8$ UFC/g de la bacteria con posible potencial probiótico.

La mejor supervivencia se presentó en el tratamiento T₄ con un 94,67 % siendo este superior al presentado por el T₁ con un 93,56 % (Probiotico comercial) y al tratamiento testigo con 37,11 %, evidenciándose la utilidad del uso de microorganismos autóctonos.

Los parámetros físico-químicos del agua permanecieron dentro de los rangos óptimos de cultivo para el camarón blanco (*L. vannamei*), por cuanto no establecieron un factor influyente para las variables objeto de estudio.

El análisis económico determinó que el tratamiento T₄ obtuvo mayor viabilidad al adicionar $3,9 \times 10^8$ UFC/g generando mayor relación beneficio costo de 1,68, respecto con el tratamiento testigo T₀ con 0,67.

7.2 RECOMENDACIONES

Utilizar probióticos de la misma especie como una alternativa biotecnológica que incremente los parámetros zootécnicos de crecimiento y supervivencia cuyo efecto directo en la relación beneficio costo.

Realizar pruebas moleculares, para evaluar el tiempo de permanencia de los bacilos en el intestino de las larvas de camarón determinar el efecto; además de realizar estudios comparativos en su aplicación en el alimento, columna de agua y sedimento.

Recomendar la incorporación de probióticos autóctonos en los balanceados comerciales en sistemas acuícolas intensivos y súper intensivos de larvas de camarón.

Realizar estudios con probióticos incorporados en el alimento como una herramienta para el control de las principales patologías de origen bacteriano que afectan a los cultivos de camarón sin la necesidad de recurrir al uso de antibióticos.

Se debe hacer periódicamente controles de calidad de probiótico suministrado a los animales con el fin de monitorear posibles contaminantes que influyan en la normal actividad del probiótico.

Teniendo en cuenta que en Colombia la disponibilidad de probióticos para el uso en acuicultura es limitada, se sugiere que nuevos estudios se centren en la búsqueda rigurosa de microorganismos probióticos nativos potenciales que puedan mejorar la supervivencia, fortalecer el sistema inmunológico, incrementar las tasas de crecimiento de los animales hidrobiológicos de importancia acuícola.

8. BIBLIOGRAFIA.

AGUIRRE, Gabriel. Aplicación de probióticos en acuicultura. En: Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Avances en nutrición acuícola I: México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 1992. p. 335.

AZEVEDO R y TAVARES G. Use Of Probiotics in Aquaculture, Disponible en internet URL: <http://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/use-of-probiotics-in-aquaculture>

BALCÁZAR JL, Blas I, Zarzuela-Ruiz I, Cunningham D, Vendrell D, Músquiz JL. The role of Probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology 2006; 114(1) 173-186.

BAILEY, SCOTT. Diagnóstico Microbiológico. Panamericana, Argentina, 2002. P, 1115.

BOYD CE. Aquaculture sustainability and environmental issues. World Aquaculture 1999; 30(2) 10-72

CALDERÓN, J. El Estado Actual de la Acuicultura en Ecuador y Perfiles de Nutrición y Alimentación. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. Ecuador. Disponible en internet: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab487s/AB487S08.htm>

CERVANTES, Armando. Modelo Matemático para el crecimiento del camarón. Universidad Autónoma de México, México: Facultad de Estudios Superiores

CONTARDO, Maria; BUSTAMANTE, Gonzalo y RODRIGUEZ, Jaime. Probioticos en niños con diarrea aguda. [on line]. Chile: Revista Pediátrica Electronica, 2005.p.33. (citado el 13 de mayo del 2006). Disponible en internet: <http://www.revistapediatria.cl/vol1num1/pdf/editorial.pdf>

ESPINAL C, MARTÍNEZ H y GONZÁLEZ F. La Cadena Del Camarón De Cultivo En Colombia Una Mirada Global De Su Estructura Y Dinámica, Bogotá. Disponible en internet URL: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200511215737_caracterizacion_camaron_cultivo.pdf

ESPINAL, Carlos. Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de agricultura y desarrollo rural, Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (IMPA), 2006. p. 2.

FABRICIO, B. Los *Peneidos* en la acuicultura semi-intensiva. México: departamento de investigaciones del litoral, 2000 (citado el 14 de noviembre del 2008). Disponible en internet URL: www.Investigacionesporautorwikipediacuicultura.com

FULLER, R. Problems and prospects. In: Fuller R. (ed.) Probiotics – The scientific basis. London: Chapman and Hall; 1992. p. 377-386.

