

**EVALUACION DEL EFECTO DEL  $\beta$ - GLUCAN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN CAMARONES *Litopenaeus vannamei* AFECTADOS POR EL SINDROME VIRAL DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO EN LA ENSENADA DE TUMACO**

**ALBA MARIELA TRIVIÑO VARGAS**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA EN PRODUCCIÓN ACUICOLA  
PASTO- COLOMBIA  
2001**

**EVALUACION DEL EFECTO DEL B-GLUCAN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN CAMARONES *Litopenaeus vannamei* AFECTADOS POR EL SINDROME VIRAL DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO EN LA ENSENADA DE TUMACO**

**ALBA MARIELA TRIVIÑO VARGAS**

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniera en Producción Acuícola**

**Presidente  
JAIRO FERNANDO OLIVA BURBANO  
Zootecnista  
Especialista Docencia Universitaria  
Ecología Énfasis Educación Ambiental**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA EN P  
RODUCCION ACUICOLA  
PASTO – COLOMBIA  
2001**

## NOTA DE ACEPTACION

---

Dr. BAYRON MOJANNA INSUASTY

Jurado Delegado

---

Dra. SANDRA CABRERA MEZA

Jurado

---

JAIRO FERNANDO OLIVA BURBANO

Presidente

San Juan de Pasto, Agosto 21 del 2001

## TABLA DE CONTENIDO

		<b>Pág.</b>
	INTRODUCCIÓN	1
1.	DEFINICIÓN Y DELIMITACION DEL PROBLEMA	4
2.	FORMULACION DEL PROBLEMA	7
3.	OBJETIVOS	8
3.1.	OBJETIVO GENERAL	8
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4.	MARCO TEORICO	10
4.1.	ENFERMEDADES INFECCIOSAS	10
4.1.1.	Resistencia de los predadores	11
4.1.2.	Modo de transmisión de la infección	18
4.2.	GENERALIDADES DE LOS VIRUS	19
4.2.1	Material genético	20
4.2.2.	Elementos constitutivos de un virión	20
4.2.3.	Propiedades generales de los virus	23
4.2.4.	Estudio de los virus	23
4.3.	EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)	23
4.3.1.	Estructura, tipo y biología	23
4.4	BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)	25
4.4.1	Distribución geográfica y hospedadores afectados	25
4.4.2	Signos clínicos	27
4.4.3	Cambios histológicos	30
4.4.4	Prevención y transmisión de la enfermedad	30
4.4.5	Factores que proporcionan la enfermedad	32
4.4.6	Estabilidad vírica	33
4.4.7	Control de la enfermedad	33
4.5	INCIDENCIA DEL WSSV SOBRE LA PRODUCCIÓN DE <i>PENAEUS</i>	35
4.6	MANEJO UTILIZADO PARA CONTRARRESTAR LOS EFECTOS DEL WSSV	38
4.7	$\beta$ -GLUCÁN DE LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	40
4.7.1	Breve reseña histórica de su descubrimiento	40
4.7.2	Generalidades y composición química del $\beta$ -glucán	41
4.7.3	Efectos del $\beta$ -glucán	43
4.7.4	Vías de administración y dosis utilizadas	46

5	DISEÑO METODOLOGICO	47
5.1	LOCALIZACIÓN	47
5.2	INSTALACIONES, EQUIPOS Y UTENSILIOS	49
5.3	MATERIAL BIOLÓGICO	53
5.4	TRATAMIENTOS	54
5.5	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
5.6	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	60
5.7	ALIMENTO Y ALIMENTACIÓN	60
5.8	PLAN DE MANEJO	63
5.9	TÉCNICAS DE LABORATORIO Y DE CAMPO	66
5.9.1	Metodología de infección a través de solución vírica	66
5.9.2	Metodología de la técnica histológica y microscopía	66
5.9.3	Metodología del P.C.R.	69
5.9.4	Metodología del hemograma	71
5.10	VARIABLES EVALUADAS	71
5.10.1	Sobrevivencia	71
5.10.2	Incremento de longitud	72
5.10.3	Incremento de peso y peso final	72
5.10.4	Conversión alimenticia	72
5.10.5	Hemograma	72
5.10.6	Histopatología	72
5.11	ANÁLISIS PARCIAL DE COSTOS	73
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
6.1	SOBREVIVENCIA	74
6.1.1	Sobrevivencia hasta las doce semanas de cultivo (pre-infección)	74
6.1.2	Sobrevivencia post-infección – semana 12 a 15 de cultivo	83
6.1.3	Resultados histopatológicos, prueba P.C.R. y hemograma	90
6.2	COMPARACIÓN DE LOS INCREMENTOS DE PESO	93
6.3	INCREMENTO EN LA LONGITUD	98
6.4	CONVERSIÓN ALIMENTICIA	98
6.5	ANÁLISIS PARCIAL DE COSTOS Y RENTABILIDAD	103
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	108
7.1	CONCLUSIONES	108
7.2	RECOMENDACIONES	110
8.	RESUMEN	112
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	<b>Pag.</b> 115
	ANEXOS	121

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Esquema de la cascada PO (fenoloxidas)	14

Figura 2.	Microfotografía del virus de la Mancha Blanca - (WSSV)	26
Figura 3.	Lesiones macroscópicas típicas de la patología del WSSV, encontrados en camarones cultivados en Tailandia	29
Figura 4.	Lesiones histológicas causadas por WSSV	31
Figura 5.	Localización geográfica San Andrés de Tumaco	48
Figura 6.	Hatchery Universidad de Nariño – San Andrés de Tumaco	50
Figura 7.	Instalaciones internas hatchery – tanques de cultivo	51
Figura 8.	Análisis polimerización reacción en cadena - P.C.R	70
Figura 9.	Sobrevivencia pre-infección de camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> , alimentados con tres niveles de $\beta$ -glucan como inmuno-estimulante	75
Figura 10.	Parámetros físico-químicos promedio de las variables: oxígeno disuelto, pH y salinidad, durante el cultivo de camarones alimentados con $\beta$ -glucan	79
Figura 11.	Sobrevivencia comparativa entre los tratamientos experimentales post-infección con WSSV	84
Figura 12.	Porcentaje de sobrevivencia de camarones marinos <i>Penaeus</i> a los 17 días post-infección con WSSV.	86
Figura 13.	Camarones muertos por virus de la Mancha Blanca	87
Figura 14.	Inclusiones de cuerpos intranucleares causadas por WSSV	91
Figura 15.	Curva de incremento de peso semanal en camarones alimentados con tres dosis de $\beta$ -glucán vs un testigo	95
Figura 16.	Curva de incremento semanal de longitud en camarones con tres dosis de $\beta$ -glucán en la dieta vs un testigo	99
Figura 17.	Conversión alimenticia pre-infección con WSSV, en camarones alimentados con $\beta$ -glucán vs un testigo	101

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1	Composición química del $\beta$ -glucan	<b>Pág.</b> 42
Tabla 2	Formulación del tratamiento T0	55

Tabla 3	Formulación del tratamiento T1	56
Tabla 4	Formulación del tratamiento T2	57
Tabla 5	Formulación del tratamiento T3	58
Tabla 6	Nivel de alimentación diario para camarones ( <i>Penaeus vannamei</i> ) según el peso de los ejemplares	62
Tabla 7	Tamaño del pellet recomendado para la alimentación de camarones ( <i>Penaeus vannamei</i> ) según el peso de los ejemplares	64
Tabla 8	Valores de los parámetros físico-químicos del agua del estero Palmichal para el cultivo de camarones ( <i>Litopenaeus</i> ) alimentados con $\beta$ -glucan	78
Tabla 9	Producción y rentabilidad de los tratamientos experimentales durante el engorde de camarón	105
Tabla 10	Porcentaje de recuperación de la inversión de los tratamientos experimentales post-infección	107

## LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo A	Resultado diagnóstico negativo del virus WSSv mediante prueba P.C.R. en camarones de cultivo	122
Anexo B	Análisis de varianza para sobrevivencia a las 12 semanas de	

	cultivo	123
Anexo C	Constancia post-larva estadio PL16	124
Anexo D	Diagnóstico del análisis histopatológico de camarones infectados por WSSV	125
Anexo E	Resultado diagnóstico positivo del virus WSSV mediante prueba P.C.R. en camarones de cultivo	126
Anexo F	Análisis hemograma	127
Anexo G	Análisis de varianza para incremento de peso	128
Anexo H	Análisis de varianza para peso final	129
Anexo I	Análisis de varianza para longitud – talla final	130
Anexo J	Costos directos de producción y rentabilidad por kilogramo de camarón producido, alimentado con diferentes dosis de $\beta$ -glucan	131
Anexo K	Rubros y costos directos de producción del engorde de camarones alimentados con diferentes dosis de $\beta$ -glucan	132
Anexo L	Análisis bromatológico de la dieta	133
Anexo M	Análisis de varianza para conversión alimenticia	134
Anexo N	Constancia papilla infectiva	135
Anexo Ñ	Prueba de X2 para la variable sobrevivencia post infección	136

“ Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son responsabilidad exclusiva de su autora”.

Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**DEDICO A :**

Dios porque sin su ayuda nada hubiese sido posible

Mi madre Albita, Q.D.P. por haberme transmitido la pasión y el tesón para afrontar todos los inconvenientes para alcanzar esta meta,

Mi padre,

Mi hija Jill Stephanie y a mi esposo, por todo el tiempo que les robe,

Mis hermanos,

Mis profesores, compañeros y amigos

Alba Mariela Triviño Vargas

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos a:

DONALD ARCHBOLD BUSH, Ingeniero ECOPETROL

JAIRO FERNANDO OLIVA B, Zoot. Esp. Docencia Univ. y Ecología.

LUIS A. SOLARTE, Secretario Académico Facultad de Ciencias Pecuarias

BYRON MOJANNA INSUASTY, Medico Veterinario Zootecnista.

SANDRA JANETH CABRERA MEZA, Zootecnista.

FRANCISCO VARGAS ALBORES, Inmunólogo México.

JORGE NELSON LOPEZ MACIAS, Zootecnista.  
JULIAN SABOGAL, Director Investigaciones Universidad de Nariño.  
JAIME GUTIERREZ, Gerente IDELPACIFICO C.I.  
ROCIO CASTRO, Jefe de Producción IDELPACIFICO . C.I.  
LUIS ALBERTO GORDILLO. Químico LEVAPAN S.A.  
RAMIRO QUIÑÓNEZ. Ingeniero en Producción Acuícola.  
CRISTIAN MENESES, Biólogo Marino . CRIPROMAR  
BORIS BRIÑEZ, Investigador Biología Molecular CENIACUA.  
JAIME RIVAS ORTIZ, Bacteriólogo.  
GLORIA SANDRA ESPINOSA NARVÁEZ, Ingeniera en Producción Acuícola.  
VICTOR MANUEL MEJIA M. Director Universidad de Nariño Tumaco  
JOSE MELENA, Microbiologo Laboratorio CENAIM ESPOL  
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA  
LORENA SCHWARZ. Microbióloga Laboratorio CENAIM ESPOL  
MIS COMPAÑEROS , AMIGOS Y COLABORADORES.

## RESUMEN

La producción de camarones *Litopenaeus* soporta grandes pérdidas económicas causadas por la patología del Síndrome Viral de la Mancha Blanca (WSSV). Este trabajo evaluó el efecto del  $\beta$ -glucán en camarones infectados con WSSV. Este producto se ha caracterizado por su actividad inmunoestimulante. El estudio se desarrolló en el hatchery de la Estación Experimental de Cultivos Marinos de la Universidad de Nariño, localizada en San Andrés de Tumaco. Se evaluaron cuatro tratamientos experimentales, tres de ellos con diferentes niveles de  $\beta$ -glucán en la formulación de la dieta: 120, 150 y 180 g / 100 Kg de alimento, al testigo no se le incluyó  $\beta$ -glucán. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, con 120 animales por cada unidad experimental de acuerdo a un diseño irrestrictamente al azar. Las postlarvas de *Penaeus vannamei* en estado PL 16 se cultivaron a lo largo de tres meses con una dieta isoenergética e isoprotéica (35% de proteína). En la semana doce de cultivo, los camarones se infectaron con WSSV, usando una papilla elaborada con camarones afectados con el virus, la papilla se hizo en los laboratorios de Ceniagua. Los resultados obtenidos validan la posibilidad de realizar investigaciones específicas y puntuales para determinar si las variables evaluadas como son sobrevivencia, incremento de peso, incremento de longitud y conversión alimenticia, son realmente afectados positivamente por la adición de  $\beta$ -glucán a la dieta.

## ABSTRACT

The *Litopenaeus* shrimp's production supports great economic losses caused by the pathology of the White Spot Syndrome Viral (WSSV). This research evaluated the effect of the  $\beta$ -glucan in shrimps infected with WSSV. This product has been characterized by its immuno-stimulant activity. The study was carried out in the hatchery of the Estación Experimental de Cultivos Marinos de la Universidad de Nariño, located in San Andrés de Tumaco city. Four experimental treatments were evaluated, three of them with different levels of  $\beta$ -glucan in the formulation of the diet: 120, 150 and 180 g / 100 Kg of diet, to the control treatment was not included  $\beta$ -glucan. Each treatment had three repetitions, with 120 animals for each experimental unit according to a randomized experimental design. The *Penaeus vannamei* shrimp postlarvae in PL 16 state were cultivated along three months with a isoenergetic and isoproteic diet (35 % protein). In the twelve week of cultivation, the shrimps were infected with WSSV, using a pap elaborated with shrimps affected by the virus, the pap was made in the laboratories of Ceniagua. The obtained results validate the possibility of carrying out specific and punctual investigations to determine if the evaluated variables as survival, weight increment, length increment and nutritious conversion, they are positively affected by the addition of  $\beta$ -glucan to the diet.

## EVALUACION DE LA INCIDENCIA DEL $\beta$ - GLUCAN DE *Saccharomyces cerevisiae* EN CAMARONES *Litopenaeus vannamei* AFECTADOS POR EL SINDROME VIRAL DE LA MANCHA BLANCA (WSSV) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO EN LA ENSENADA DE TUMACO

Por

ALBA MARIELA TRIVIÑO VARGAS

## INTRODUCCION

Durante la última década las enfermedades virales han generado un serio impedimento económico para el cultivo de camarón en todo el mundo. La

preocupación en la industria camaronera ha venido en aumento, debido a estos patógenos pues están presentes en poblaciones de camarón silvestre, o cultivado (Lightner et al. 1997).

Las altas densidades de camarones en confinamiento a nivel mundial han facilitado las condiciones para albergar diversas patologías. Cuando estas patologías son agudas y su agente etiológico es un virus, Estas se convierten en un verdadero problema en las granjas; ocasionando en el camaronicultor industrial o artesanal, una desesperada búsqueda de alternativas, como la utilización de métodos de prevención o de manejo; pues los virus no permiten tratamiento alguno.

En la actualidad la industria camaronera mundial hace ingentes esfuerzos por encontrar la curación y un modelo eficaz de prevención contra el Síndrome Viral Mancha Blanca (White Spot Syndrome Virus). Esta enfermedad genera mortalidad en un ciento por ciento, produce grandes pérdidas y el cierre de empresas dedicadas a la explotación de camarones peneidos en diferentes partes del mundo.

En la costa pacífica colombiana, la zona de Tumaco experimentó en la década pasada una importante expansión del cultivo de camarones marinos, (*Litopenaeus*). Este desarrollo produjo la construcción y operación de más de 1600 Has en estanques camaroneros, constituyendose en el segundo productor de camarones de Sur América después de Ecuador. Sin embargo, el panorama actual es desolador y solo el 30 por ciento del área construida, se

cultiva con serios problemas de sobrevivencia, debido al establecimiento en nuestras costas del síndrome viral (WSSV), traducido en graves traumatismos económicos y sociales para la región.

Teniendo en cuenta la gravedad del síndrome viral y el desconocimiento sobre el manejo, tolerancia o "resistencia" a este virus, se pretende a través de esta investigación incluir el  $\beta$ -glucan 1,3 y 1,6 en la dieta alimenticia de camarones, ejemplares infectados con el síndrome en condiciones de laboratorio. El producto  $\beta$ -Glucan se estima aporta propiedades inmuno-estimulantes, El efecto será evaluado a través de indicadores como supervivencia, crecimiento y otras pruebas que evalúen la respuesta de los camarones frente a esta enfermedad. De otra parte, se pretende determinar si la inclusión de este inmuno-estimulante resulta ser una tecnología económicamente viable para las actuales condiciones de producción en los camarones marinos en Colombia.

## 1. DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA

Varios países del mundo dedicados a la producción de camarones *Litopenaeus vannamei* en confinamiento, han tenido que soportar grandes pérdidas económicas a causa de la patología del Síndrome Viral de la Mancha Blanca, tales como: Estados Unidos, China, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, Panamá, Tailandia, México, Perú y Ecuador. La detección inicial de esta enfermedad se realizó en el nordeste de Asia y el Indopacífico entre los años 1992 - 1993, y desde esta aparición se afectaron cultivos en China, India, Japón, Tailandia, Indonesia, Sri Lanka, Malasia, Bangladesh, y otros.

China reporto pérdidas de US\$ 1 billón en 1993 y Tailandia US\$ 500 millones en 1996, (Chamberlain 1999, I).

En enero de 1999 hace su aparición el WSSV en Nicaragua, Guatemala y Honduras, mientras que en Abril del mismo año la Mancha Blanca se confirmó en Panamá (Lightner 1999, I) y a finales de Mayo se detectó su presencia en el Ecuador, como afirma Alday (1999,I).