FURTADO, S. AVILA, O. Diluciones seriadas. Disponible en internet URL:<http://es.wikihow.com/hacer-diluciones-seriadas>.

GUILLIGAN, M. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus Vannamei*. Trabajo de grado. (Magister en Ciencias). Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar.[on line]. Ecuador: CENAIM, 2001. p.3. (citado 25 de Julio de 2014). Disponible en internet: <http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/maestria/2001/guillian.pdf>.

JIN LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal* 1997; 53(4).p. 351-368.

KAILASAPATHY, Kaila. Protecting probiotics by microencapsulation.[on line]. Australia: microbiology Australia, 2003. 47p. (citado el 2 de junio de 2006). Disponible en internet: <http://www.theasm.com.au/links>.

LEE YK, NOMOTO K, SALMINEN S, GORBASH SL. Handbook of Probiotics. New York: Wiley; 1999.

LYONS P. Yeast: out of the black box. *Feed Management* 1986; 37(10) 8-14. http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020148423/1020148423_02.pdf

MACEY BM, COYNE VE. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Halotismida* through Probiotic treatment. *Aquaculture* 2005; 245(1-4) 249-261.

MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J. Brock biología de los microorganismos. Editorial pearsonprentice hall. Madrid. 2006. p.149.

MARTINEZ, Rafael. Canaricultura, bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones *Peneidos*. México: AGT. Editor, 1993, p. 14.

MAKRIDIS P, FJELLHEIM AJ, SKJERMO J, VADSTEIN O. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International* 2000; 8(5).p. 367-380.

MAKRIDIS, Pavlos; MARITINS, Silvia; TSALAVOUTA, Matina; CATALA, Lidia; KOTOULAS, Girgios; MAGOULAS, Antonis and DINIS, Maria. Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. [on line]. Portugal: Blackwell publishing ltd, 2005. P. 1626. (citado el 13 de mayo del 2006). Disponible en internet: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2109.2005.01388.x>

MONROY, Maria; CASTRO, Talia; CASTRO, Jorge; CASTRO, German and LARA, Ramon. Beneficios del uso de los probióticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos acuáticos. [on line].(citado el 12 de febrero del 2012). Disponible en internet: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/revista/85/pdfs/probioticos.pdf>

MORALES, j. *Acuicultura Marina Animal*; edición Mundi-Prensa., Madrid, 1991. .p.155.

PETRIELLA, Ana. Crecimiento en *Peneidos* .Instituto Técnico de estudios superiores. Buenos Aires, Argentina: Departamento de ciencias, 1999.p, 104.

RAMOS, Sebastián. Composición por tallas, edad y crecimiento de *lithopenaeus vanamei*. Oaxaca, México: Instituto Nacional de Pesca. Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP).p.5

TOVAR, D; ZAMBONINO, J; CAHU, C; GATESOUBE, F y VÁZQUEZ- JUARÉZ, R. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. En: Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán. México. 2000, p.34.

URIEL, Francisco. Comparación de la tasa de supervivencia de *Penaeus vannamei* en verano. Mexico: Universidad Autónoma de Mexico. p. 20.

VINE, G; LEUKES, D; KAISER, H; BAXTER, J and HECHT, T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. [On line]. South Africa: Blackwell publishing ltd, 2004. 319-326 pp. (citado 13 de mayo del 2006). Disponible en internet: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x>

VERSCHUERE L, ROMBAUT G, SORGELOOS P, VERSTRAETE W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular*

Biology Review 2000; 64(4).p.655-67. WALE, J. Espectrofotómetro. Disponible en internet URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro>.

WALE, J. Espectrofotómetro. Disponible en internet URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofot%C3%B3metro>.

ZIAEI-NEJAD S, REZAEI M, TAKAMI G, Lovett D, Mirvaghefi A, Shakouri M. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as Probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeusindicus*. Aquaculture 2006; 252(2-4).p. 516-524.

ANEXOS

Anexo A. Protocolo de la tinción de Gram

se hace un Frotis fijado con calor, se tiñe por 1 min con cristal violeta (colorante catiónico) este penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana, después se lavó con agua, se cubrió con solución Yodada o lugol que es un compuesto formado por I_2 (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio) esto se hace durante 1 - 2 min y se lava de nuevo con agua, se decoloró con alcohol, posteriormente se escurrió luego se añadió Safranina (color de contraste) durante 1 – 2 min y por último se lavó y se secó. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos si lo hacen.