En Colombia, concretamente en la Ensenada de Tumaco se están presentando altos índices de mortalidad debido al virus (WSSV), enfermedad de la que hasta

ahora se tiene muy poca información sobre su prevención, evolución y manejo. Dicha situación solo contribuye a hacer más progresivas las pérdidas económicas en las granjas camaroneras, las cuales se han cerrado. Se ha encontrado que los *Penaeus* de América son mucho más susceptibles frente al WSSV, como menciona Jory (1999, 3), por lo tanto cada vez que se confirme la presencia de este síndrome se debe tomar muy en serio su control y erradicación.

Como puede entenderse la enfermedad tiene aproximadamente nueve (9) años desde su aparición en Asia y hasta la fecha no se cuenta con una metodología establecida para evitar sus efectos, quizás debido a la complejidad de la resistencia inespecífica de los camarones, de la cual se tiene muy poco conocimiento por estar en discusión. Por otra parte debido a los resultados poco alentadores obtenidos mediante la selección basal, en la búsqueda de ejemplares resistentes a este virus.

Algunos ensayos como la utilización de insecticidas para eliminar vectores, compuestos vitamínicos se han utilizado para aumentar tolerancia o resistencia a los patógenos con resultados variables. La inclusión de  $\beta$ -glucan como inmuno-estimulante podría ser una alternativa viable para tal fin. Sin embargo hasta el momento ha sido utilizado en larvas de camarón con el fin de obtener semilla de buena calidad; más no como un posible controlador viral. Se conoce que en tratamientos de peces enfermos, se han conseguido resultados aceptables.

## **2. FORMULACION DEL PROBLEMA**

Actualmente no se conoce el efecto del  $\beta$ -glucan en el control del Síndrome Viral de la Mancha Blanca (WSSV) en camarones *Litopenaeus vannamei* afectados bajo condiciones de laboratorio.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del  $\beta$ -glucan aportado por *Saccharomyces cerevisiae* en postlarvas y juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei*, afectados con el Síndrome Viral de la Mancha Blanca (WSSV) bajo condiciones de laboratorio en la ensenada de Tumaco.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

**3.2.1** Determinar la sobrevivencia del camarón *Litopenaeus vannamei* alimentado con diferentes niveles de inclusión de  $\beta$ -glucan en la dieta, versus un control.

**3.2.2** Comparar los incrementos de talla, peso y conversión alimenticia en camarones *Litopenaeus vannamei*, en cada uno de los tratamientos experimentales.

**3.2.3** Determinar los cambios histopatológicos en los ejemplares tratados con  $\beta$ - Glucan y los del control.

**3.2.4** Comparar el efecto de los diferentes tratamientos en camarones infectados con el síndrome viral de la mancha blanca (WSSV) a través de pruebas clínicas.

#### **4. MARCO TEORICO**

## 4.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Jofre (1988, 6) sostiene que las enfermedades infecciosas tienen su protagonismo en virus, bacterias, hongos y parásitos los cuales son las principales causas de mortalidad en las especies cultivadas. Estas enfermedades sean causadas por patógenos no específicos o específicos se dan generalmente en forma enzoótica, debilitando a los especímenes y volviéndolos susceptibles a cualquier predador o agresión ambiental; si consideramos en el ambiente, cualquier desequilibrio provoca un aumento del "estrés" en la población, permitiéndole a los patógenos condiciones favorables.

El mismo autor (7) afirma que muchas prácticas habituales en Acuicultura conducen a un aumento de "estrés", y la resistencia de los animales a la enfermedad está íntimamente ligada a éste.

Madigan, Martinko y Parker (1968,253) anotan "el que un virus pueda causar una enfermedad o un cambio hereditario, depende en muchos casos de la célula hospedadora y de las condiciones ambientales".

**4.1.1 Resistencia del hospedador.** Jofre (9) afirma que en moluscos y crustáceos los mecanismos pertinentes sobre la resistencia del hospedador, se han estudiado poco, se supone que de forma general no es grande la diferencia con lo que ocurre con los vertebrados. Las defensas orgánicas se

pueden dividirse en dos grandes grupos: a. Las independientes de estímulos y que siempre son no específicas, y b. La resistencia dependiente del estímulo.

**a. Las independientes de estímulos.** El mismo autor informa que la resistencia independiente del estímulo la tienen todos los individuos, sean que hayan sido estimulados o no por el agente infeccioso, se considera la eficacia a diferentes patógenos como no inducibles. Esta resistencia se subdivide en los siguientes grupos: barrera de superficies, antimicrobianos, fagocitosis no específica, e inflamación.

La barrera de superficie como su nombre lo indica, es la primera fuente de rechazo al patógeno en su superficie, ya sea física, química o biológica. La principal barrera física en los peces es la piel, en los moluscos y crustáceos el exoesqueleto (Jofre,10), afirma que si el patógeno penetra en los moluscos, peces o crustáceos, se desencadena una serie de defensas no inducibles, semejantes a la de los vertebrados.

En los peces, moluscos y crustáceos los antimicrobianos presentes en los tejidos y humores de los animales, tienen una serie de moléculas que ayudadas en conjunto por otros tipos de resistencia ejercen actividad antimicrobiana. Entre estas sustancias y dependiendo de la especie hay presencia de lisosima, proteína C reactiva, transferrina, etc. Fletcher (1982), citado por Jofre (11).

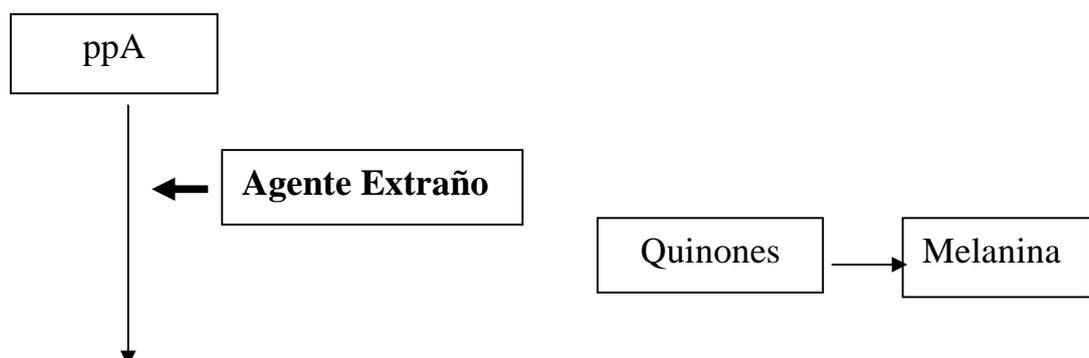
También en el suero de los crustáceos se han encontrado las "antisomas" que son sustancias que interfieren en el crecimiento antimicrobiano, según Bang (1970) mencionado por Jofre (11). establece que la fagocitosis es una línea de defensa muy importante en los animales más inferiores. Las células fagocitan cualquier material particulado de forma no específica. "En crustáceos y moluscos la fagocitosis por células fagocíticas presentes en sangre y tejidos constituyen un mecanismo fundamental" Bang (1970), Fen y Cauzonier (1970) citados por el mismo autor (12).

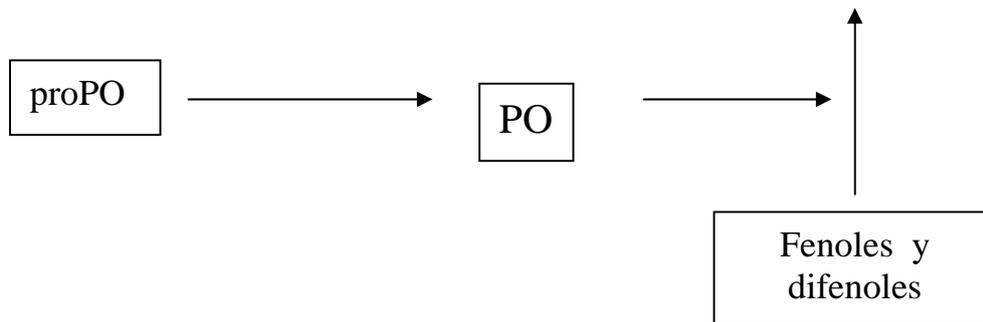
De acuerdo con Rousseau (1993, 41) los camarones, como todos los seres vivos tienen un sistema inmunitario con el fin de impedir que los agentes potencialmente patógenos se desarrollen en el animal y causen enfermedades. El sistema inmunológico del camarón y el resto de los invertebrados no producen anticuerpos, lo cierto es que todavía se conoce poco sobre el sistema inmunológico en los invertebrados y los camarones en particular.

Rousseau (42) afirma en el sistema sanguíneo de los camarones se encuentran los hemocitos, c{células sanguíneas comprometidas con el sistema inmunológico de los crustáceos. Los hemocitos se clasifican según la presencia o no de granulos. Las células están diferenciadas en células hialinas, las cuales no poseen gránulos, tienen un núcleo amplio y un volumen citoplasmático pequeño, con muy poca refringencia cuando se las observa al microscopio. Estas células intervienen en el mecanismo de defensa liberando factores para estimular la coagulación del plasma.

Las células semi-granulosas tienen entre uno y cuarenta gránulos, con un diámetro aproximado a 0,4 micras y un núcleo menos amplio respecto a la célula hialina, intervienen en dos mecanismos para defenderse, uno celular que consiste en fagocitar las partículas extrañas potencialmente patógenas; y el otro por mecanismo químico en el que intervienen los gránulos. La presencia de partículas extrañas trae consigo liberar los gránulos en las células por exocitosis y el mismo estímulo desencadena una reacción enzimática compleja. La figura 1 indica la cascada fenoloxidasa (PO), que tiene como producto final la melanina.

La PO tiene un carácter gelatinoso y con propiedad fungicida. Este fenómeno melanización se puede observar visualmente en la cutícula del animal, en forma de manchas negras. Las células granulosas tienen gránulos de 0,8 micras los cuales esconden parcialmente el núcleo reduciendo el espacio para el citoplasma. También intervienen en la melanización pero a un nivel todavía más amplio y lo encapsulación de partículas. Rousseau (43) vuelve a reiterar





proPO = Profenoloxidasa  
 PO = Fenoloxidasa  
 ppA = Profenoloxidasa activador

Figura 1. Esquema de la cascada PO (Fenoloxidasa)

además de la fagocitosis, encapsulación y melanización; los crustáceos parecen tener un cuarto mecanismo de defensa y su comportamiento y eficiencia no han sido demostrados en camarones.

Según Sorderhall, et al (1994), citado por Dieguez (1999, l3) el sistema conocido como la profenoloxidasa, es el sistema de reconocimiento y defensa en invertebrados. Aclara los hemocitos participan en los procesos fagocíticos, formación de nódulos, encapsulación y mediación en la citotoxicidad, poseen gránulos con fenoloxidasa, o enzima para la reacción de la melanización.

La inflamación es la dilatación de los capilares y a través de cambios de permeabilidad en las paredes de estos se aumenta la fagocitosis y actividad antimicrobiana en la zona.

**b. Resistencia dependiente del estímulo.** Jofre (14) señala que la resistencia dependiente del estímulo es desencadenar mecanismos para resistencia como consecuencia de la infección; estos mecanismos son reacciones denominadas específicas o respuesta inmune o no específicas como los interferones.

El mismo autor menciona la respuesta inmune puede ser humoral y celular. La humoral es la defensa efectuada a través de los anticuerpos. La celular es la defensa o respuestas inmunes causadas por una combinación de linfocitos, células fagocíticas y moléculas efectoras de naturaleza no inmunoglobulínica.

De acuerdo con Manning, *et al* (1982), citado por Jofre (14) aclara "aunque por el momento hay escasa información, parece que en peces se dan muchas de las reacciones características de la inmunidad mediada por células". El mismo autor anota, "parece que la inmunidad mediada por células es importante mecanismo de defensa en peces, principalmente frente aquellos patógenos que viven y se multiplican en la célula del hospedador".

En moluscos como en crustáceos se ha encontrado un suero antimicrobiano, y su concentración aumenta como consecuencia de la infección, según lo mencionan Bang (1970), Feng y Cauzonier (1970), citados por Jofre (12).

Los factores que afectan la resistencia pueden ser internos o externos, (Jofre, 14) dice: "no obstante, son principalmente los factores ambientales los que generan una disminución de la resistencia de los animales; este factor es más importante en poiquilotermos".

En acuicultura se deben tener en cuenta los cambios ambientales pues existe una consecuencia directa para los especímenes acuáticos reflejada en el descenso de resistencia producido por el "estrés". Según Brett (1958), citado por el mismo autor (15) define "estrés" como un estado generado por un factor ambiental, o por otros fenómenos involucrados en forzar la adaptabilidad normal del animal o perturbación en sus funciones normales en tal medida reduciéndole las posibilidades de supervivencia. Entre los agentes estresantes están: anoxia, infección, sobresalto, competencia, agotamiento por ejercicio, anestesia, etc.

Jofre (15) menciona "muchos animales de interés en Acuicultura presentan infecciones latentes sin sintomatología clínica. Un aumento del estrés por contaminación provoca el paso a infección activa". Según Couch (1976), citado por el mismo autor (17) sostiene que en crustáceos como la gamba rosa, cuando se expone al PCB's, una enfermedad latente, que aparentemente es

provocada por baculovirus, pasa a ser activa causando mortalidad hasta del 80%.

Jofre (17) sostiene las sustancias inmuno-estimulantes ponen en alerta al sistema inmune y por regla general se extraen de microorganismos como bacterias Gram-negativas (lipopolisacáridos), bacterias Gram-positivas (peptidoglicanos) y hongos, levaduras y algas ( $\beta$ -glucanos).

Según Cedeño et al.,(2, 1999) La excitación del sistema inmunitario se puede traducir en un alerta a largo plazo (inmuno-estimulación), con un efecto protector contra los microorganismos patógenos. Sin embargo varios autores han mostrado evidencia en protección contra vibrios, e incluso en virus, evidenciando una capacidad en el camarón inmuno-estimulado, de evitar la infección, destruir el virus o mantenerlo en niveles indetectables. No existe información consistente sobre que mecanismos inmunitarios actuarían contra las infecciones bacterianas y/o virales pero una pista sobre estos mecanismos podrían ser la naturaleza en la respuesta inmune de los invertebrados, no específica y apta para generar mecanismos y/o moléculas con un amplio espectro de acción, recuérdese que las tachiplesinas (péptido antibacteriano en los quelicerados) posee acción antibacteriana, antifúngica y antiviral. No sería por lo tanto extraño que la inmunoestimulación en el camarón, prepare a este organismo para enfrentar una amplia gama de agresores (bacterias, virus, hongos).

**4.1.2 Modos de transmisión de las infecciones.** Según Jofre (24), la transmisión se puede dar horizontal y vertical. La transmisión horizontal es cuando la infección se adquiere con la acción de otros organismos enfermos. Puede darse a través de heridas, mucosas, ingestión con el alimento, contacto directo con el animal infectado o picaduras de vectores. La transmisión es vertical cuando el patógeno se transmite a la descendencia. Esta es importante en el origen de los portadores asintomáticos.

En Acuicultura se tienen muchas pérdidas por causa de infecciones en bivalvos y crustáceos que han sido transportados de un continente a otro y con huevos infectados.

Sobre los procesos infecciosos, Jofre (24) aclara la información disponible acerca de los procesos patológicos presentes en los diversos órganos de los peces, en moluscos y crustáceos; son escasos y están poco sistematizados. Si en peces es difícil establecer una mínima sistemática de patologías, en moluscos y crustáceos es más dispendioso.

Bautista (1988, 203) menciona que muchas veces antes de ver signos, lo primero a observar es la súbita aparición de mortalidades. Sin embargo, las patologías más reportadas en crustáceos son a nivel de exoesqueleto y la infiltración de las células hemáticas en las zonas afectadas.

## 4.2 GENERALIDADES DE LOS VIRUS

Según Roberts (1981, 131), los virus son agentes infecciosos microscópicos y solo se pueden multiplicar cuando están dentro de células vivas del huésped. La característica que los hace distintos de algunas bacterias pequeñas, es la estructura sencilla y el mecanismo de replicación.

Madigan, Martinko y Parker (242) dicen "Los virus son elementos genéticos que se pueden replicar independientemente de los cromosomas de una célula, pero no independiente de las células, y para multiplicarse deben alcanzar una célula en la que puedan replicarse".

**4.2.1 Material Genético.** Según Walter, McBee y Temple (1980,91), estas entidades microscópicas están constituidas por DNA. o RNA pero nunca por los dos. El virus está rodeado por una envoltura formada con proteínas que le sirven como protección, estabilizador y ayuda enzimática al ácido nucleico para su penetración en las célula hospedadora. Cuando los virus se replican regulan los sistemas genéticos y enzimáticos, obligando a la célula invadida a sintetizar únicamente el ácido nucleico y los componentes proteicos del virus, para posteriormente ensamblarse y formarse los nuevos viriones.

De acuerdo con Walter, McBee y Temple (249), los virus se dividen en tres grandes grupos, por la naturaleza del hospedero que invaden: células animales, vegetales, o bacterianas. Para su estudio se conforman tres grupos:

- En la célula hospedera normal, o en una hospedera alterna.
  - En tejidos de cultivos vegetales, o en las células animales.
- Por microscopía electrónica.

**4.2.2 Elementos constitutivos de un virión:** Según Madigan, Martinko y Parker (249) un virión es la partícula viral completa, es la forma extracelular de un virus y contiene un genoma con DNA o RNA. El tamaño y la forma de los viriones es muy variable. Los elementos constitutivos de un virión se consideran:

- **Cápside:** Es la cubierta proteínica del virus. Su característica esencial es que está formada por subunidades repetidas, idénticas, dispuestas de acuerdo a patrones definidos en forma precisa. Las unidades mas sencillas son moléculas proteicas únicas, y las mas complejas son subunidades morfológicas denominadas capsómeros, los cuales son fácilmente visibles al microscopio electrónico, y están constituidas por varias moléculas proteicas, ya sean idénticas o diferentes. La Cápside y la envoltura tienen una función doble; la primera consiste en proteger a los genomas virales de los agentes potencialmente destructivos presentes en el medio extracelular y la segunda, introducir los genomas virales dentro de las células huéspedes.
- **Envolturas:** En la mayoría de los virus animales las nucleocápsides están cubiertas por envolturas que contienen membranas donde se encuentran

proteínas específicas del tipo de virus. Estas envolturas por lo general tienen glicoproteínas en forma de espículas, enzimas, y lípidos.

- **Capsómero:** Son subunidades estructurales proteicas que forman la Cápside.
- **Centro:** Es la estructura interna que contiene el ácido nucleico, llamado también nucleocápside.
- **Ácidos nucleicos virales:** Los ácidos nucleicos de estos virus son sorprendentemente variados. Algunos son DNA y otros RNA, algunos son bicatenarios, otros monocatenarios, algunos con polaridad positiva, otros negativa. La información concerniente a estas y otras propiedades de los ácidos nucleicos virales es esencial para la comprensión de las reacciones claves durante los ciclos de multiplicación viral. La infectividad de los ácidos nucleicos virales contienen toda la información necesaria para la formación de las partículas virales.
- **Proteínas virales:** Son el principal constituyente de todos los virus, y se denominan proteínas estructurales.

Roberts (42) reporta que la forma o simetría de los viriones puede ser:

- Cúbica: Los viriones se ven como cristales pequeños es decir su forma es la de un "icosaedro", (poliedro regular de 20 caras triangulares equiláteras). Ejemplo; los Adenovirus.
- Helicoidal: Tienen forma de bastones largos. ejemplo; Mixovirus.
- Compleja: su geometría básica no es un principio aparente.

**4.2.3 Propiedades generales de los virus.** Madigan, Martinko y Parker (252) reafirman que los virus tienen dos estados; uno intracelular y otro extracelular. El extracelular es una partícula submicroscópica con ácido nucleico y rodeada de proteína u otros componentes macromoleculares. A esta partícula vírica, también se le suele decir "virión". en este estado el virión es metabólicamente inerte o sea no tiene respiración, ni función biosintética. El estado intracelular es cuando el virus invade la nueva célula y realiza la respiración vírica produciendo el genoma vírico y la sintetización de la cubierta del virus. El mismo autor establece "cuando un genoma vírico se introduce y se reproduce se denomina infección".

**4.2.4 Estudio de los virus.** Walter, McBee y Temple (91) dicen para estudiar los virus se requiere separarlos de la célula hospedadora, someterlos a centrifugación diferencial, usando primero una velocidad baja para precipitar los desechos celulares, y luego con velocidad alta para precipitar los viriones. El conteo se realiza con microscopía electrónica utilizando una técnica compartida.

### 4.3 EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV)

**4.3.1 Estructura, tipo y biología.** Chamberlain (4) dice el Síndrome Viral de la Mancha Blanca, o enfermedad del Punto Blanco, es causado por un baculovirus grande que se ha encontrado en varios crustáceos, como camarones *Litopenaeus* de cultivos o en salvajes, cangrejos, etc.

El virionte del WSSV mide de 70 a 150 nanómetros, posee ADN, también se le conoce muy comúnmente como WSBV, su severidad de infección se presenta en los estadíos postlarval y juvenil.

El virus de la Mancha Blanca pertenece a un grupo de por lo menos cinco virus, con características muy similares en morfología, y se replican en el núcleo de las células infectadas, por esto se habla genéricamente el Síndrome Viral de la Mancha Blanca. Afecta los tejidos ectodérmico y mesodérmico, es decir epitelio cuticular, branquias, apéndices, estómago, etc. (Lightner, 1996). Su clasificación taxonómica ha sido cambiada varias veces por encontrarse aún en estudio. Sin embargo la mas utilizada corresponde a la dada en 1995 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) colocandolo en el género Non-Occluded Baculovirus, subfamilia Nudibaculovirinae, y familia Baculoviridae. En el mismo año (Murphy *et al.*, 2, 1995) declara el ICTV canceló la clasificación Nudibaculovirinae y Non-Occluded Baculovirus.

Chamberlain (5) dice; este virus se ha encontrado en diferentes lugares geográficos del mundo, y de acuerdo a estos sitios, y apariencia en los hospedadores ha recibido sus nombres.

De su morfología se puede decir es un virus en forma de barra con una envoltura y en uno de sus extremos parece tener una cola (Ver figura 2). (Wang *et al.*, 23, 1995). (Durand *et al.*, 27,1997). Afirma que la Cápside está compuesta por anillos de subunidades, y localizadas perpendicularmente al axis longitudinal de la Cápside. Un extremo de este cilindro de subunidades está cerrado por un segmento en forma redondo, el otro extremo es cuadrado. Es un virus de doble cadena de ADN, de 190 – 200 kilobases de longitud. Compuesto por proteínas grandes que tienen un peso molecular de 19, 23.5, y 27.5 kda (Cesar *et al.*, 1998).

#### **4.4 BIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE LA MANCHA BLANCA, (WSSV)**

##### **4.4.1 Distribución geográfica y hospedadores afectados.** Jory (3)

declara el WSSV apareció inicialmente en el noroeste de Asia en 1992 - 1993, pero se extendió rápidamente a varias granjas camaroneras en los países de Asia y el Indopacífico. Desde su aparición en Asia, el WSSV ha causado las mayores perdidas en la industria del camarón cultivado en los países de China, India, Japón. Tailandia, Indonesia, Sri Lanka, Malasia, Bangladesh y otros.

El mismo autor (3) afirma en Norteamérica desde Noviembre de 1995, se detectó la presencia de l virus por un brote ocurrido en una granja del sur de

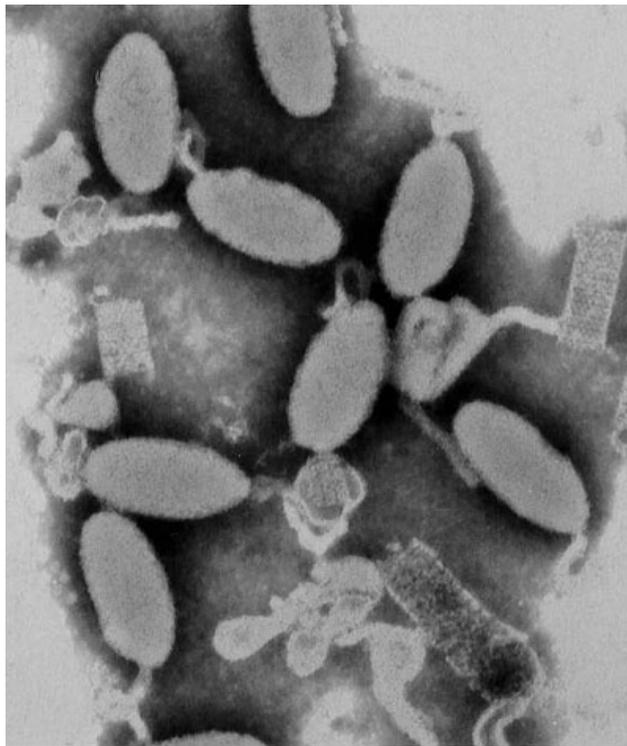


Figura 2. Microfotografía del Virus de la Mancha Blanca - WSSV

Según Lightner (2,1997) El virus WSSV ha provocado pandemia masiva en la región Indo-Pacífico, desencadenando pérdidas multimillonarias.

Texas de los Estados Unidos, sembrada con *L. Setiferus*. Se responsabilizó como posible vector de la dispersión, a las plantas procesadoras de camarón localizadas en las zonas aledañas. Estas afecciones fueron en *Penaeus* salvajes y de cultivo. En Centro América el virus llegó a Panamá, Honduras, Nicaragua, México, Costa Rica y Salvador. En Sudamérica el WSSV se ha extendido por Ecuador y Colombia.

Según Treece (1998,2), entre los hospedadores afectados están las especies de *Penaeus*: *P. monodón* (L. gigante tigre), *P. japonicus* (L. kuruma), *P. chinensis* (L. gordo u orientalis), *P. indicus* (L. blando o hindú), *P. merguensis* (L. banana), *P. setiferus* (L. blanco del Atlántico), *P. penicillatus* (L. cola roja). Experimentalmente las infecciones severas y letales de WSSV en Tailandia se produjeron en *P. vannamei* (L. blanco del Pacífico), *P. Stylirostris* (L. azul), *P. aztecus* (L. café del Atlántico), *P. duorarum duorarum* (L. rosa), y *P. setiferus*.

4.4.2 **Signos clínicos.** Según Alday (1999, 2), los signos clínicos iniciales del WSSV son muy comunes para otras patologías, lo que en ocasiones impide el diagnóstico correcto, por lo tanto se puede confirmar la infección del WSSV con un análisis PCR (Reacción de la Polimerización en Cadena), o a través de la prueba de ELISA.

Chamberlain (6) informa que los signos clínicos en juveniles y subadultos infectados tienen puntos o manchas blancas de 0,5 a 2,0 mm. de diámetro, los cuales empiezan en la cutícula del caparazón entre el 5º. y 6º. segmento abdominal, extendiéndose en todo el cuerpo. Muchas veces se quedan sin cutícula. Las manchas o puntos blancos son depósitos de sales de calcio y se pueden apreciar mejor por dentro del caparazón. Los animales infectados muestran un comportamiento letárgico, no se alimentan, nadan lentamente en las orillas del estanque cerca de la superficie y eventualmente se asientan en el fondo y mueren. Los animales moribundos se tornan de rosado a un rojo - marrón debido a la expansión de los cromatóforos cuticulares. (Figura 3)

Chamberlain (6) manifiesta las poblaciones de camarón con estos síntomas típicamente han tenido altos porcentajes de mortalidad que pueden alcanzar el ciento por ciento entre los tres a diez días después de presentados estos síntomas.

Jory (4) dice también se observan inclusiones blancas fijadas en la cutícula y casi siempre las colas están rojizas. El rango de las inclusiones va de puntos

minúsculos a discos con varios milímetros de diámetro y pueden converger a puntos más grandes. Estos puntos en su mayoría se pueden observar



Figura 3. Lesiones macroscópicas típicas de la patología del WSSV, encontrados en camarones cultivados en Tailandia.

fácilmente si se remueve la cutícula de la cabeza del camarón, levantando cualquier tejido que esté adherido y mirando la cutícula a contraluz. Cuando aparecen estos signos, la mortalidad está cerca, sin embargo no se debe diagnosticar como WSSV solo por mirar los signos macros, o manchas blancas en la cutícula, estas también suelen producirse debido a alta alcalinidad y otras condiciones medio ambientales. Además, la diagnosis preliminar debe incluir exámenes histopatológicos.

**4.4.3 Cambios histológicos.** Según Flegel (1999, 2), indica como el basófilo va desde un prominente eosinófilo a pálido, (fijación H&E), Feulgen - positivo. Hay cuerpos de inclusión intranucleares en el núcleo hipertrofiado, en las células epiteliales cuticulares, y las del tejido conectivo, lo cual es lo más común. Es menos frecuente, en el epitelio y célula linfocítica de la glándula antenal, células hematopoyéticas, y en los fagocitos del corazón. (Figura 4). El desarrollo de los cuerpos de inclusión al comienzo son eosinofílicos, centro-nucleados, con un halo (fijación de Davidson), y parecidos a los del IHHNV. Sin embargo, son más grandes, más desarrollados pero sin halo. Las células basofílicas del tejido infectado son blanco pálido. Estas dos enfermedades se distinguen claramente cuando la infección está avanzada.

**4.4.4 Prevención y transmisión de la enfermedad.** Jofre (24) dice que la forma más eficaz y barata de controlar el virus es previniendo el contacto entre éste y los hospedadores, sin embargo prevenir el contacto es un proceso difícil

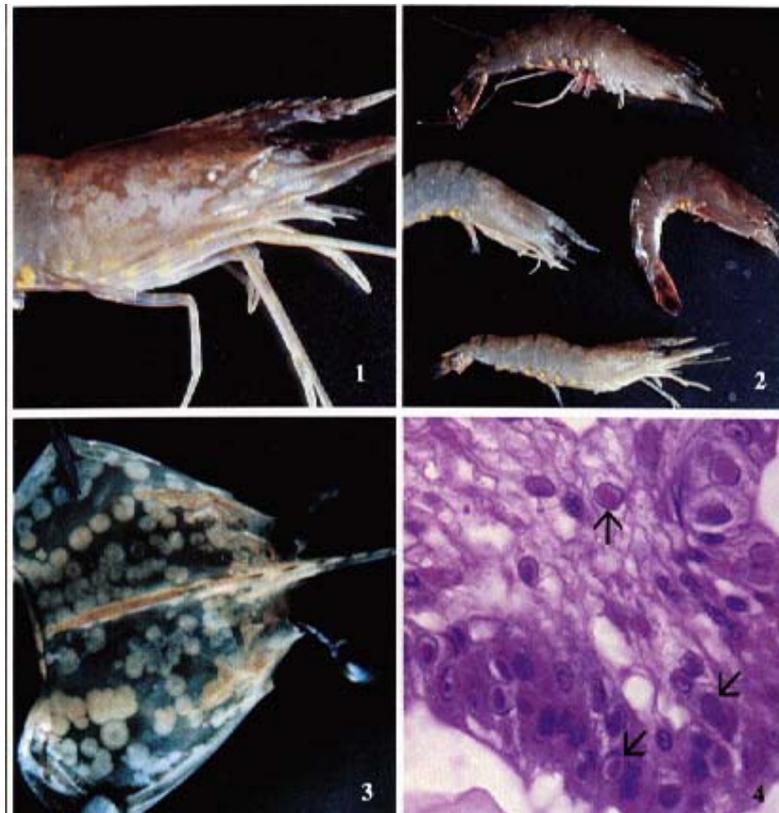


Figura 4. Lesiones histológicas causadas por WSSV.

de conseguir. La transmisión del WSSV es horizontal, es decir se da por los patógenos presentes en los especímenes enfermos.

Alday (1) manifiesta que la ruta más común para la transmisión del virus WSSV se da a través de la introducción de especímenes vivos, ya sean reproductores, nauplios o post-larvas. Igualmente Lara (1999), citado por Chamberlain (5) anota que el principal vector del WSSV es la semilla salvaje, Alday (2) encontró que la infección se adquiere por introducir en zonas afectadas productos como: camarón congelado, procesado y balanceados con harina de cabeza de éste crustáceo; o por empacadoras cercanas a las granjas camaroneras, origen toma de agua; alimentación reproductores con alimento fresco, con camarón u otros crustáceos, agua no filtrada a 10 micrones, y en los cultivos donde se permite fauna acompañante como cangrejos, ascetes, miscidáceos y caridios, etc. Una forma potencial de transmisión considera a los pájaros.

**4.4.5 Factores que proporcionan la enfermedad.** Alday (2) afirma, entre los factores que afectan la patología WSSV están; las temperaturas bajas las cuales aumentan la incidencia del virus, la fauna acompañante puede convertirse en vector, alcalinidad excesiva, contaminantes y altas densidades de siembra. En Ecuador antes que apareciera el virus WSSV se sembraba entre 9 a 30 individuos por metro cuadrado y actualmente se siembran 5 a 10

individuos por metro cuadrado. La deficiente nutrición, en los seres vivos es una limitante en la resistencia a enfermedades y/o inmunidad. Sobre los recambios de agua, en 48 camaronerías encuestadas en Ecuador, el 67,7% no realiza recambio y si los efectúa sólo se hacen para recuperar los niveles de agua. Otros factores importantes fueron los desperdicios de sólidos y líquidos no tratados, y los camiones de transporte infectados. El manejo y los cambios bruscos ambientales son los directos responsables en causar estrés a los camarones, y los predisponen a las infecciones.

Jofre (9) reitera que "la mayoría de las veces la combinación de un agente infeccioso y el stress ambiental, es lo que eventualmente causa la progresión de la enfermedad y a veces la muerte". Lara (1999), citado por Chamberlain (4) asegura que en Tailandia hay reportes sobre epizootias de WSSV después de un cambio rápido de pH o salinidad.

**4.4.6 Estabilidad vírica.** El nivel del virus inactivado se incrementa al disminuir la temperatura. Según Bisset (1948), citado por Roberts (109) manifiesta que un pez ó un anfibio ya inmunizados y estaban produciendo anticuerpos, reducían rápidamente sus niveles séricos, cuando la temperatura estaba por debajo de un nivel crítico.

**4.4.7 Control de la enfermedad.** Fisheries and Oceans Canadá (1999), citado por Lightner y Redman (1999, 1) afirma "no existe método de prevención o control". Sin embargo, Tailandia fue un país fuertemente devastado por el

WSSV durante cuatro años y en la actualidad es el primer productor a nivel mundial.

Chamberlain (6) establece que Tailandia, el líder en la producción de camarón cultivado en granjas, (120 mil toneladas métricas en 1998), durante los siete años pasados ha aprendido a sostenerse a pesar de las enfermedades, principalmente el WSSV y el YHV, (Yellow Head Virus), o virus de la cabeza amarilla, al igual que otros problemas. Esto ratifica que se puede controlar aunque no haya una metodología establecida que así lo garantice, pero está demostrado que se puede convivir con el virus, pues otros países de Asia lo han logrado.

Se debe tener en cuenta el comportamiento de este virus; pues si las larvas de los *Penaeus* tienen contacto cercano con el patógeno, su mortalidad por éste puede ser nula, pero si el contacto es tardío, es decir en su etapa juvenil o adulta, entonces su mortalidad es alta, (Alday, 3).

La misma autora afirma se ha demostrado que después de una Epizoótia de WSSV con mortalidad acentuada, las siguientes cosechas del cultivo son normales, lo que permite proyectar que todo está para evaluar.