Anexo B. Muestreo de talla para cada uno de los tratamientos

	muestreo 1	muestreo 2	muestreo 3	muestreo 4	muestreo 5	muestreo 6
	talla	talla	talla	talla	talla	talla
T0 /R1	0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	0,9
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,3	0,4	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,8	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,6	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,4	0,6	1
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,7	0,9
TOR2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8
	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8
	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,1	0,3	0,2	0,4	0,6	0,8
	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8
TOR3	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,8	1
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,6	1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	0,8
	0,3	0,2	0,4	0,5	0,6	1
	0,2	0,3	0,5	0,5	0,8	0,9
	0,2	0,2	0,4	0,4	0,7	1
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,6	0,8
T1R1	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1

	0,3	0,3	0,4	0,5	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,3	0,4	0,9	1,1
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,4	0,4	0,8	1
	0,1	0,3	0,3	0,5	0,7	1,2
	0,2	0,3	0,3	0,6	0,8	1
	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,7	1
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	1
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	0,8
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	1
	0,1	0,3	0,3	0,4	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	1
	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	0,9
T1R2	0,3	0,2	0,4	0,5	0,7	1
	0,1	0,3	0,4	0,4	0,6	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	1
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,7	1
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	1,2
	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	1
	0,1	0,3	0,5	0,6	0,8	1
T1R3	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1
	0,3	0,3	0,3	0,6	0,7	0,9
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,9	1,1
	0,2	0,3	0,3	0,4	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,7	0,8	1,2
T2R1	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1

	0,2	0,4	0,4	0,6	0,8	1
	0,3	0,3	0,5	0,6	0,9	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9	1
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,2
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1
	0,3	0,4	0,4	0,6	0,8	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,7	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
	0,3	0,3	0,5	0,7	0,8	1,2
	0,2	0,4	0,5	0,6	0,9	1
	0,3	0,3	0,4	0,7	0,9	1
	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,7	0,9	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,5	0,6	0,9	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9
	0,3	0,4	0,5	0,5	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,7	0,8	1,1
	0,2	0,4	0,4	0,6	0,8	1
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,9	1
	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	1,1

	0,2	0,2	0,4	0,5	0,8	0,9
	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,3	0,5	0,5	0,9	1,1
	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,4	0,4	0,6	0,8	1
T3R2	0,3	0,2	0,4	0,5	0,9	1,2
	0,2	0,3	0,3	0,6	0,9	1,1
	0,2	0,2	0,4	0,7	0,8	1
	0,3	0,3	0,3	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1,1
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9	1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,2
	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	1
T3R3	0,2	0,3	0,5	0,6	0,9	1,2
	0,2	0,2	0,5	0,6	0,8	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,8	1,2
	0,2	0,3	0,4	0,6	0,9	1,2
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,3	0,6	0,7	1,1
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,8	0,9
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	1
T4R1	0,2	0,2	0,3	0,6	0,9	1
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,7	1
	0,1	0,2	0,4	0,5	0,8	1
	0,2	0,2	0,5	0,5	0,7	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	1
T4R2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	1

	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1
	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	1
	0,1	0,2	0,3	0,6	0,7	0,9
	0,3	0,2	0,4	0,5	0,8	1
	0,2	0,3	0,3	0,5	0,6	0,9
	0,2	0,2	0,4	0,6	0,7	1
	0,2	0,2	0,4	0,5	0,8	1
	0,2	0,2	0,3	0,6	0,7	1
	0,1	0,3	0,4	0,5	0,9	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,7	0,7	1
	0,3	0,3	0,5	0,6	0,8	1,2
T4R3	0,2	0,2	0,4	0,5	0,7	0,9
	0,1	0,3	0,3	0,6	0,7	1
	0,2	0,3	0,4	0,4	0,8	1
	0,3	0,2	0,3	0,6	0,7	1,1
	0,2	0,3	0,4	0,5	0,9	1