Actualmente muchos científicos están trabajando en este campo: Doctor Donald Lightner, y sus colaboradores, de la Universidad de Arizona; Dr. Timothy Flegel, de la Universidad de Mahidol de Tailandia; Dra. Victoria Alday de

Graindorge, experta de la Unión Europea y Directora de Diagnóstico del Centro de Servicios para la Acuicultura del Ecuador; Cenaim-Espol, Ecuador; Centro Nacional de Investigación para la Acuicultura, (CENIACUA), Colombia; Dr. Darryl Jory, George Chamberlain, y Charles Woodhouse, de la Global Aquaculture Alliance, Estados Unidos y Cesar Villamar, México, entre otras. Según Boyd (1999), citado por Jory (2) dice lo único que se ha conseguido es minimizar el impacto del virus WSSV.

#### **4.5 INCIDENCIA DEL WSSV SOBRE LA PRODUCCION DE *Penaeus*.**

Ecuador es uno de los líderes en el cultivo de camarón *Penaeus* en el mundo entero. Acaba de soportar el TSV, (Taura Syndrome Virus), ó Síndrome Viral del Taura, y se encuentra sufriendo las mortalidades causadas por el WSSV en diferentes zonas costeras, confirmadas a través de muestras P.C.R., positivas de camarones infectados de las piscinas de los estados del Guayas, El Oro y Esmeraldas. Esto permite intercambiar estrategias para ayudar a minimizar el impacto negativo en la industria camaronera. (Alday, 4)

Coglitore (1999,1) dice la producción camaronera ecuatoriana se verá afectada posiblemente en un 50%. Coglitore, es el Presidente de la Cámara Nacional de Acuicultura en el Ecuador, tomó en cuenta la experiencia vivida en Tailandia, país donde se pudo superar las mortalidades masivas generadas por

el síndrome viral de la mancha blanca, (WSSV) por eso Coglitore (1) declara "nosotros estamos convencidos que vamos a sobrevivir pese al virus".

El mismo autor dice, el Ecuador cuenta aproximadamente con 180.000 hectáreas de granjas camaroneras, 284 laboratorios, 26 fábricas de concentrado y 70 plantas procesadoras y exportadoras. En el Ecuador el banano genera la mayor cantidad de divisas y el segundo lugar lo ocupa el camarón y adiciona 1.250.000 oportunidades de trabajo, por eso los efectos del WSSV azotaron la economía de este país.

Los ecuatorianos han fijado estrategias frente a esta amenaza, a través de reuniones y conferencias para tratar de manejar dicha epizootia, invitaron expertos de Tailandia para aprender de su experiencia. En segundo término prohibieron la importación de camarones en cualquier estadio; exigieron certificar los nauplios, manejar los desechos del camarón, prohibieron los pesticidas y avalaron los sistemas de maduración.

Coglitore (1) agrega "la industria camaronera aprenderá con el tiempo a convivir con el virus de la Mancha Blanca"; pues en Ecuador existen datos de la Subsecretaría de Recursos Pesqueros del Camarón, que reportan en 1998 145.295 hectáreas con una producción en toneladas métricas de 153.729.

En Colombia la llegada del WSSV sólo se reporta en la Ensenada de Tumaco, con resultados negativos por este agente. Se tiene muy poca información al

respecto; ya se han cerrado varias granjas camaroneras por el alto porcentaje de pérdidas económicas para los productores. Según los reportes de la planta procesadora y exportadora IDELPACIFICO, en el segundo semestre de 1998 se obtuvo 691,1 Ton de camarón *P. vannamei*; en el primer semestre de 1999 se produjo 1.143,9 Ton, mientras que el segundo semestre de ese mismo año solo cosecharon 272,6 Ton. Esto permite observar que la influencia de la Mancha Blanca en este último período fue crítica. <sup>(x)</sup>

A diferencia del Ecuador en Colombia ya se cuenta con la preocupación y diligencia del gobierno, hasta el punto de tener dirigiendo el plan de ataque a la Dra. Victoria Alday de Graindorge, quien estuvo estudiando el virus en Tailandia por varios años. Coglitore (3).

En Colombia, el Centro Nacional de Investigaciones para la Acuicultura, (CENIACUA) está haciendo trabajos al respecto, y la Camaronera Balboa fija estrategias con personal oriundo del Japón para controlar el WSSV.

En si en Colombia se sabe muy poco sobre esta patología, excepto los argumentos planteados en el Seminario del 2000 realizado en noviembre de 1999, en Guayaquil, Ecuador. Al cerrarse las granjas camaroneras en Tumaco se han acrecentado dos problemas que cada día se agudizan mas; los productores atraviezan una crítica situación económica debido a las pérdidas en

---

<sup>(x)</sup> IDELPACIFICO, Planta procesadora exportadora, Tumaco Colombia, 1999, (Comunicación personal).

este sector, y la situación social por la carencia de trabajo que las camaronas ofrecían a la población tumaqueña, y la repercusión a nivel nacional por la suspensión de exportación a mediana escala.

#### **4.6 MANEJO UTILIZADO PARA CONTRARRESTAR LOS EFECTOS DEL WSSV**

La información que se tiene es del país vecino, el Ecuador, quienes después de percibida la amenaza del WSSV, iniciaron una fuerte lucha protagonizada por la Fundación Cenaim-Espol, la Dra. Alday, el gobierno y los cultivadores de camarones. Allí se trató el problema experimentando con diferentes productos, cambios de manejo, etc.

Alday (4) informó que después de la crisis los cultivadores de camarones realizaron siembras con densidades más bajas, entre 5 a 10 individuos por m<sup>2</sup>, larvas de laboratorio con P.C.R., negativo, provenientes de nauplios de maduración, y siembra directa. Los camaroneros ecuatorianos lograron bajar la intensidad de la mortalidad en sus piscinas por la infección del WSSV.

Alday (5) dice, otra técnica consiste en tratar larvas antes de la siembra con aclimatación y, desinfección; se filtra el agua a 100 µm, utilizan timsen, (1,0 g/Ton), furazolidona, (1,0 g/Ton), β-Glucan, (1,0 L/Ton), cloramina-T, formalina, halmaq, (6,0 g/Ton); también durante el transporte suelen utilizar β-Glucanos.

---

Los estanques son tratados con cal hidratada después de cada cosecha, suministrando de 100 a 1.500 kilogramos por hectárea, lo mismo que cloro HTH y timsen. El filtrado se maneja con malla larvera doble hasta malla nítex de alta resistencia de 150 – 285  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La misma autora sostiene que a la alimentación le agregan bio-reguladores (productos homeopáticos) como el promotor H; antibióticos, ajos, efinol, rovomi (una mezcla de minerales y vitaminas), sábila,  $\beta$ -Glucanos de diferente procedencia (inmuno-esimulantes), vitamina C, timsen amonio cuaternario), aceite de pescado, ají, chanca de piedra y polisacáridos sulfatados. La calidad de agua la mejoran eliminando los vectores, y alivian la condición del camarón utilizando zeolita, dipterex y sevin (insecticidas), formalina, cloro, jabón, cal hidratada, bacterias nitrificante, timsen, cascajo, (piedra de cantera). Para evitar los vectores, como los cangrejos de los muros, aplican biobac, kilol, melaza, extracto de maracuyá, sábila, y antibióticos. Algunos dejaron de hacer recambios y otros lo disminuyeron, pero se presentaron problemas. Sinembargo, la mayoría lo hizo durante los primeros 30 a 60 días.

Según Lara (1999), citado por Chamberlain (5) confirma que en Tailandia se recomendó llenar el estanque de producción y suministrarle un insecticida de vida corta y de rápida acción, lo ideal es eliminar rápidamente los crustáceos de los estanques ó granjas camaroneras, porque el WSSV no vive fuera del hospedador por mas de tres a cuatro días. Hay un alto grado de confianza de

que después de cinco días de la aplicación del insecticida el estanque estará libre de virus y podrá ser sembrado.

#### **4.7 $\beta$ -GLUCAN DE LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***

**4.7.1 Breve Reseña Histórica de su Descubrimiento.** Vitamet Health Foods (1998), citado por Clark (1999,3) dice que el Dr. Nicholas DiLuzio, inmunólogo de la escuela médica de Tulane, hizo un descubrimiento central del  $\beta$ -Glucan. El Dr. DiLuzio investigó un potente realizador de inmunidad, que es una preparación farmacéutica llamada Zymosan.

Varios estudios se han realizado sobre este producto reportando su relevante habilidad en el mejoramiento in situ, pero en algunos casos se mencionaron reacciones alérgicas e inflamatorias. El Dr. DiLuzio se maravilló por la existencia de un componente inmune-mejorador y quizá totalmente diferente que causara efectos colaterales. Su hipótesis fue correcta pues el  $\beta$ -Glucan derivado de la levadura purificada, probó sin cuestionamiento ser el único componente inmuno-estimulante del Zymosan. Mientras las otras impurezas fueron causadas por los efectos secundarios. El Dr. DiLuzio está considerado como una autoridad en las investigaciones del  $\beta$ -Glucan.

El mismo autor informa que muchas instituciones prestigiosas como, la Universidad de Tulane, la Escuela médica de Harvard han estudiado el  $\beta$ -Glucan y han testificado su inmuno-actividad y sus efectos.

#### **4.7.2 Generalidades y composición química del $\beta$ -Glucan.** Según Clark (4).

El  $\beta$ -Glucan es un ingrediente activo del NSC-24. Se deriva de la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizado por su significativa actividad en los macrófagos. El mismo autor (5) añade el Glucan también se encuentra en otros alimentos como la cebada, avena y en algunos hongos medicinales. Sin embargo, estos glucanes no tienen las mismas características físicas y estructurales como en el  $\beta$ -Glucan de la levadura, las cuales son necesarias para la activación en el sistema inmune.

Está demostrado, el  $\beta$ -Glucan es el gran activador de las células macrófitas que se encargan de englobar, y destruir cuerpos extraños en un organismo. La composición química del producto a evaluar contiene los  $\beta$ -Glucanes 1,3 y 1,6 derivados de la pared celular de la levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae*, tiene un alto grado de actividad. (Tabla 1). Esta levadura es primaria, manufacturada del stock de melaza. La fabrica está localizada en Tuluá, Colombia. Este producto no es fermentado por un organismo

Tabla 1. Composición química del  $\beta$ -glucan.

---

Especificaciones	
Forma física	Caudal de energía libre
Color	Amarillo tostado
Nitrógeno	1% máximo
Ceniza	5% máximo
Humedad	8% máximo
$\beta$ -glucan	60-65% de actividad
Lípidos	10-30%

---

Levaplan (1999) (comunicación personal)

manipulado genéticamente, se utiliza como nutracéutico, como alimento animal, y en Acuicultura.

**4.7.3 Efectos del  $\beta$ -glucan.** Se ha utilizado en la salud humana. Vitanet Health Foods (1999), citado por Clark (1999, 2) informa que las tecnologías se proyectaron para conseguir  $\beta$ -glucan altamente purificado, un polisacárido, en donde ni las proteínas ni las endotoxinas de la levadura puedan causar reacciones en las personas alérgicas a esta. Este producto se lo está utilizando como un suplemento nutricional oral y recibió el estatus de la "GRAS", (Reconocido Generalmente como Seguro), permitiéndole ser categorizado como el aditivo alimenticio más común.

El  $\beta$ -glucan protege al cuerpo contra cualquier tipo de radiación, contra el cáncer, rayos x, lluvia ácida, y como filtros del computador. Su función es trabajar protegiendo el sistema inmune, estimulando a la médula espinal en la producción de células sanguíneas, así mismo actúa en la regeneración de tejidos dañados. Se ha prescrito a pacientes terminales de SIDA en donde los resultados fueron halagadores, pues las células T sobrevivieron y lograron comunicarse con el resto del sistema inmune, alertándolo sobre la presencia del virus VIH. Actualmente al  $\beta$ -glucan se lo tiene como un descubrimiento prometedor, porque responde como un poderoso activador del sistema inmune en el evento de ser atacado por virus, bacterias, hongos, parásitos o radiación. Clark (3) dice el  $\beta$ -glucan fue confrontado con tres de las drogas de mejor inmune-estimulación en el Japón, las cuales se utilizan generalmente como agentes profilácticos o en la quimioterapia del cáncer. Una vez más el  $\beta$ -glucan probó ser mejor inmuno - estimulante y no producir toxicidad. También se lo

comparó con un componente de la Aloe vera, (Sábila), siendo el  $\beta$ -glucan cien veces mas efectivo.

Otras de las propiedades de este producto es bajar el colesterol y triglicérido, y se obtiene mejores resultados si se combina con drogas o nutrientes . Existe una patente en Estados Unidos sobre la habilidad del  $\beta$ -glucan y el Niacin para bajar el colesterol. Tiene atributos antioxidantes, reconocidos en experimentos llevados a cabo en el Instituto de Radio- biología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos, en el cual se dieron dosis letales de radiación gama a ratas y se les suministro  $\beta$ -glucan en forma oral diariamente por un periodo de 20 días, después de la radiación se encontró que el 90 % de las ratas fueron protegidas.

Después de todas estas experiencias se demostraron algunos mecanismos de protección del  $\beta$ -glucan como el proteger a los macrófagos del daño de radiación inducida por radicales libres. (Clark, 4).

Los macrófagos están capacitados para ayudar a sacar los desperdicios o residuos celulares y restos ocasionados por alta radiación. La actividad de los macrófagos continua vigilante para defender al hospedador contra infecciones oportunistas potenciales. Las células macrófagos liberan factores importantes para la restauración de la médula espinal. Cabe anotar que cuando se administra una sola dosis de  $\beta$ -glucan, la actividad de los macrófagos dura 72

horas, al cabo de las cuales el nivel de actividad regresa a su estado anterior.

El  $\beta$ -glucan, es el "start" de los macrófagos. (Clark 4).

En conclusión a nivel humano, el mismo autor afirma las aplicaciones del  $\beta$ -Glucan son amplias, en el cáncer, SIDA, síndromes viral, bacterial, o fungido, e infecciones parasitarias y otras enfermedades de inmunodeficiencia, protege de la radiación, es utilizado como preventivo y en el tratamiento del resfriado común.

En Peces el  $\beta$ -glucan ha sido utilizado para combatir enfermedades, sobretodo en salmónidos obteniéndose muy buenos resultados.<sup>(1)</sup>

En el cultivo de camarones en el Ecuador, el  $\beta$ -glucan se ha utilizado en otras presentaciones como el BPL y el BAB. Cabezas y Llanos (1997,2) dicen que el  $\beta$ -glucan BPL en los laboratorios de post-larvas mejora la salud, el crecimiento, la conversión alimenticia y disminuye el tiempo para cosechar los camarones durante el periodo de engorde. Estos fueron los resultados de ensayos realizados en 1996 con el fin de obtener "larvas de calidad". También se utilizaron baños de inmersión y a su vez se suministró el inmuno-estimulante en la dieta y transporte de larvas y post-larvas. El  $\beta$ -glucan BAB combinado con el BPL produce un considerable incremento en la productividad, y el peso; además disminuye la mortalidad y periodo de cultivo.

**4.7.4 Vías de administración y dosis utilizadas.** Clark (6) manifiesta, las dosis usadas en humanos consisten en una cápsula diaria y a nivel oral. Las dosis utilizadas en peces son del 2 al 6%, las cuales se incorpora al alimento con la finalidad de combatir patógenos en general.

Cabezas y Llanos (3) afirman en dietas para camarones se utilizan 2,0 kilogramos por cada tonelada de alimento y, cuando se trata de baños 1,0 litro de  $\beta$ -glucan BPL por millar de larvas proporcionándoles buena calidad. Este glucano también se utiliza para transportar a razón de 1,0 litro por m<sup>3</sup>.

## 5. DISEÑO METODOLOGICO

---

<sup>1</sup> LOPEZ, Jorge Nelson, Universidad de Nariño, Tokio Japón 1999 (Comunicación personal)

## 5.1 LOCALIZACION

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de la Estación Experimental de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Nariño, ubicada en el Barrio Obrero en la ciudad de San Andrés de Tumaco; el municipio de Tumaco se encuentra al sur occidente del departamento de Nariño, en la Costa Pacífica, formando parte de la zona de subducción entre la placa oceánica (Nazca) y la continental (Suramericana).

La Ensenada está delimitada por las latitudes  $1^{\circ} 45' 0''$  y  $2^{\circ} 00' 0''$  Norte y longitudes  $78^{\circ} 30' 0''$  y  $78^{\circ} 45' 0''$  oeste; presenta forma alargada de norte a sur con una área aproximada de  $350 \text{ km}^2$ , según Mosquera (1995,12). (Figura 5). La temperatura media de  $26,5^{\circ} \text{ C}$ , precipitación de  $4.661,4 \text{ mm}$ , humedad relativa de  $82,8\%$  y una altitud de  $2,0 \text{ msnm}$  la zona de vida corresponde al Bosque Húmedo Tropical. ( Holdridge) de acuerdo con IDEAM (2001, 5).

Figura 5. Localización geográfica San Andrés de Tumaco  
Peña (1994) citado por Mosquera (1995, 10).

## 5.3 INSTALACIONES, EQUIPOS Y UTENSILIOS

El hatchery de la Estación Experimental de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Nariño de la Costa Pacífica, está provisto de una cubierta de eternit y se encuentra dividido internamente en tres zonas (Figuras 6 y 7), así:

- Zona para reproducción de organismos, conformada por dos tanques circulares con dos metros de diámetro, capacidad para tres toneladas cada uno, y dos incubadoras wynarovich.
- Zona de alevinaje, provista de seis piletas rectangulares en cemento con 2,50 metros de largo por 60 metros de ancho con una altura de 50 metros cada una.
- Zona de producción de alimento vivo, posee un sistema de bombeo, aireación, filtrado y reservorio.