Anexo C. Incremento de talla promedio por tratamiento

TOR1	TCS		0,00363236	0,00467323	0,00495382	0,00427062	0,00404655
	Media	0,21	0,25	0,35	0,5	0,68	0,91
	Desviación S	0,03162278	0,05270463	0,05270463	0,08164966	0,06324555	0,03162278
	Error S	0,01	0,01666667	0,01666667	0,02581989	0,02	0,01
	CV	4,76190476	6,66666667	4,76190476	5,16397779	2,94117647	1,0989011
TOR2	TCS		0,00379837	0,00442297	0,00491167	0,00406927	0,00415995
	Media	0,2	0,24	0,33	0,47	0,63	0,85
	Desviación S	0,04714045	0,05163978	0,06749486	0,04830459	0,04830459	0,05270463
	Error S	0,01490712	0,01632993	0,02134375	0,01527525	0,01527525	0,01666667
	CV	7,45355992	6,80413817	6,46780226	3,25005368	2,42464322	1,96078431
TOR3	TCS		0,00426655	0,00474652	0,00408666	0,00419835	0,00399558
	Media	0,22	0,27	0,38	0,51	0,69	0,92
	Desviación S	0,0421637	0,04830459	0,06324555	0,05676462	0,07378648	0,07888106
	Error S	0,01333333	0,01527525	0,02	0,01795055	0,02333333	0,02494438
	CV	6,06060606	5,65750086	5,26315789	3,51971556	3,38164251	2,71134593
T1R1	TCS		0,00464882	0,00506449	0,00510729	0,00508673	0,00440612
	Media	0,2	0,25	0,36	0,52	0,75	1,03
	Desviación S	0,06666667	0,05270463	0,05163978	0,07888106	0,07071068	0,08232726
	Error S	0,02108185	0,01666667	0,01632993	0,02494438	0,02236068	0,02603417
	CV	10,5409255	6,66666667	4,53609212	4,79699665	2,98142397	2,52758889
T1R2	TCS		0,00464882	0,00467323	0,00438685	0,00483759	0,00449704
	Media	0,2	0,25	0,35	0,48	0,68	0,94
	Desviación S	0,06666667	0,05270463	0,05270463	0,06324555	0,0421637	0,06992059
	Error S	0,02108185	0,01666667	0,01666667	0,02	0,01333333	0,02211083
	CV	10,5409255	6,66666667	4,76190476	4,16666667	1,96078431	2,35221616
T1R3	TCS		0,00444946	0,0049003	0,00472675	0,00471133	0,00450918

	Media	0,21	0,26	0,37	0,52	0,73	1,01
	Desviación S	0,05676462	0,05163978	0,06749486	0,06324555	0,08232726	0,0875595
	Error S	0,01795055	0,01632993	0,02134375	0,02	0,02603417	0,02768875
	CV	8,54788065	6,28074293	5,76858039	3,84615385	3,56632405	2,74146002
	TCS		0,00533195	0,00454462	0,00485658	0,00410896	0,00408002
T2R1	Media	0,24	0,31	0,43	0,61	0,82	1,1
	Desviación S	0,05163978	0,03162278	0,04830459	0,03162278	0,0421637	0,08164966
	Error S	0,01632993	0,01	0,01527525	0,01	0,01333333	0,02581989
	CV	6,80413817	3,22580645	3,55238426	1,63934426	1,62601626	2,34726263
	TCS		0,00432582	0,00442297	0,00407428	0,00405431	0,00447083
T2R2	Media	0,26	0,32	0,44	0,59	0,79	1,09
	Desviación S	0,05163978	0,0421637	0,05163978	0,03162278	0,03162278	0,09944289
	Error S	0,01632993	0,01333333	0,01632993	0,01	0,01	0,0314466
	CV	6,28074293	4,16666667	3,7113481	1,69491525	1,26582278	2,88500952
	TCS		0,00533195	0,00517605	0,00467323	0,00415995	0,00358096
T2R3	Media	0,24	0,31	0,45	0,63	0,85	1,1
	Desviación S	0,05163978	0,03162278	0,05270463	0,04830459	0,05270463	0,0942809
	Error S	0,01632993	0,01	0,01666667	0,01527525	0,01666667	0,02981424
	CV	6,80413817	3,22580645	3,7037037	2,42464322	1,96078431	2,71038543
	TCS		0,00464882	0,00467323	0,00448296	0,0041148	0,00399558
T3R1	Media	0,24	0,3	0,42	0,58	0,78	1,04
	Desviación S	0,05163978	0,08164966	0,0421637	0,06324555	0,06324555	0,09660918
	Error S	0,01632993	0,02581989	0,01333333	0,02	0,02	0,0305505
	CV	6,80413817	8,60662966	3,17460317	3,44827586	2,56410256	2,93754852
	TCS		0,00502421	0,00529677	0,00528851	0,00450689	0,00416192
T3R2	Media	0,22	0,28	0,41	0,6	0,83	1,12
	Desviación S	0,0421637	0,06324555	0,07378648	0,06666667	0,06749486	0,07888106
	Error S	0,01333333	0,02	0,02333333	0,02108185	0,02134375	0,02494438
	CV	6,06060606	7,14285714	5,69105691	3,51364184	2,57153584	2,22717702