Cada una de estas zonas que conforman el hatchery tiene seis metros de ancho por 12 metros de largo, y están rodeadas por ventanales para iluminación.

Se utilizaron 12 tanques circulares de plástico con capacidad de 1.000 litros cada uno. Los tanques fueron provistos de inyección de aire y suministro de agua marina.



Figura 6. Hatchery Universidad de Nariño – San Andrés de Tumaco.

Figura 7. Instalaciones internas hatchery - Tanques de Cultivo.

La estación cuenta con un reservorio de 12.000 litros de almacenamiento, mediante el bombeo en cada ciclo mareal para un total de dos bombeos diarios.

Para realizar la fase experimental se utilizaron los siguientes equipos y utensilios:

- Estereoscopio, para visualizar y analizar especímenes y tejidos.
- Microscopio, para visualizar y analizar especímenes y tejidos.
- Equipo Hach para análisis de aguas, modelo – kit FF- 1A.
- Oxigenómetro digital. YSI 55.
- Phmetro digital para medir el hidrogenión del agua
- Molino para la preparación de la dieta
- Tanques plásticos con capacidad de 1.000 litros para cultivo de camarones.
- Sistemas de aireación
- Piedras difusoras
- Balanza gramera precisión 0,1 g
- Regla milimétrica
- Beakers 100 – 200 – 500 ml
- Baldes plásticos 12 litros
- Pipetas de 10 ml
- Salinómetro - refractómetro
- Tanque de oxígeno pequeño
- Hieleras para transporte de muestras
- Electrobomba 1,5 HP
- Termómetro de mercurio, escala – 10° C a 150°C
- Coladores para muestreos
- Combustible
- Equipo de disección
- Chayos para muestreos

- Regulador de voltaje
- Filtros de geotextil y manga de 1  $\mu\text{m}$
- Centrifugadora para elaboración de solución vírica
- Cámara Neubauer para conteo de hemocitos
- Planta eléctrica
- Autoclave
- Pistilo para mezclar los componentes de la dieta.
- Granuladora para la dieta
- Secadora de granos

### **5.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

Se utilizaron 1.440 postlarvas de camarón *Penaeus vannamei* procedentes del laboratorio IDELPACIFICO. Las postlarvas que se evaluaron tuvieron un peso promedio de 0,01g en estadio de desarrollo PL16. El número de especímenes por tratamiento fue de 360 y por réplica 120.

### **5.4 TRATAMIENTOS**

Los diferentes tratamientos recibieron una dieta isoprotéica e isoenergética cuya formulación y fabricación se explica en el numeral 5.7.

Tratamiento T<sub>0</sub>: Las postlarvas y juveniles fueron alimentadas con una dieta del 35% de proteína y con 0 inclusión de  $\beta$ -glucan (Tabla 2).

Tratamiento T<sub>1</sub>: Se alimentaron los especímenes con una dieta con el mismo requerimiento proteico del 35%, mas 120g de  $\beta$ -glucan por cada 100 kg de alimento balanceado; que equivale al 60% de su principio activo sobre la cantidad de dos kilogramos/Ton referenciada para la obtención de larvas de calidad, según Cabezas y Llanos (1997,2) (Tabla 3).

Tratamiento T<sub>2</sub>: Se alimentó los camarones con la misma dieta experimental (35 % de proteína), mas el 150 g. de  $\beta$ -glucan por cada 100 kg de balanceado. (Tabla 4).

Tratamiento T<sub>3</sub>: Se procedió a alimentar con la misma dieta experimental (35 % de proteína), mas 180 g. de  $\beta$ -glucan por cada 100 kg., de balanceado (Tabla5)





**Tabla 3. Dietas**

**Tabla 4. Dietas**

**Tabla 5. Dietas**

## **5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO**

Se trabajó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) con cuatro tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, para un total de 12 unidades experimentales.

La unidad experimental estuvo compuesta por 120 individuos para un total de 360 postlarvas por tratamiento, utilizando la siguiente ecuación:

$Y_{ij} = M + T_i + e_{ij}$  de donde:

$Y_{ij}$  = respuesta de la  $i$ -ésima unidad experimental que recibe el  $j$ -ésimo tratamiento.

$M$  = Media

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$I$  = Repetición 1, 2 y 3

$J$  = Tratamiento 1, 2 y 3

$e_{ij}$  = Error experimental asociado y la  $i$ -ésima unidad experimental sometida al  $j$ -ésimo tratamiento.

Para la sobrevivencia, el incremento de peso, peso final, conversión alimenticia, productividad y longitud total se realizó análisis de varianza, para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos. Las pruebas que resultaron con significancia se evaluaron mediante la prueba de Tukey para reconocer el mejor tratamiento.

## 5.6 FORMULACION DE HIPOTESIS

$H_0 = M_{T_0} = M_{T_1} = M_{T_2} = M_{T_3}$  (La inclusión de los diferentes niveles de  $\beta$ -glucan en la dieta para *Penaeus vannamei* no producen diferencias estadísticas significativas en las variables biológicas evaluadas entre los tratamientos experimentales bajo condiciones de laboratorio).

$H_1 = M_{T_0} \neq M_{T_1} \neq M_{T_2} \neq M_{T_3}$  (La inclusión de los diferentes niveles de  $\beta$ -glucan en la dieta para *Penaeus vannamei* presentan por lo menos diferencia significativa en una variable biológica evaluada entre los tratamientos experimentales bajo condiciones de laboratorio).

## 5.7 ALIMENTO Y ALIMENTACION

Los camarones fueron alimentados con una dieta experimental que contenía el 35% de proteína (Anexo L), y a la cual se le adicionó como suplemento alimenticio  $\beta$ -Glucan, en diferentes dosis, (120, 150, 180 g por cada 100 kg., de alimento).

Se suministró una ración de alimento a los especímenes cinco veces al día, así: 8:00 a.m., 11:30 a.m., 3:30 p.m., 6:30 p.m., y 12:00 p.m. Durante la fase experimental según las características de cada tratamiento. Para el suministro del alimento se tuvo en cuenta el peso promedio y sobrevivencia de los

individuos, ajustados a los porcentajes de alimentación según la tabla de Sandifer (1984), citado por Gómez y Enriquez (1989,18). (Tabla 6)

Teniendo en cuenta lo recomendado por Díaz, et al (1996, 250), las materias primas se pulverizaron a un tamaño de partícula de 500  $\mu\text{m}$ . Los ingredientes se pesaron cuidadosamente empezando por los de menos peso y siguiendo en forma ascendente, a excepción del almidón de maíz.

El almidón de maíz ó maizena funcionó como material aglutinante o soporte y fue incluido en porciones, junto con cada materia prima que se mezcló. Las materias primas, incluido el  $\beta$ -glucan se mezclaron con un pistilo de mortero, esta operación se realizó manualmente por espacio de 15 minutos. La mezcla se homogenizó manualmente por un periodo de 15 minutos. Se adicionó el 45% de agua y se mezclaron los ingredientes por otros 15 minutos mas, para obtener al final una masa homogénea.

La masa fue comprimida en una granuladora con el fin de proporcionar una forma definida a manera de espagueti al atravesar un matriz de 3,0 mm de diámetro.

Tabla 6. Nivel de alimento diario para camarones (*P. Vannamei*), según el peso de los ejemplares .

<b>Semana</b>	<b>Peso (g.)</b>	<b>Nivel de alimentación % Biomasa estimado</b>
0	0.01	100
1	0.30	100
2	0.70	15
3	1.00	15
4	1.50 – 2.00	10
5	3.00	10
6	4.00	10
7	5.00	8
8	6.00	8
9	7.00	8
10	8.00	7
11	9.00	6
12	10.00	6
13	11.00	6
14	12.00	5
15	13.00	5

Sandifer 1984, Citado por Gómez y Enríquez (1989, 18)

Finalmente se secó a una temperatura de 60° C., por cuatro horas en una secadora de granos. Luego del enfriamiento, se procedió a trocearlos manualmente, para darles la longitud apropiada, Balanfarina (1990, 3) (Tabla 7).

## **5.8 PLAN DE MANEJO**

El plan sanitario se realizó mediante las siguientes prácticas. Toda la unidad se limpió con una solución de yodo al 15%, pisos paredes, ventanas, techos y lámparas. Se desinfectó la tubería de agua de mar, la tubería de aire cada 30 días.

Los tanques se limpiaron con detergente y desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 20 ppm, con el fin de mantener una buena asepsia en los animales.

Una vez limpios los tanques se procedió al llenado con agua de mar pasada por filtro de 10  $\mu\text{m}$  y se evaluaron los parámetros físico - químicos iniciales. Antes de sembrarse las postlarvas se sometieron a un periodo de aclimatación.

Estas fueron certificadas con PCR negativo (Ver anexo A), es decir no presentaron la enfermedad de la Mancha Blanca. Se midieron y se pesaron las postlarvas y se distribuyeron al azar en cantidades iguales entre los diferentes tratamientos.

Tabla 7. Tamaño del pellet recomendado para la alimentación de camarones (*P. Vannamei*) según el peso de los ejemplares .

<b>Peso (g) promedio Camarones</b>	<b>Diámetro Pellet (mm)</b>	<b>Longitud del pellet (mm)</b>
< 2,0	1,0	1,5
2,0 a 5,0	1,5	2,5
5,0 a 10,0	2,5	8,0
> 10,0	3,0	10,0

Balanfarina (1990,3)

Se practicaron actividades de manejo y control así:

**a. Actividades diarias:**

- Medición de O.D.: Se tomó este parámetro dos veces al día, a las 8:30 a.m., y a las 6:30 p.m.
- Medición de pH: Se realizó dos veces al día, 8:30 a.m. y 6:30 p.m.
- Medición de temperatura: Se tomó tres veces al día, 8:30 a.m., 2:00 p.m., y 6:30 p.m.
- Medición de salinidad: una vez diaria, a las 8:30 a.m.
- Recambios de agua: una vez diaria, a las 7: 00 a.m.
- Alimentación: Cinco veces al día, y de acuerdo con la biomasa del camarón y su condición anímica.
- Muestreo de la calidad de agua, para mantener la calidad de agua se hicieron recambios ascendentes empezando con el 20% diario hasta un 40% en la etapa final de experimentación.

**b. Actividades semanales:**

- Análisis en animales que se mueren para determinar estado de llenura y necrosis, exoesqueleto y branquias.
- Ajuste del alimento, de acuerdo con el peso vivo. Sandifer (1984), citado por Gómez y Enriquez (1989, 19) (Tabla 6).

- Pesaje y medición de la talla del 10% de la población existente en las unidades experimentales.

Los parámetros diarios de la calidad del agua se registraron con el fin de sistematizar la información y mantener un adecuado seguimiento a las condiciones de cultivo.

## **5.9 TECNICAS DE LABORATORIO Y DE CAMPO**

**5.9.1 Metodología de infección a través de solución vírica.** Según Alday (7), La solución vírica para infectar, se prepara y valora a partir de camarones *Penaeus vannamei* PCR positivo con TBE-IX (Trisbase, ácido bórico, EDTA) centrifugada a 4.000 R.P.M. durante 10 minutos. Con filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para sobrenadantes. Mantenido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta solución se elaboró en los laboratorios de CENIACUA Tumaco, la cual fue suministrada como alimento, 12 semanas después de la siembra de los ejemplares en experimentación. Martínez (1993, 83) afirma que una forma de infección segura consiste en suministrar animales enfermos a los especímenes en experimentación. (Ver anexo N)

**5.9.2 Metodología de la técnica histológica y microscopía.** Romrell (1994, 17) dice, se hacen cortes de tejido incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina (H&E), estas muestras se colocan sobre portaobjetos y se examinan con el microscopio óptico o microscopio de luz. La preparación de

los cortes histológicos se hacen así: La muestra fueron camarones enteros a los que se les inyectó solución Davidson a nivel cefalotórax y abdomen, luego se dejaron en la misma solución por 48 horas para luego pasarlos a una solución al 60% de alcohol de 90 grados, hasta la llegada al laboratorio.

- Fijación : Se utilizó formaldehído conocido también como formalina que es un reaccionante con los grupos aminos de las proteínas . Este es un buen fijador para conservar la estructura del citoplasma y del núcleo debido a su contenido proteico.
- Eliminación del fijador: Se deshidrata el tejido para ser colocado en la parafina y poderse seccionar en cortes finos para realizar la deshidratación, la muestra se debe pasar por una serie de soluciones alcohólicas de graduación creciente hasta llegar al 100 %. Después que se elimine el agua de los tejidos se agrega un líquido no acuoso como el xileno, que es miscible en parafina fundida.
- Infiltración : Se infiltra la parafina líquida en el tejido y se la deja enfriar y endurecer. Luego se empareja para formar un bloque mas o menos cuboide o taco.
- Cortes : El taco se coloca en una máquina cortadora o micrótomo para obtener así los cortes del tejido. Luego estos cortes se colocan sobre un

portaobjetos al que se le agrega previamente una pequeña cantidad de albúmina para que actúe como adhesivo.

- Eliminación de parafina: Se eliminará la parafina con un solvente orgánico como el xileno.
- Rehidratación : La muestra se rehidrató haciéndola pasar por una serie de soluciones alcohólicas de graduación decreciente hasta llegar al agua.
- Teñido : La muestra se coloreó con hematoxilina y eosina (H&E).
- Preparado permanente: El corte histológico teñido debe deshidratarse de nuevo con alcoholes y se protege con un cubreobjetos, previamente se coloca en un medio de montaje no acuoso.
- Microscopía : Cuando se seca el medio de montaje la muestra ya está lista para examinarse bajo el microscopio.

Estos análisis se realizaron en los laboratorios de CENIACUA – Cartagena (INVEMAR).

**5.9.3 Metodología del P.C.R.** El análisis de P.C.R., ó Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los pleópodos del camarón se tomaron como muestra los cuales

fueron conservados en solución Davidson en tubos de épeson hasta la llegada al laboratorio de CENIACUA. Esta es una de las pruebas mas acertadas para confirmar la infección por el WSSV. Consiste en tener el ADN del WSSV y tomar una pequeña porción del ADN del camarón, amplificarlo a millones de veces, pues la cantidad de virus a encontrar es muy mínima, luego por temperatura se separan las cadenas, adicionando una secuencia, es decir una cadena complementaria a la cadena original, (esta secuencia es llamada primers), estos primers se colocan a los extremos, cumpliendo la función de ladrillos, agregándole DNPT, una enzima llamada Tapolimerasa para realizar la amplificación, dando origen a nuevas cadenas. La P.C.R. tiene tres pasos así:

1. Denaturación: Cuando se abren las cadenas.
2. Anillaje: Cuando los Primers se sitúan en las cadenas originales para crear las complementarias.
3. Amplificación: La Tapolimerasa comienza a amplificar el ADN.

Luego se realiza una electroforesis del ADN, de donde por peso molecular van a emigrar de una corriente negativa (-) a una positiva (+) y se evidencian con ultravioleta (UV). Siendo positivos los enfermos. Estos análisis se realizaron en los laboratorios de CENIACUA - Tumaco. (Figura 8)

Figura 8. Análisis Polimerización Reacción en Cadena - PCR

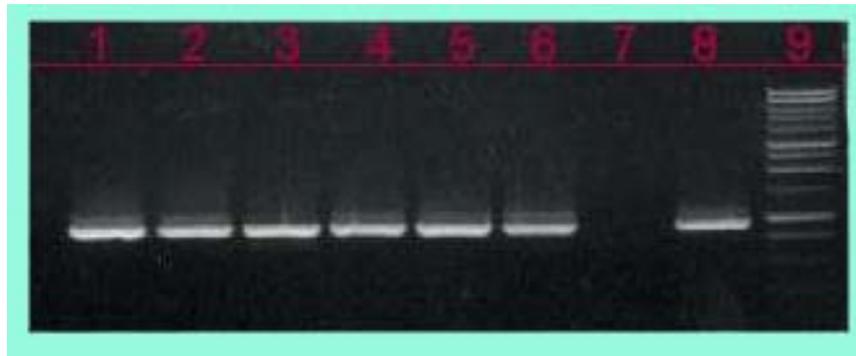


Figura 8. Análisis de Reacción de la Polimerización en Cadena - PCR

**5.9.4 Metodología del hemograma.** Para la realización del conteo de hemocitos se deben realizar los siguientes pasos:

- Toma de la muestra de hemolinfa: Se utilizaron Jeringuillas de 1ml., (de insulina), la aguja se introduce cuidadosamente en el seno linfático ventral ubicado en la línea media cercana al primer par de pereiópodos de camarones vivos.

- Fijación de la muestra: La hemolinfa (0.15 cm<sup>3</sup>) se depositó en tubos capilares que contenían previamente heparina para evitar la coagulación. Posteriormente los tubos fueron sellados con parafina en ambos extremos.
- Transporte de la muestra: Se realizó el embalaje utilizando cajas de icopor, la muestra se protegió dentro de un tarro plástico de color negro el cual se cubrió con hielo seco, para mantenerlo refrigerado (4 °C).
- En el laboratorio de microbiología se procedió a realizar el conteo utilizando la cámara de Newbauer, (Hemocitometro).

## 5.10 VARIABLES EVALUADAS

**5.10.1 Sobrevivencia.** Se determinó por la diferencia poblacional del número inicial de postlarvas y la mortalidad obtenida durante el tiempo de experimentación.

**5.10.2 Incremento de longitud.** Se obtuvo por la diferencia entre la longitud total final y la longitud inicial de la post-larva; aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta L = L_f - L_i$$

**5.10.3 Incremento de peso y peso final.** Se obtuvo por la diferencia del peso final y el peso inicial de la postlarva, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta W = W_f - W_i$$

**5.10.4 Conversión alimenticia.** Se calculó teniendo en cuenta la relación entre el alimento suministrado y el peso obtenido al finalizar la fase experimental. Es decir es la cantidad de alimento que se necesita para obtener una unidad de peso. Aplicando la siguiente relación:

$$C. A. = \text{Alimento suministrado} \div \text{Peso ganado}$$

**5.10.5 Hemograma.** Se evaluó el número y proporción de hemocitos expresados en millones de células/ml; con cámara de Neubauer y la fórmula hemocitaria será en porcentajes de tipos hemocitarios.

**5.10.6 Histopatología.** Se valoró el proceso histotecnológico a través de cortes de tejidos, preparación de los mismos y lectura microscópica.

## **5.11 ANÁLISIS PARCIAL DE COSTOS**

Para determinar los costos parciales se tuvo en cuenta los costos variables de post-larvas de camarón, el alimento empleado, la inclusión de  $\beta$ -glucan y materiales desinfectantes. Así mismo se calculó el ingreso bruto, ingreso neto y se aplicó la relación costo / beneficio en el cultivo comercial.

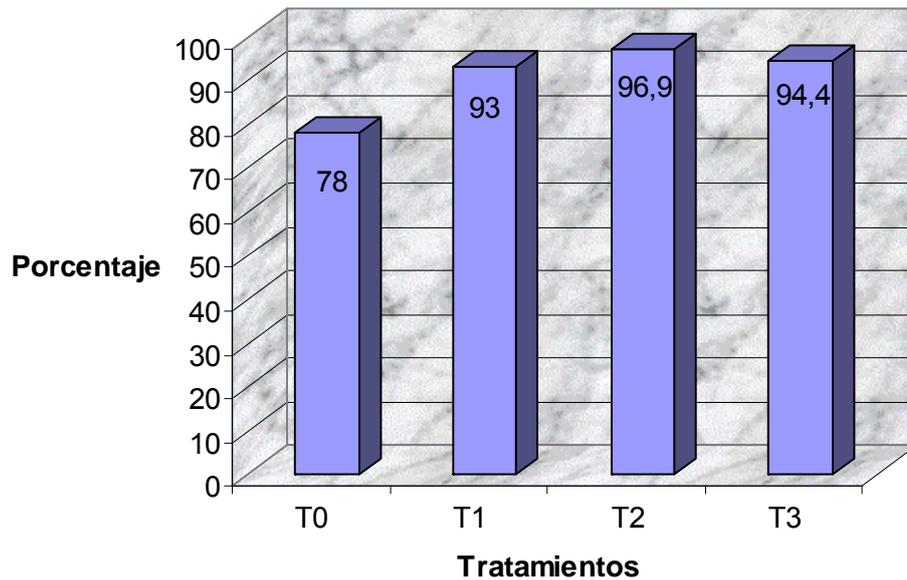
## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 SOBREVIVENCIA**

El parámetro de sobrevivencia se evaluó en dos periodos definidos así: el primero como el periodo pre-infección y el segundo momento post-infeccion con el virus de la Mancha Blanca, de tal manera que fue posible observar

el efecto del  $\beta$  - glucan sobre la sobrevivencia a lo largo de 15 semanas del cultivo experimental. La primera fase comprendió desde la siembra hasta las 12 semanas y al final de esta se procedió a infectar los animales vía oral mediante la ingestión de una papilla con tejidos de camarón infectado con WSSV. Los efectos observados fueron los siguientes:

**6.1.1 Sobrevivencia hasta las 12 semanas de cultivo (Pre-infección).** Las sobrevivencias obtenidas antes de inocular los ejemplares con WSSV fueron: para el Testigo (T0) el 78 %; T1, 93 %; T2, 96.9 % y el T3, 94.4 % (Figura 9.). El resultado anterior es superior a lo encontrado por Cedeño et al (2000) quien evaluó diferentes niveles de inclusión de  $\beta$ -glucan en la dieta (0.1 a 1 g / 100 Kg. de alimento), con sobrevivencias de 50 % para larvas y 58% para juveniles.



**Figura 9. Supervivencia pre-infección de camarones *Litopenaeus vannamei*, alimentados con tres niveles de B-glucan como inmuno-estimulante.**

Mediante el análisis de varianza, se demostró existe diferencia estadística al comparar los porcentajes de supervivencia en respuesta a los tratamientos experimentales, (ver anexo B). Al aplicar la prueba de Tukey se encontró que al adicionar 120, 150 y 180 gramos de  $\beta$ -glucan por cada 100 kilogramos de alimento en T1, T2 y T3 respectivamente producen los mismos efectos en

cuanto a sobrevivencia; no obstante existe diferencia significativa entre T0 frente a los tratados con  $\beta$ - glucan en la dieta (T1, T2 y T3). Las sobrevivencias de los tratamientos T1, T2 y T3 superaron en: 15 %, 18,9 % y 16,4 % respectivamente a la obtenida en el T0 (testigo) produciendo efectos positivos en la productividad.

La sobrevivencia es la resultante de un gran numero de variables; entre estas podemos mencionar : La calidad de la larva, técnicas para aclimatación, tipo y cantidad de alimento, condiciones del agua durante el cultivo, agentes patógenos y parásitos en el cautiverio, manejo acertado o no y predadores como fauna acompañante durante el engorde, entre otros. En el presente experimento los procesos señalados se uniformizaron y monitorearon constantemente; por esta razón las diferentes cantidades de  $\beta$ -glucan adicionado al alimento suministrado se constituyen en la única fuente de variación.

Respecto a la mortalidad se observa lo siguiente:

En el periodo preinfección se obtienen mortalidades clasificadas como bajas, pero al terminar el periodo post - infección a los veinte y uno días los datos para T0 100%; T1, 13,73%, T2, 12,32%; y T3, 17,94%.

Respecto a la larva esta fue adquirida en el laboratorio (CRIPROMAR), del mismo batch de producción y en estadio PL 16, (Anexo C), presentó optimas

condiciones de calidad; tamaño uniforme, activa para consumir alimento y libre de WSSV confirmado mediante PCR negativo, (Anexo A).

En cuanto a las condiciones ambientales, la tabla 8 indica la calidad del agua en el estero Palmichal que surtió el hatchery, estos parámetros están en los rangos óptimos para el cultivo de camarones peneidos; las variaciones en cuanto a: Oxígeno disuelto, pH, Temperatura y salinidad durante el ciclo experimental indicaron un comportamiento normal y adecuado para el engorde de estos crustáceos, siendo un factor no limitante para el normal desarrollo de los ejemplares. En la figura 10 se observan las variaciones.

Las concentraciones de oxígeno disuelto fueron altas y constantes en el cultivo, el cual se mantuvo a saturación gracias a los sistemas de aireación artificial instalados en cada tanque, los cuales fueron acondicionados con piedras difusoras para disminuir el tamaño de la burbuja y así incrementar la difusión del oxígeno en el medio líquido.

Tabla 8. Valores de los parámetros físico-químicos del agua del estero palmichal, para el cultivo de camarones (*Litopenaeus*) alimentados con  $\beta$ -glucan.



ITEM	VALOR PROMEDIO ENCONTRADO	RANGO OPTIMO *
Temperatura °C	25,8	23 – 30
Oxigeno disuelto mg/lit	7,8	6,0 – 10,0
Salinidad ppt	14,6	15 – 27
pH	8,3	8,1 – 9,0
Amonio total mg/lit	0,3	0,1 - 1,0
Nitritos mg/lit	0,3	< 0,5
Nitratos mg/lit	0,4	0,4 – 0,8
Amonio no inozado (NH <sub>3</sub> ) mg/lit.	0,02	< 0,1

\* Zendejas Hernández Jesús (10, 1999).

Figura 10. Variaciones de oxígeno disuelto, salinidad y temperatura.

El nivel promedio para este parámetro fue de 7,8 mg/lit, con niveles históricos máximos de 8,63 y 6,73 mg/lit; de tal manera que su concentración, esta acorde con lo reportado por Zendejas, J. (12, 1999).

El pH presentó niveles constantes y mantuvo en promedio 8,3 con valores máximos y mínimos de 8,5 y 8,0 respectivamente durante el periodo experimental. Este parámetro garantizó en buena medida mantener bajas concentraciones de amonio no ionizado ( $\text{NH}_3$ ), el cual pudo constituirse en el único factor tóxico riesgoso, en razón a la alta densidad de animales en las

unidades experimentales y el alto contenido proteico en la dieta (35%). Sin embargo como se indica en la Tabla 8, la concentración amoniacal se mantuvo en niveles permisibles y la calidad del agua es el resultado del manejo eficiente por los recambios diarios (20 – 40% en cada tanque) y la actividad para la remoción en las heces fecales por el sifoneo.

Respecto a la salinidad por haberse alimentado el hatchery con aguas estuarinas, la salinidad es moderada (Mesohalina) y presentó un valor promedio de 14,6 partes por mil (ppt), con niveles máximos y mínimos de 15,4 y 14,0 ppt. respectivamente. La cual es considerada como agua salobre y está dentro del rango óptimo para el cultivo de estos crustáceos que va de 15 a 27 ppt. Zendejas, J. (12).

La temperatura del agua se mantuvo con un valor promedio de 25,8 °C, y experimento descensos hasta 24,8 °C y temperaturas máximas de 26,9 °C, en suma una variación de 2°C que es un factor no limitante teniendo en cuenta que dicha variación no corresponde a un periodo diario sino a lo largo del ciclo experimental, de todas maneras esta dentro del rango óptimo para el cultivo según lo encontrado por Zendejas, J (7). Tabla 8.

Por lo expuesto las respuestas observadas en cuanto a sobrevivencia se deben al efecto del  $\beta$ -glucan suministrado, dado que el manejo que se aplicó

a las unidades experimentales fue igual y la fuente de agua corresponde al mismo estero para todos los tanques.

En conclusión los resultados en cuanto a sobrevivencia indican que se supera ampliamente los promedios reportados en la zona para el año 1997 por CENIACUA (1998). De igual manera la sobrevivencia de los tratamientos experimentales a nivel de laboratorio superan los resultados obtenidos por: ACUANAL (1992), Oliva y Bados (1993), Cabrera y Santacruz (1993), Marinovich y Eraso (1996), Quintero (1998) y Tello (1999) en cultivos semi-intensivos de camarones en la zona de Tumaco.

La sobrevivencia de los tratamientos T1, T2 y T3 como resultante final de las interacciones anotadas, dejan en evidencia el efecto positivo del  $\beta$ -glucan en la dieta; es posible que tenga una función inmunoestimulante, al activar mecanismos de defensa con los cuales sea posible responder a patologías de diverso origen y variable intensidad que se dieron durante el cultivo y que ocasionaron los diferentes resultados en este parámetro.

De otra parte el  $\beta$ -glucan podría intervenir en la activación del mecanismo químico a nivel de células hemocitarias semi-granulosas como lo indican algunos autores; esto consiste en liberar gránulos de las células por

exocitosis este estímulo desencadena una reacción enzimática muy compleja (Cascada PO), la cual tiene como producto final la producción de melanina con efectos inmunológicos en invertebrados.

De todas maneras aun no se ha esclarecido como esta excitación del sistema inmunitario se traduce luego en un estado de alerta a largo plazo (inmuno-estimulación), con un efecto protector contra los microorganismos patógenos, sin embargo varios autores han mostrado evidencia de protección contra vibrios (Sung, et al.; 1994) y virus (Takahashi, et al., 1997). Este ultimo trabajo demostró que un gran porcentaje de los animales estimulados sobrevivieron a la infección y dieron resultados negativos para WSSV, evidenciando una capacidad en el camarón inmuno-estimulado de evitar la infección. Citados por Cedeño R. et al (2,1999).

Los resultados encontrados en esta investigación son confirmados por los mismos autores quienes encontraron que dosis bajas de  $\beta$ -glucan en la dieta producen efectos positivos en los sistemas inmunológicos de los camarones (*Litopenaeus*) y generan los niveles mas altos de actividad PO, confirmando que el mayor índice inmunitario global se registra en los animales que recibieron inmuno-estimulante en la dieta.

**6.1.2 Sobrevivencia post-infección - Semana 12 a 15 de cultivo:** Al final de la semana 12 (25 de abril 2001) se suministro papilla de camarón

infectado con WSSV a razón del 3 % de la biomasa en dos raciones diarias durante dos días consecutivos. Los resultados para los tratamientos experimentales se analizaron teniendo en cuenta los siguientes aspectos: El tiempo requerido para la manifestación de los primeros signos clínicos de la enfermedad, la intensidad de la mortalidad y la sobrevivencia final durante las tres semanas post infección. Además se evaluó el tipo de daño a nivel histológico y la presencia del virus mediante la prueba de PCR para cada tratamiento.

En cuanto a la presentación de los primeros síntomas clínicos se observó que tres días después de infectados los ejemplares ocurren las primeras mortalidades en el tratamiento T0 y a partir del quinto día en los demás tratamientos experimentales como se indica en la figura 11, no obstante el T0 (Testigo) presentó la mortalidad más alta, diez veces mayor que los tratamientos que tenían  $\beta$ -glucan en la dieta. Este comportamiento se mantuvo durante los 17 días siguientes ocasionando la mortalidad total de



### Figura11

los ejemplares del T0 a diferencia del T1 que presento en esta fecha una sobrevivencia de 18,8 %; T2, 13,46 %; y el T3 tuvo una sobrevivencia final de 27.3 % como se observa en la figura 12.

Entre los síntomas típicos de esta enfermedad se observó en el segundo día post- ingestión de la papilla infectada con WSSV, una abundante producción de heces fecales, anorexia, letargia, coloración rojiza en los bordes del telson debida a la expansión de los cromatóforos cuticulares, natación en la superficie, coloración blanquecina en todo el cefalotórax y en el abdomen lo cual indicó un efecto sobre el sistema digestivo, al final los camarones se localizaban en el fondo del tanque y sin otros movimientos morían. (Figura 13).

Los síntomas anotados corresponden a lo observado por Chamberlain (6), pero en la experiencia no fue posible observar puntos blancos en la cutícula del caparazón entre el 5 y 6 segmento abdominal. Este signo macro solo se ha presentado en los *Penaeus* en Tailandia, y no en los *vannamei*. Según Alday (1999, 2), los signos clínicos iniciales de comportamiento del WSSV son muy comunes para otras patologías, y en ocasiones impide realizar el diagnóstico correcto. Se puede confirmar la infección del WSSV con un análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa o P.C.R.

Chamberlain (7) encontró que los camarones con estos síntomas típicamente han tenido altos porcentajes en mortalidad alcanzando el ciento por ciento entre

los tres a diez días después de presentados los síntomas. Esto está acorde con los resultados mostrados en T0, no obstante los tratamientos con  $\beta$ -glucan en la dieta se apartan de este, resultado pues como ya se dijo sobrevivieron 21 días después de la ingestión de tejidos infectados con el virus de la Mancha Blanca. Se puede explicar por los efectos positivos en cuanto a respuesta inmune presentada por los ejemplares frente a este virus.

La figura 11 indica la población diaria en cada tratamiento en donde la sobrevivencia final para los tratamientos experimentales fueron: 0% para el T0; 13,73 % para T1; 12,32 % para T2 y 17,94 % para T3. El análisis estadístico utilizando la prueba de X<sup>2</sup> (Fisher) con datos ordenados de dos clases; se encontró que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos experimentales (Anexo Ñ), encontrándose que los mejores tratamientos son los que recibieron  $\beta$ -glucan en la dieta en comparación al testigo. Sin embargo no existe diferencia entre ellos (niveles de  $\beta$ -glucan). No obstante los efectos económicos que representa una mayor sobrevivencia son importantes puesto que inciden en mayores ganancias; así el T3 supera en 4,0 % en sobrevivencia al T1 y en 5,6 % con respecto al T2.

El efecto positivo del inmuno-estimulante ( $\beta$ -glucan) sobre la resistencia a las enfermedades es posible en dos efectos aditivos en la respuesta inmune; de una parte fortalece la resistencia al agente patógeno en este caso frente al virus de la mancha blanca y de otra parte, mejora la resistencia a bacterias oportunistas que podrían hacer mas susceptible a los ejemplares al ataque

del virus evitando así el desencadenamiento de esta enfermedad, o disminuyendo su intensidad (virulencia). De esta manera el efecto de utilizar este inmuno-estimulante en la dieta, produjo una reacción tardía en cuanto a mortalidad pues los efectos del virus posiblemente no fueron tan intensos porque mas del 12% de los animales sobrevivieron a esta patología.

En este sentido, el  $\beta$ -glucan no siempre parece desarrollar una respuesta inmune en la gran mayoría de los ejemplares, pero se observa que la intensidad de la infección es menos severa y se retarda en el tiempo la presencia de los síntomas. Este aspecto reviste especial importancia para el camaronicultor quien al evidenciar el problema sanitario dispone de herramientas como cosecha TEMPRANA asegurando así obtención de alta biomasa, porque los niveles de incidencia de la enfermedad se atenúan en virulencia y permiten recuperar mayor número de animales sembrados, y no como ocurre actualmente que dado el rápido desencadenamiento de la enfermedad solo se cosechan bajas poblaciones, (5 – 10 %) de siembra dado lo explosivo de la mortalidad en condiciones normales de cultivo y alimentación. Esto redundaría en la recuperación de mayores recursos económicos para el inversionista.

Las condiciones de cultivo en acuicultura producen diversos niveles estresantes, desencadenando infecciones oportunistas en los ejemplares cultivados sin sintomatología clínica. En estas condiciones el  $\beta$ -glucan ejerce en el manejo un efecto positivo por fortalecer los mecanismos de defensa en

cuanto a su respuesta inmune, mejorando la sobrevivencia al controlar indirectamente los patógenos oportunistas presentes en la producción camaronera.