	TCS		0,00502421	0,00529677	0,00481765	0,00497774	0,00428538
	Media	0,22	0,28	0,41	0,58	0,83	1,13
T3R3	Desviación S	0,0421637	0,0421637	0,05676462	0,0421637	0,04830459	0,08232726
	Error S	0,01333333	0,01333333	0,01795055	0,01333333	0,01527525	0,02603417
	CV	6,06060606	4,76190476	4,37818277	2,29885057	1,84039185	2,30390846
	TCS		0,00464882	0,00544503	0,00525092	0,00437613	0,00404243
	Media	0,2	0,25	0,37	0,54	0,74	0,99
T4R1	Desviación S	0,04714045	0,05270463	0,06749486	0,05163978	0,06992059	0,07378648
	Error S	0,01490712	0,01666667	0,02134375	0,01632993	0,02211083	0,02333333
	CV	7,45355992	6,66666667	5,76858039	3,02406141	2,98795026	2,35690236
	TCS		0,00464882	0,00506449	0,00510729	0,0043255	0,00418984
	Media	0,2	0,25	0,36	0,52	0,71	0,96
T4R2	Desviación S	0,06666667	0,05270463	0,05163978	0,0421637	0,05676462	0,05163978
	Error S	0,02108185	0,01666667	0,01632993	0,01333333	0,01795055	0,01632993
	CV	10,5409255	6,66666667	4,53609212	2,56410256	2,52824639	1,70103454
	TCS		0,00546592	0,00527069	0,00513538	0,00467323	0,00404061
	Media	0,2	0,26	0,38	0,55	0,77	1,03
T4R3	Desviación S	0,06666667	0,05163978	0,06324555	0,08498366	0,08232726	0,08232726
	Error S	0,02108185	0,01632993	0,02	0,02687419	0,02603417	0,02603417
	CV	10,5409255	6,28074293	5,26315789	4,88621682	3,38106047	2,52758889

Anexo D Análisis de Varianza para TCS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,0000155252	74	2,098E-7		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	0,0000155252	74			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
tratamiento	0,00000256036	4	6,40091E-7	4,36	0,0268
replica (tratamiento)	0,00000146647	10	1,46647E-7		
muestreo (tratamiento replica)	0,0000114984	60	1,9164E-7	1,31	
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	0,0000155252	74			

Comparaciones Múltiples para TCS por tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	15	0,00428216	0,0000988761	X
2	15	0,0044795	0,0000988761	XX
3	15	0,00470636	0,0000988761	XX
1	15	0,00471027	0,0000988761	XX
4	15	0,00477901	0,0000988761	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Límites +/-</i>
0 - 1		-0,000428103	0,000460238

0 – 2		-0,000197334	0,000460238
0 – 3		-0,0004242	0,000460238
0 – 4	*	-0,000496842	0,000460238
1 – 2		0,000230769	0,000460238
1 – 3		0,00000390293	0,000460238
1 – 4		-0,0000687389	0,000460238
2 – 3		-0,000226866	0,000460238
2 – 4		-0,000299508	0,000460238
3 – 4		-0,0000726418	0,000460238

Anexo E. Supervivencia Prueba de Brand-Snedecor

TRATAMIENTOS						
Respuesta	T0	T1	T2	T3	T4	Total
Éxito	334,00	842,00	795,00	823,00	852,00	3.646,00
Fracaso	566,00	58,00	105,00	77,00	48,00	854,00
Total	900,00	900,00	900,00	900,00	900,00	4.500,00
Pi	0,371	0,936	0,883	0,914	0,947	0,810
Pi*a_i	123,951	787,738	702,250	752,588	806,560	2.954,070

n =	5
n - 1 =	4
Alfa =	0,05
1 - alfa =	0,95
p =	0,810
q = (1 - p)	0,190

$$\chi^2_c = \frac{|\sum a_i \cdot p_i| - [p \cdot \sum a_i]}{pq}$$

$$\chi^2_c = \frac{2.954,070}{0,190} = 1424,384$$

$$\chi^2_{t(1-\alpha)} = 12,59$$

Decisión= Existen diferencias estadísticas significativa

Anexo F. Parámetros físico químicos

	T0	T1	T2	T3	T4	PROMEDIO	MINIMO	MAXIMO
TEMPERATURA (°C)	34,84	34,84	34,84	34,85	34,85	34,84	34,84	34,85
AMONIO(mg/L)	0,66	0,62	0,62	0,65	0,63	0,63	0,62	0,66
SALIDAD(ppM)	29,26	29,33	29,26	29,31	29,36	29,30	29,26	29,36
OXIGENO DISUELTO (mg/L)	4,44	4,37	4,38	4,36	4,39	4,39	4,36	4,44

Anexo G. Datos promediados de temperatura de los tratamientos

TEMPERATURA															
DIA	TOR1	TOR2	TOR3	T1R1	T1R2	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R1	T3R2	T3R3	T4R1	T4R2	T4R3
1	34,77	34,77	34,77	34,77	34,83	34,80	34,87	34,83	34,93	34,80	34,70	34,97	34,77	34,67	34,63
2	34,97	34,83	34,87	34,97	34,77	34,70	34,77	34,74	34,80	34,93	34,83	34,97	34,83	34,80	34,83
3	34,77	34,80	34,63	34,90	34,93	34,83	34,80	34,86	34,80	34,80	34,77	34,80	35,00	34,77	34,83
4	34,77	34,70	34,77	34,83	34,90	34,97	34,93	34,93	34,87	34,83	34,93	34,83	34,97	34,80	34,90
5	34,93	34,97	34,87	35,00	34,83	34,80	34,80	34,81	34,77	34,90	34,93	34,77	34,80	34,90	34,80
6	34,87	34,80	34,60	34,87	34,90	34,87	34,87	34,88	34,83	34,93	34,97	34,67	34,80	34,80	34,93
7	34,93	34,93	34,97	34,90	34,83	34,77	34,70	34,77	34,83	34,80	34,93	34,83	35,00	34,73	34,73
8	34,93	34,83	34,83	34,93	34,87	34,83	34,90	34,87	34,90	34,90	34,77	34,87	34,93	35,00	34,87
9	35,00	34,90	34,93	34,90	34,87	34,70	35,00	34,86	34,87	34,87	34,77	34,93	34,83	34,80	34,83
10	34,63	34,93	34,80	34,70	34,83	34,80	34,87	34,83	34,80	34,93	34,73	34,80	34,90	34,87	34,97
11	34,90	34,80	34,93	34,83	34,73	34,77	34,83	34,78	34,83	34,70	34,90	34,73	34,90	34,83	34,83
12	34,73	34,73	34,93	34,87	34,73	34,83	34,87	34,81	34,83	34,87	34,93	34,83	34,97	34,87	34,83
13	34,90	34,80	34,83	34,97	34,97	34,80	34,90	34,89	34,83	34,90	34,77	34,87	34,87	34,83	34,83

Anexo H. Análisis de varianza para temperatura 6am. 12M y 5pm

Análisis de Varianza para Temperatura 6 AM

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5,47512	194	0,0282223		
Residuo	0,0	10	0,0		
Total (Corr.)	5,47512	204			

Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento	0,127839	4	0,0319597	1,68	0,2304
replica (tratamiento)	0,190256	10	0,0190256		
dia (tratamiento replica)	5,15692	180	0,0286496	1,51	0,2433
Residuo	0,0	10	0,0		
Total (corregido)	5,47512	204			

Comparaciones Múltiples para Temperatura 6 AM por tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

Tratamiento	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
3	39	34,3615	0,022087	X
1	39	34,3692	0,022087	X
0	49	34,4	0,0206227	X
4	39	34,4179	0,022087	X
2	39	34,4256	0,022087	X

Análisis de Varianza para temperatura 12M

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4,62995	194	0,0238657		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	4,62995	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0,105333	4	0,0263333	0,52	0,7211
replica (Tratamiento)	0,503077	10	0,0503077		
días (Tratamiento replica)	4,02154	180	0,0223419	0,44	0,9832
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	4,62995	194			