**6.1.3 Resultados histopatológicos, prueba P.C.R. y hemograma.** Los cambios histológicos presentan evidentes inclusiones de cuerpos intranucleares en el núcleo hipertrofiado, como se indica en la figura 14, en las células epiteliales y cuticulares, en los animales positivos al PCR.

Los resultados obtenidos mediante el análisis histopatológico realizado por CENIACUA (Anexo D), fueron los siguientes:

Tratamiento 0 : La vacuolización del hepatopancreas baja, presentó un promedio de 2,5 indicando bajo consumo de alimento, con atrofia en este mismo órgano. El 100% de los ejemplares mostró lesiones típicas del WSSV, con grado 4.

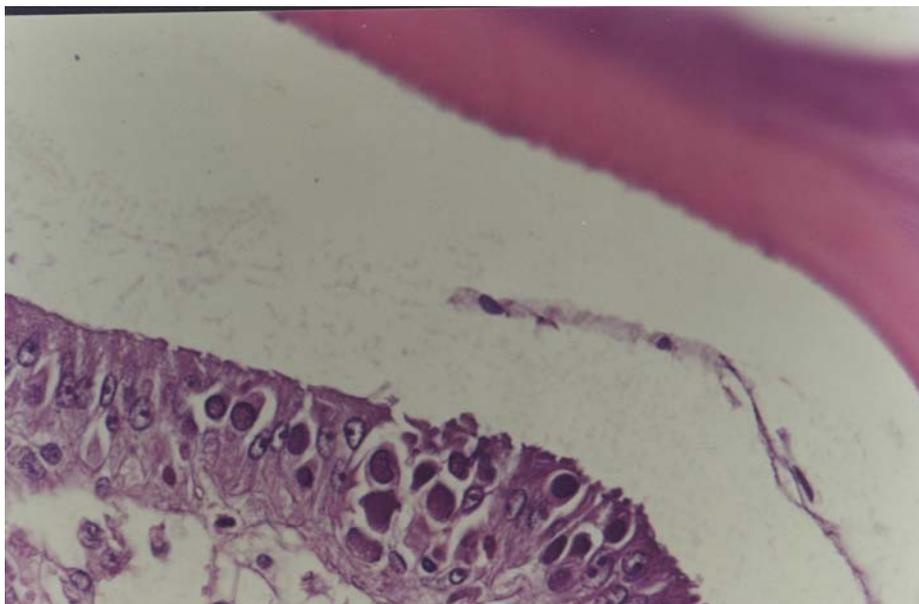


Figura 14. Inclusiones de cuerpos intranucleares causadas por WSSV .

Tratamiento 1: La vacuolización del hepatopancreas se encontraba baja e indica que el camarón no estaba consumiendo alimento, el hepatopancreas estaba inflamado, posiblemente por una infección bacteriana leve. Se observaron lesiones típicas del WSSV en el 75% de los especímenes analizados con grado 2.

Tratamiento 2 : Baja vacuolización en el hepatopaneas, es decir los animales no estaban consumiendo el alimento, igualmente con este mismo órgano atrofiado, no se encontraron lesiones típicas de WSSV.

Tratamiento 3 : Presenta baja vacuolización del hepatopaneas, y atrofia de este órgano, con enteritis hemocítica en el 50% de la población examinada. Esto puede ser causado por bacterias gram negativas y/o toxinas producidas por algas. Se observaron lesiones típicas de WSSV en el 50% de la población con grado 1,5.

El análisis mediante la prueba P.C.R reportó resultados positivos, por detectar en las muestras analizadas la presencia del virus de la mancha blanca en todos los tratamientos experimentales (Ver anexo E).

El conteo de hemocitos (Anexo F) indicó la presencia de células semi-granulosas en todos los tratamientos; no obstante el numero de los mismos en cada tratamiento presentó gran disparidad encontrándose valores de 3 a 79 células para el T0; entre 45 y 217 en T1; 238 para el T2 y valor de 1 para el T3. Con esta información no fue posible encontrar una relación o un tipo de respuesta referente al número de las mismas, respecto a los niveles de  $\beta$ -glucan en la dieta. De otra parte la técnica aun no estandarizada en Colombia no hace posible concluir sobre este aspecto inmunológico, pues los resultados encontrados podrían servir de referencia para futuras investigaciones.

En síntesis los resultados obtenidos mediante las pruebas de Histopatología y P.C.R., reafirman el posible efecto positivo del  $\beta$ -glucan puesto que si bien todos los ejemplares fueron positivos a PCR, las lesiones a nivel histológico más severas (Grado 4) fueron encontradas en el T0, en tanto que los animales que recibieron el inmuno-estimulante presentaron lesiones leves grado 2 a 1.5 (T1 y T3) y no se presentaron en el T2, lo cual tuvo consecuencias directas sobre la sobrevivencia como ya se dijo tanto en los periodos pre post-infección.

## **6.2 COMPARACIÓN DE LOS INCREMENTOS DE PESO**

El análisis de crecimiento de los camarones se debe desarrollar teniendo en cuenta dos aspectos; por un lado el incremento de peso semanal, que indica el comportamiento de los camarones a lo largo de todo el ciclo de cultivo, y por otro haciendo referencia al peso final, parámetro que reviste importancia puesto que de este depende el precio comercial alcanzando altos valores cuanto mayor peso se logre al momento de la cosecha.

Respecto al incremento semanal de peso se obtienen las siguientes novedades: para el Tratamiento testigo (T0) fue de 0,96 gramos en promedio; el T1 0,99 gramos, T2 1,03 gramos y para el T3 1,05 gramos de crecimiento semanal promedio durante todo el cultivo (Figura 15). Al realizar el análisis de varianza para este parámetro (Anexo G), se encontró que existe diferencia estadística entre los tratamientos experimentales.

La prueba de Tukey presentó que existe diferencia estadística significativa entre T2 y T3, y altamente significativa entre T0 y los demás tratamientos; por lo tanto se identifica el T3 y T2 como los mejores resultados respecto a este parámetro zootécnico. El efecto sumatorio de esta característica redundó no solo en mayores pesos finales, sino que mejora el desempeño en conversión y biomasa final cosechada, indicando un posible beneficio por incluir  $\beta$ -glucan en la dieta.

Los resultados obtenidos en incremento de peso para los tratamientos experimentales son superiores a los reportados por CENICACUA (1998) en algunas camaroneras comerciales ubicadas en la zona; estas presentaron un incremento promedio que oscilaba entre 0,8 a 0,77 gramos según época del año, los resultados superan los obtenidos por Oliva y Bados (1993) de 0,9 a

0,81 gramos en camarones alimentados con diferentes niveles de proteína. Sin embargo son iguales a los reportados por CENIACUA en camaroneras locales para 1994, con un promedio de incremento semanal para la zona de 0,9 (+/- 0,03) gramos, así mismo son iguales a los reportados por Rodríguez y Camuez (1997) quienes utilizaron torta de palmiste como fertilizante orgánico para el engorde de camarones en cautiverio. Lo anterior demuestra que los rendimientos en cuanto al peso final se ajustan a los obtenidos por otros proyectos en la zona y están acordes con lo esperado para esta especie bajo condiciones ambientales de la costa pacífica colombiana.

Respecto al peso final los resultados en los tratamientos fueron: para el T0, 11,63 gramos; T1, 11,93 gramos; T2, 12,40 gramos y T3 con 12,63 gramos a la

cosecha. Al realizar el análisis de varianza para esta variable se encontró que existe diferencia estadística entre los tratamientos al 95% de confianza, (ver anexo H). Al realizar el contraste de medias con la prueba de Tukey, se encontró que los mejores tratamientos respecto al peso final son T3 y T2 existiendo diferencias altamente significativas al comparar el T0 con los demás tratamientos experimentales.

Estos resultados se pueden explicar en la medida en que los ligeros incrementos de peso semanales tienen un efecto aditivo a lo largo del ciclo experimental y causan al final diferencia por el efecto acumulativo.

Dado que las condiciones de manejo permanecieron iguales (densidad de siembra, recambios), se puede asumir que la única variable es la cantidad de  $\beta$ -glucan adicionada al alimento suministrado. Las cantidades más altas de  $\beta$ -glucan en el balanceado corresponden a los tratamientos T2 y T3, y presentaron pesos finales más altos, (12,4 y 12,6 gramos respectivamente), al finalizar el cultivo.

Si se compara el T3 con el T0, la diferencia es de 1 gramo de peso, lo cual incide posteriormente no solamente en la biomasa cosechada sino en el valor de venta.

Este parámetro es uno de los factores que determinan la rentabilidad por tratamiento, puesto que la sobrevivencia y los costos por alimentación juegan un papel determinante en la eficiencia económica de cada tratamiento. Sobre

esto se discute mas adelante los resultados biológicos e indican mayor ganancia y rentabilidad en el T1 y T3 respectivamente que son tratamientos con inclusión de  $\beta$ -glucan en el presente trabajo.

El efecto del  $\beta$ -glucan en el crecimiento se podría relacionar como un efecto secundario en la medida en que obtener un buen estado de salud en los ejemplares se traduce en una mejor asimilación y conversión de alimento en proteína corporal.

### **6.3 INCREMENTO EN LA LONGITUD**

La talla está relacionada con el peso y es una medida que representa el crecimiento morfométrico de los ejemplares. La figura 16 indica el incremento semanal en longitud de los camarones durante el periodo de cultivo; sin embargo esta característica fenotípica es secundaria a la luz del análisis económico, pues el valor de la producción está dado en función del peso o biomasa. Los estudios biológicos actuales exigen evaluar todos los atributos físicos que puedan reflejar cuantitativamente los efectos de los diversos factores de producción.

Las tallas finales obtenidas en los tratamientos son las siguientes: para T0, 9,0 cm; T1, 9,8 cm; T2, 9,9 cm y para el T3 10,03 cm; sin embargo el ANDEVA no indica diferencia estadística entre los tratamientos experimentales (Anexo I); se

considera que para esta característica fenotípica la utilización de  $\beta$ -glucan no afecta significativamente esta variable.

#### **6.4 CONVERSIÓN ALIMENTICIA**

El Factor de Conversión Alimenticia (FCA) se evaluó al final de las doce semanas de cultivo es decir antes de la infección con WSSV y se obtuvieron los siguientes resultados en los tratamientos: para el T0, 4,1; T1 3,8; T2 3,9; y para el T3, 3,8. Esto significa que se necesitó mucho menos alimento

para producir cada kilogramo de camarón en el T1 y T3 respecto a los demás tratamientos como se indica en la Figura 17.

Los tratamientos experimentales recibieron diferentes cantidades de balanceados durante el ciclo de cultivo, en este caso los tratamientos recibieron los siguientes suministros al T0, 13.281 gramos de alimento; T1, 14.966 gramos; T2, 16.814 gramos y T3, 16.460 gramos durante el periodo experimental de 12 semanas. Esta variación obedeció a las diferentes tasas de crecimiento y mortalidad en cada unidad experimental, puesto que la tasa alimentaria fue constante según lo recomendado por Sandifer (1984), Citado por Gómez y Enríquez (1989,18).

En cuanto a la cantidad total de balanceados consumidos: se observa que el Tratamiento testigo consumió la menor cantidad de alimento seguido por T1, T2 y T3 reportaron el mayor consumo. Estas diferencias se deben directamente a la sobrevivencia y al peso promedio de los camarones en cada tratamiento, puesto que el T3 y T2 corresponden a los tratamientos que presentaron la mayor biomasa durante la fase experimental.

Se debe tener en cuenta que en condiciones normales de cultivo, el consumo de alimento para asegurar buen crecimiento esta subsidiado por los aportes del medio natural (fito - zooplancton) en estas condiciones son comunes conversiones de 2 a 1.5 en sistemas de producción semi-intensivo.

En nuestro caso el aporte del medio fue limitado debido a los sistemas de filtración en el hatchery lo cual disminuyó el ingreso de partículas nutritivas directamente a los tanques y de otra parte al tipo de estructuras empleadas (tanques plásticos) que se constituyen en medios inertes e impiden la acumulación de sedimentos nutritivos en los fondos y limitan la productividad primaria. Además los recambios y sifoneos permitieron tener agua de calidad pero baja en productividad de fito y zooplancton por los cortos periodos de permanencia del cuerpo de agua en los recipientes experimentales.

La poca importancia dada a la alimentación que las piscinas producen naturalmente, fruto posiblemente del desconocimiento de estos delicados ecosistemas ha ocasionado que el suministro de alimento artificial se convierta en una práctica tradicional, que no tiene en cuenta la abundancia ni el alto valor nutritivo del fitoplancton y Zooplancton como alimento fundamental en la dieta de estos peneidos.

Por lo expuesto; el alimento balanceado en este caso no fue un suplemento o complemento al aporte natural sino que; es la base de la alimentación y de allí la elevada cantidad de balanceado utilizado para mantener no solo las

funciones basales metabólicas, sino que fue preciso cubrir los requerimientos adicionales que son indispensables para mantener adecuadas tasas de crecimiento y que en este caso no son aportados por el medio natural.

Al realizar el análisis de varianza para este parámetro se encontró que no existe diferencia significativa entre los tratamientos experimentales, es decir que la utilización de  $\beta$ -glucan en diferentes niveles no producen mejora en este aspecto.

No obstante; al comparar T1 y T3 con el T0 existe una diferencia de 0,3 en conversión alimenticia que se traduce en una disminución en los costos finales, puesto que se consumió menos alimento por cada unidad de peso ganado en la biomasa durante el periodo experimental.

## **6.5 ANALISIS PARCIAL DE COSTOS Y RENTABILIDAD**

Para realizar el análisis parcial de costos, se asumen como constantes los gastos por mano de obra, depreciación de instalaciones, de equipos, costos financieros y de oportunidad, puesto que afectan por igual a todos los tratamientos; en tal sentido solo se tendrán en cuenta los costos directos de producción en ellos se incluyen: Alimentos, semilla, desinfectantes y  $\beta$ -glucan.

Los costos de producción de los tratamientos experimentales se indican en el anexo J, en el que se aprecia que el mayor costo de producción hasta las 12 semanas de cultivo (pre-infección) se dio en el T0 con 9.379,6 pesos por

kilogramo de camarón producido, y el menor costo de producción por kg corresponde a T1 con 8.734,3 pesos.

Para el cálculo de la rentabilidad es preciso determinar además de los costos de producción tres ítem relacionados con este análisis económico como son: la producción total por tratamiento, el valor de la producción, la ganancia bruta y la tasa de rentabilidad final en la tabla. La tabla No. 9 se indica los factores requeridos.

En cuanto a rentabilidad el T1 presentó los mejores resultados con 59,4% seguido por el T3 y T2; el testigo evidenció el menor beneficio económico, de tal manera que se demuestra que la inclusión de  $\beta$ -glucan en la dieta produce mejores rendimientos biológicos que inciden directamente sobre los índices económicos al permitir mayor eficiencia en la utilización de los recursos físicos y monetarios invertidos hasta las 12 semanas de cultivo (Tabla 9).

La inclusión del  $\beta$ -glucan representó en el T1 el 2,9% de los costos para producción (Anexo K), pero genera ganancias en un 39,6% superiores al testigo; en el T2 el  $\beta$ -glucan representó el 3,2% de la inversión total, y genera ganancias superiores al 35,8% comparado con el T0; en T3 el  $\beta$ -glucan representó el 3,9% de los costos totales, no obstante generó ganancias superiores al 43,2% respecto al T0.

Tabla No. 9. Producción y rentabilidad de los tratamientos experimentales durante el engorde de camarón.

TRATAMIENTOS	A	B	C	D	E
T0	3,269	45.537	30.662	14.875	48.5
T1	3,998	55.692	34.920	20.772	59.4
T2	4,328	60.289	39.004	21.285	54.5
T3	4,295	59.829	38.519	21.310	55.3

A = Producción Kilogramos por tratamiento. (BIOMASA)

B = Valor de la producción

C = Costos directos de producción

D = Ganancia (  $D = (B - C)$  )

E = Rentabilidad (  $R = (D/C) * 100$  )

Precio por libra de camarón U 51-60 : 2.75 US\$/Libra (454 g.)

Cambio dólar \$ 2.300 pesos

Lo anterior justifica la inversión de  $\beta$ -glucan y dicha operación, genera un sobre costo representado entre un 3,0 a 3,9 % en los costos directos de producción; redundando en un incremento en la ganancia bruta en un 36 – 43%, debido a los óptimos rendimientos biológicos durante la fase de engorde hasta las 12 semanas.

De otra parte; el análisis de costos posterior a la infección con WSSV presentado en la tabla 10, demuestra como los tratamientos con  $\beta$ -glucan permitieron recuperar un porcentaje importante de la inversión inicial; logrando obtener en el T3 el mayor porcentaje de la inversión con un 27,8 % los costos directos de producción, en comparación con los animales infectados sin  $\beta$ -glucan en la dieta (T0), en los cuales no fue posible recuperar los recursos invertidos dada la mortalidad total de los especímenes cultivados, efecto que generalmente se produce cuando los animales son afectados por el virus de la mancha blanca.

Tabla 10. Porcentaje de recuperación de la inversión en los tratamientos experimentales post infección.

<b>Tratamiento</b>	<b>Biomasa (g)</b>	<b>Valor de la producción (\$)</b>	<b>Costo de Producción (\$)</b>	<b>Porcentaje Recuperado</b>
T0	0	0	30.662	0
T1	548,8	7.645,0	34.920	21,9
T2	533,2	7.427,5	39.004	19,0
T3	770,4	10.731,6	38.519	27,8



## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1 CONCLUSIONES

7.1.1 Los resultados obtenidos se consideran parte de un proceso exploratorio en el campo de efectos inmunoestimulantes generados por la adición de  $\beta$ -glucan a la dieta en los camarones afectados por WSSV.