Comparaciones Múltiples para temperatura 12M por Tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	39	35,3667	0,0359157	X
2	39	35,3795	0,0359157	X
4	39	35,4103	0,0359157	X
3	39	35,4231	0,0359157	X
1	39	35,4231	0,0359157	X

Análisis de Varianza para Temperatura 5 PM

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	2,42287	194	0,012489		
Residuo	1,45565E-10	0			
Total (Corr.)	2,42287	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0,0321026	4	0,00802564	0,62	0,6579
replica (Tratamiento)	0,129231	10	0,0129231		
días (Tratamiento replica)	2,26154	180	0,0125641	0,97	0,5788
Residuo	1,45565E-10	0			
Total (corregido)	2,42287	194			

Comparaciones Múltiples para Temperatura 5 PM por Tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	39	34,7154	0,0182033	X
2	39	34,7256	0,0182033	X
1	39	34,7385	0,0182033	X
0	39	34,7436	0,0182033	X
3	39	34,7513	0,0182033	X

Anexo I. Datos Oxígeno Disuelto durante el proyecto

OXIGENO mg/L															
DIA	TOR1	TOR2	TOR3	T1R1	T1R2	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R1	T3R2	T3R3	T4R1	T4R2	T4R3
1	4,80	5,20	4,45	4,80	4,55	4,55	5,25	4,10	4,10	4,10	5,05	5,05	5,00	4,20	4,20
2	4,40	4,75	4,35	4,55	4,80	5,10	5,15	4,35	4,40	4,65	4,35	4,50	4,55	4,65	4,35
3	4,40	4,30	4,45	4,15	4,40	4,40	4,35	4,80	4,40	4,95	4,65	4,25	4,65	4,20	4,00
4	4,25	4,40	4,45	4,15	4,30	4,40	5,10	4,70	4,30	4,75	4,45	4,20	4,45	4,35	4,35
5	4,35	4,40	4,25	4,15	4,10	4,25	4,15	4,35	4,15	4,05	4,05	4,35	4,25	4,15	4,25
6	4,25	4,55	4,45	4,55	4,15	4,15	4,20	4,05	4,45	4,15	4,20	4,25	4,50	4,15	4,55
7	5,10	4,35	4,25	4,25	4,30	4,25	4,15	4,10	4,25	4,25	4,15	4,35	4,30	4,35	5,05
8	4,60	4,55	4,30	4,25	4,30	4,35	4,35	4,10	4,55	4,55	4,20	4,55	4,30	4,35	4,65
9	4,30	4,65	4,25	4,35	4,25	4,10	4,35	4,05	4,30	4,50	4,05	4,15	4,05	4,35	4,15
10	4,60	4,25	4,35	4,55	4,50	4,35	4,55	4,35	4,25	4,25	4,25	4,15	4,55	4,50	4,35
11	4,40	4,35	4,25	4,60	4,40	4,25	4,50	4,15	4,15	4,25	4,50	4,20	4,25	4,25	4,35
12	4,35	4,15	4,45	4,45	4,25	4,35	4,75	4,20	4,35	4,15	4,15	4,30	4,20	4,15	4,25
13	4,55	4,25	4,50	4,45	4,10	4,25	4,40	4,45	4,25	4,25	4,25	4,55	4,40	4,55	5,00

Anexo J. Análisis de varianza para Oxígeno Disuelto 6am y 5pm

Análisis de Varianza para Oxigeno 6 AM

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	13,5229	194	0,0697055		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	13,5229	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0,141846	4	0,0354615	0,30	0,8705
replica(tratamiento)	1,17641	10	0,117641		
dia (tratamiento replica)	12,2046	180	0,0678034	0,58	0,9240
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	13,5229	194			

Comparaciones Múltiples para Oxigeno 6 AM por tratamiento

Método: 95,0 porciento HSD de Tukey

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	39	4,32821	0,0549221	X
3	39	4,35128	0,0549221	X
2	39	4,3641	0,0549221	X
4	39	4,37179	0,0549221	X
0	39	4,41026	0,0549221	X

Análisis de Varianza para Oxigeno 5 PM

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	11,1838	194	0,0576484		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	11,1838	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0,181231	4	0,0453077	0,80	0,5526
replica (tratamiento)	0,567179	10	0,0567179		
dia (tratamiento replica)	10,4354	180	0,0579744	1,02	0,5361
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	11,1838	194			

Comparaciones Múltiples para Oxígeno 5 PM por tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	39	4,35128	0,0381354	X
2	39	4,37692	0,0381354	X
1	39	4,4	0,0381354	X
4	39	4,4	0,0381354	X
0	39	4,44359	0,0381354	X

Anexo K. Datos Salinidad durante el proyecto

SALINIDAD ppm															
DIA	T0R1	T0R2	T0R3	T1R1	T1R2	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R1	T3R2	T3R3	T4R1	T4R2	T4R3
1	30	29	29	30	30	28	28	30	30	28	30	30	30	28	28
2	29	30	29	30	29	28	30	30	29	30	28	30	30	30	29
3	30	28	30	30	30	30	29	30	29	30	28	29	30	30	29
4	30	28	29	30	29	29	30	30	30	30	28	29	30	29	29
5	30	28	28	29	28	30	29	30	28	29	30	29	30	30	30
6	30	29	28	29	28	30	28	29	29	29	30	30	29	29	30
7	28	30	28	28	30	30	28	29	30	30	30	29	29	28	30
8	29	30	30	29	30	29	30	30	30	30	30	30	30	28	28
9	30	28	30	30	30	30	30	28	29	30	29	29	29	29	29
10	30	30	30	28	30	29	29	30	30	30	28	30	30	30	28
11	30	29	29	30	29	29	30	28	29	30	28	29	30	30	29
12	29	30	29	29	29	30	29	30	28	29	28	30	28	30	30
13	29	30	29	29	29	30	28	28	30	29	30	28	30	30	30

Anexo L. Análisis de Varianza para Salinidad
Análisis de Varianza para salinidad

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	117,538	194	0,605868		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	117,538	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamiento	0,25641	4	0,0641026	0,16	0,9547
replica(tratamiento)	4,05128	10	0,405128		
días (tratamiento x replica)	113,231	180	0,62906	1,55	0,2254
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	117,538	194			

Comparaciones Múltiples para salinidad por tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>Tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	39	29,2564	0,101921	X
0	39	29,2821	0,101921	X
3	39	29,3077	0,101921	X
1	39	29,3333	0,101921	X
4	39	29,359	0,101921	X

Anexo M. Amonio durante el proyecto

AMONIO (mg/L)															
DIA	TOR1	TOR2	TOR3	T1R1	T1R2	T1R3	T2R1	T2R2	T2R3	T3R1	T3R2	T3R3	T4R1	T4R2	T4R3
1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5
2	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	1	0,5	0,5	0,25	0,5
3	1	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25
4	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1	1	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,5	0,25
5	0,25	1	0,25	0,5	1	1	0,25	1	1	0,25	1	0,25	0,25	1	1
6	1	2	1	1	0,25	0,25	0,5	1	1	0,5	0,25	1	1	2	1
7	0,25	0,5	2	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25	1	0,25	1	1	0,5	2
8	2	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	1	1	0,25	1	2	0,5	0,5
9	1	0,25	0,25	1	2	0,5	2	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5
10	0,25	1	0,5	2	0,5	1	0,25	0,5	0,5	0,5	1	1	0,5	2	0,25
11	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	1	1	0,25	0,5	0,25
12	1	1	1	0,5	0,25	2	0,5	0,25	0,5	0,25	2	2	0,25	0,25	0,5
13	0,5	0,5	1	1	0,25	0,25	1	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	1

Anexo N. Análisis de varianza para Amonio.

Análisis de Varianza para amonio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	43,1538	194	0,222443		
Residuo	0,0	0			
Total (Corr.)	43,1538	194			

Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
tratamiento	0,0544872	4	0,0136218	0,11	0,9774
replica (tratamiento)	1,27244	10	0,127244		
dia (tratamiento replica)	41,8269	180	0,232372	1,83	0,1456
Residuo	0,0	0			
Total (corregido)	43,1538	194			

Comparaciones Múltiples para amonio por tratamiento

Método: 95,0 por ciento HSD de Tukey

<i>tratamiento</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media MC</i>	<i>Sigma MC</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	39	0,615385	0,0571197	X
1	39	0,621795	0,0571197	X
4	39	0,628205	0,0571197	X
3	39	0,647436	0,0571197	X
0	39	0,660256	0,0571197	X