7.1.2 Los problemas patológicos en la industria del camarón están despertando el interés en la inmuno-modulación como posible estrategia profiláctica para prevenir algunas infecciones virales. La inmuno-modulación ó inmuno-potenciación puede explorarse siguiendo diferentes vías, pero las más interesantes para iniciar su estudio se pueden considerar: la evaluación de los diferentes inmunoestimulantes como el  $\beta$ -glucan y el efecto de la calidad de las dietas sobre el sistema inmune.

7.1.3 Considerando que el camarón es un invertebrado y que carece de especificidad y memoria inmunitaria se hace imposible la vacunación y por el contrario la inmuno-estimulación puede ser una alternativa ante situaciones de riesgo epidemiológico como lo señalan los resultados de la presente investigación.

7.1.4 Existe un posible efecto a la sobrevivencia; cuando se adicionan 120, 150 y 180 gramos de  $\beta$ -glucan por cada 100 kilogramos de alimento (T1, T2 y T3)

respectivamente, los resultados señalaron que existe diferencia estadística significativa al compararlos con el Tratamiento testigo (T0). Las sobrevivencias de los tratamientos T1, T2 y T3 superaron en: 15 %, 18,9 % y 16,4 % respectivamente a la obtenida en el T0 (testigo) durante el periodo pre infección.

7.1.5 La infección inducida con WSSV produjo en el tratamiento testigo el mayor grado de lesiones histopatológicas clasificadas como grado 4, en comparación con el tratamiento T3, que solo evidenció lesiones histopatológicas grado 1,5 considerado bajo, en el T2 se encontraron especímenes sin ninguna lesión a este nivel. En todos los tratamientos se presentaron signos clínicos y lesiones que señalan que el sistema digestivo estuvo comprometido en la evolución de la enfermedad, reflejado esto por la baja vacuolización del hepatopancreas y en el desbordamiento de las heces fecales.

7.1.6 El mayor incremento semanal de peso se obtuvo en los tratamientos T2 (1.03 g) y T3 (1.05 g) lo cual se reflejó no solo en la obtención del mayor peso final con 12.40 y 12.63 gramos respectivamente. Estos rendimientos contribuyeron a mejorar la talla de los ejemplares; siendo T3 el que presentó mayor longitud y marcó una diferencia con el tratamiento testigo (1,03 cm) al término de la cosecha final.

7.1.7 Los tratamientos T1 y T3 presentaron la mejor conversión alimenticia (3,8) y corresponden a los tratamientos que recibieron el inmuno estimulante en la dieta. El análisis estadístico demostró que no existen diferencias entre los tratamientos experimentales; sin embargo una disminución en este factor se traduce en una disminución de los costos finales de producción y un aumento en la rentabilidad final .

7.1.8 En el período pre-infección; el Testigo fue el tratamiento mas costoso (\$ 9.379,6 pesos /Kg. de camarón) y el de menor costo el T1 (\$ 8.734,3 pesos / Kg. de camarón), seguidos por el T3 y T2 respectivamente. Esto permite proponer que la inclusión de  $\beta$ -glucan en la dieta para camarones pudo aportar mejores rendimientos biológicos a los ejemplares. En el período post-infección; el tratamiento T3 logró recuperar el mayor porcentaje de la inversión 27,8%, esto se valida, porque en un cultivo infectado con WSSV la recuperación es del 0%.

## **7.2 RECOMENDACIONES**

7.2.1 Las futuras investigaciones deberán enfocarse en evaluar dosis de  $\beta$ -glucan diferentes a las reportadas en esta investigación.

7.2.2 Abordar trabajos del  $\beta$ -glucan sobre los efectos residuales en tejido de camarón, niveles y tiempo de acción, absorción y excreción etc.

7.2.3 Evaluar junto con el  $\beta$ -glucan, si se presenta sinergia ante dosis adicionales de productos antibióticos o probióticos dirigidos a contrarrestar las afecciones del tracto digestivo durante la evolución de la patología WSSV, con el fin de despertar el apetito y evitar la alta tasa de evacuación de heces.

7.2.4 Profundizar el conocimiento sobre el sistema de defensa inespecífico del camarón, y los componentes de la hemolinfa en estos crustáceos .

## **8. RESUMEN**

La producción de camarones *Litopenaeus* soportan grandes pérdidas económicas, causadas por la patología del Síndrome viral de la Mancha Blanca, (WSSV). En la ensenada de Tumaco, situada en la costa pacífica de Colombia y en Ecuador, se presentaron mortalidades masivas de camarones por esta enfermedad que está reportada como uno de los cuatro agentes etiológicos mas peligrosos para la camaronicultura.

Esta patología tiene aproximadamente diez (10) años desde su aparición en Asia, y en la actualidad no existe una metodología establecida para controlarla; se desarrolló este trabajo para buscar una alternativa que mitigue los problemas económicos por esta enfermedad, pues varias granjas camaroneras se cierran por sus bajísimas producciones y por las pérdidas en los inversionistas.

Se han realizado esfuerzos y pruebas para manejar el problema, pero hasta hoy no se tienen estrategias que aseguren la producción económica y el control de la enfermedad. El trabajo evaluó el  $\beta$ -glucan en camarones infectados con virus WSSV. Este producto es obtenido de la levadura *Sacchariomyces cerevisiae*, (levadura del pan) que se ha caracterizado por su actividad inmunoestimulante, y considerado como un poderoso activador del sistema inmune ante organismos atacados por virus, bacterias, hongos, parásitos o radiación.

En peces, el  $\beta$ -glucan ha sido utilizado para combatir enfermedades en salmónidos, obteniéndose resultados promisorios.

El trabajo de campo se desarrolló en el hatchery de la Estación Experimental de Cultivos Marinos de la Universidad de Nariño ubicada en la ciudad de San Andrés de Tumaco, con cuatro tratamientos experimentales, a tres de ellos se les suministró diferentes dosis de  $\beta$ -glucan 120, 150 y 180 gramos por cada 100 kilogramos de balanceado, al testigo no se le incluyó  $\beta$ -glucan en la formulación de la dieta. Cada tratamiento tuvo tres replicas con 120 animales por cada unidad experimental según el modelo estadístico Irrestrictamente al Azar. Las post-larvas en estadio PL 16 de camarón *Penaeus vannamei*, fueron cultivados a lo largo de tres meses con una dieta isoenergética e isoproteica del 35% proteína, al cabo de la semana 12 de cultivo fueron infectados con el virus WSSV, a través de una papilla elaborada con camarones afectados con el virus, y realizada en los laboratorios de CENIACUA.

Los resultados obtenidos validan la posibilidad de realizar investigaciones específicas y puntuales para determinar si las variables evaluadas en este trabajo como son: sobrevivencia, incremento de peso, incremento de longitud y conversión alimenticia, son realmente afectadas positivamente por la adición de  $\beta$ -glucan a la dieta.

## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

ALDAY, Victoria. Diagnóstico y Manejo de la enfermedad del punto blanco. Guayaquil, Ecuador, Cenaim-Espol, 1999. 8 p. (Consulta vía Internet. URL: <http://www.cna-ecuador.com>)

BALANFARINA, Conferencias sobre Nutrición aplicada a camarones. Ecuador, Planta Productora de Concentrados para Camarones, 1990. 6 p.

BAUTISTA, Carmen. Crustáceos: Tecnología de Cultivo. Madrid, España, Mundi - Prensa, 1988. 180 p.

CABEZAS, Eduardo y LLANOS Jairo. Evaluación de la producción en camarones que recibieron inmuno – estimulante. En: Reportes Técnicos. Guayaquil, Ecuador, Interconsorcio, 1997. 7 p.

CEDEÑO Ricardo, et al., V Congreso Ecuatoriano de Acuicultura enfocando los retos del 2000. Memorias. Guayaquil, Ecuador. 1999. 8 p.

CLARK, Peter.  $\beta$ -Glucan 1,3 y 1,6. Texas, U.S.A., Vitamet health food, 1999. 7 p. (consulta vía Internet. URL://[www.betaexpress.com/betascience.html](http://www.betaexpress.com/betascience.html)).

COGLITORE, Sandro. Prevén baja en producción camaronera. Guayaquil, Ecuador, 1999. 6 p. (Consulta vía Internet. URL: <http://www.cna-ecuador.com>).

CHAMBERLAIN, George. Newsletter. Texas, U.S.A., Global Aquaculture Alliance, 1999. 11 p. (Consulta vía Internet. URL:<http://www.gaalliance.org/april/199.html>).

DIAZ, Francisco, et al. Fundamentos de Nutrición y alimentación en Acuicultura. Santa Fé de Bogotá, Colombia, Instituto Nacional de Pesca, 1996. 342 p.

DIEGUEZ, Javier. El Cangrejo de Río. Zaragoza, España, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, 1999. 21 p. (Consulta vía Internet. URL: <http://www.healthnet.org/programs/promed-hma/9512/msg00129.html>)

DURAND, S., LIGHTNER, D., REDMAN J. Ultraestructure and Morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). Diseases of Aquatic Organisms. U.S.A. 1997. 27p.

FLEGEL, Timothy. Exotic disease found in wild shrimp near Browsville. Bangkok, Tailandia, Universidad de Mahidol, Biotechnology department, 1999. 7p.(ConsultavíaInternet. URL: <http://www.204.64.0.99/news/news/980420c.htm>)

GOMEZ, Mercedes y ENRIQUEZ, Claudia. Evaluación de tres porcentajes de proteína animal y vegetal en la alimentación de camarones en cautiverio (*P. vannamei*, *P. stilyrostris* y *P. occidentalis* ), en el municipio de Tumaco, Pasto, Colombia, Universidad de Nariño, Facultad de Zootecnia, 1989. 80 p.

INSITUTO DE HIDROLOGIA METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM), Sistema de Información Nacional Ambiental, San Juan de Pasto, Colombia: Banco de Datos 2001. 6p.

JOFRE TORROELLA, J. Aspectos generales de patología infecciosa. En: Patología en acuicultura. Madrid, España, Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura, 1988. Pp. 1-36.

JORY, Darryl. Tucson we have a problem. Texas, U.S.A, Global Aquaculture Alliance, 1999.10 p. (Consulta vía Internet. URL:<http://www.gaalliance.org/april/199.html>)

LIGHTNER, Donald. Shrimp, white spot disease . Texas, U.S.A, 1998. 5 p. (Consulta vía Internet. URL:<http://www.healthnet.org/programs/promed-hma/9804/msg00136.html>).

LIGHTNER, Donald y REDMAN, Robert. Shrimp diseases. Arizona, U.S.A, 1999. 6 p. (Consulta vía Internet. URL:<http://LAMA.kcc.hawaii.edu/praise/alert/html>)

MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. Biología de los microorganismos: 8<sup>a</sup>. ed. Madrid, España, Prentice Hall, 1968. 986 p.

MARINOVICH , C. y ERASSO , J. Evaluación de dos sistemas de alimentación en el cultivo intensivo del camarón blanco ( *Penaeus vannamei*) bajo condiciones de cautiverio. Tesis de Zootecnia. Pasto, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, programa de >Zootecnia. 1996. 85 p.

MARTINEZ, F. Tecnología Acuicola Cartagena, Colombia . Empresa Camaronera Produmar Tumaco. 1989. 300 p.

MARTINEZ, Luis. Camaronicultura: Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones *Peneidos*. México. AGT editor, 1993. 233 p.

MORCILLO, Hernando y QUIÑONES, Arturo. Diseño y montaje de hatchery en la Estación Experimental de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Nariño Regional Costa Pacífica. Informe de Práctica Empresarial. Tumaco, Colombia, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Programa de Ingeniería en Producción Acuícola, 1999. 109 p.

MOSQUERA, Alba Idalia. Estado actual de la eutroficación en areas costeras de la Ensenada de Tumaco. EN: Boletín científico Centro Control Contaminación del Pacífico (CCCP). Tumaco, Colombia, Promedios - Armada Nacional, Vol 4, No. 2 (Agosto 1995): 12-13.

OLIVA J. y BADOS A . Evaluación de tres niveles de proteína en la alimentación de camarones (*Penaeus vannamei*) en el municipio de Tumaco,

Colombia. Tesis de Zootecnia. Pasto, Universidad de Nariño, facultad de Zootecnia. 1993. 104 p.

ROBERTS, Ronald. Patología de los peces. Madrid, España, Mundi – prensa, 1981. 366 p.

RODRIGUEZ, A y CAMUES, L. Comparación de la torta de soja (*Glycine soja*) y torta de palmiste (*Elaeis guinnensis*, Tacq) como fertilizantes orgánicos en estanques de camarón. Tesis Zootecnia. Pasto, Universidad de Nariño, Facultad de Ciencia pecuarias, programa de Zootecnia. 1997. 105 p.

ROMRELL, Ross. Procesos Histológicos. Tlalpan, México, Médica Panamericana, 1994. 749 p.

TREECE, Granvil. Shrimp virus update. Texas, U.S.A, GAA, 1998. 4 p. (Consulta vía Internet. FILE://A:\shrimp-virus-Report.htm).

WALTER, William; MCBEE, Richard y TEMPLE Kenneth]. Introducción a la Microbiología. México, Continental, 1980. 399 p.

WANG, C., LEU, C., et al. Purification and genomic Analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms. U.S.A. 1995. 23p

ZENDEJAS HERNANDEZ JESUS. Manual para la prevencion de enfermedades virales en camaronicultura. Mexico. 1999. 32p.

## ANEXOS

Anexo B . Análisis de varianza para sobrevivencia a las 12 semanas de cultivo.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>G. L.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fc</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Entre Tratamientos	655.94250	3	218.64750	3.533	0.0681
Dentro de Tratamientos	495.06	8	61.88250		
Total	1151.0025	11			

$F_c > F_t$

Prueba de Tukey

Tratamientos	Promedio	Tratamientos Homogéneos
T0	78.000000	X
T1	93.000000	X
T3	94.400000	X
T2	96.900000	X
Contraste	Dif. Estadística Significativa (95%)	Dif. Estadística altamente Signf. (99%)
m0 – m1	*	
m0 - m2	*	
m0 – m3	*	
m1 – m2		
m1 – m3		
m2 – m3		

Anexo B . Análisis de varianza para sobrevivencia a las 12 semanas de cultivo.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Fc	Nivel de significancia
Entre Tratamientos	655.94250	3	218.64750	3.533	0.0681
Dentro de Tratamientos	495.06	8	61.88250		
Total	1151.0025	11			

$F_c > F_t$

Prueba de Tukey

Tratamientos	Promedio	Tratamientos
--------------	----------	--------------

		<b>Homogéneos</b>
T0	78.000000	X
T1	93.000000	X
T3	94.400000	X
T2	96.900000	X
<b>Contraste</b>	<b>Dif. Estadística Significativa (95%)</b>	<b>Dif. Estadística altamente Signf. (99%)</b>
m0 – m1	*	
m0 - m2	*	
m0 – m3	*	
m1 – m2		
m1 – m3		
m2 – m3		

Anexo G . Análisis de varianza para Incremento de peso.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>G. L.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fc</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Entre Tratamientos	0.0133583	3	0.0044528	106.86	
Dentro de Tratamientos	0.0003333	8	0.0000417		
Total	0.0136917	11			

$F_c > F_t$

Prueba de Tukey

<b>Tratamientos</b>	<b>Promedio</b>	<b>Tratamientos Homogéneos</b>
T0	0.9633333	X
T1	0.9933333	X

T2	1.0300000	X
T3	1.0500000	X
<b>Contraste</b>	<b>Dif. Estadística Significativa (95%)</b>	<b>Dif. Estadística altamente Signf. (99%)</b>
m0 – m1	*	*
m0 - m2	*	*
m0 – m3	*	*
m1 – m2	*	*
m1 – m3	*	*
m2 – m3	*	*

Anexo H . Análisis de varianza para peso Final.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	Fc	Nivel de significancia
Entre Tratamientos	1.8300000	3	0.6100000	122.00	0.06
Dentro de Tratamientos	0.0400000	8	0.0050000		
Total	1.8700000	11			

$F_c > F_t$

Prueba de Tukey

Tratamientos	Promedio	Tratamientos Homogéneos
T0	11.633333	X
T1	11.933333	X
T3	12.400000	X

T2	12.633333	X
<b>Contraste de Medias</b>	<b>Dif. Estadística Significativa (95%)</b>	<b>Dif. Estadística altamente Signf. (99%)</b>
m0 – m1	*	*
m0 - m2	*	*
m0 – m3	*	*
m1 – m2	*	*
m1 – m3	*	*
m2 – m3	*	*

Anexo I . Análisis de varianza para longitud - Talla final.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>G. L.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fc</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Entre Tratamientos	1.8158333	3	0.6052778	1.618	0.2605
Dentro de Tratamientos	2.9933333	8	0.3741667		
Total	4.8091667	11			

$F_c < F_t$

No existe diferencia estadística entre los tratamientos experimentales

## Anexo M . Análisis de varianza para Conversión Alimenticia

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>G. L.</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Fc</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Entre Tratamientos	0.2332250	3	0.0777417	0.9190	0.4742
Dentro de Tratamientos	0.6768000	8	0.0846000		
Total	0.9100250	11			

$F_c < F_t$

No existe diferencia estadística entre los tratamientos experimentales.

Anexo K. Rubros y costos directos de producción del engorde de camarones  
alimentados con diferentes dosis de  $\beta$ -glucan

CONCEPTO	T0	T1	T2	T3
Post-larvas (360)	1800	1800	1800	1800
Combustibles	1000	1000	1000	1000
Desinfectantes	1300	1300	1300	1300
Balanceado	26562	29932	33628	32920
B-glucan	0	888	1276	1499
<b>TOTAL</b>	<b>30662</b>	<b>34920</b>	<b>39004</b>	<b>38519</b>

Anexo J. Costos directos de producción y Rentabilidad por kilogramo de camarón producido, alimentado con diferentes dosis de B-glucan.

CONCEPTO	T0	T1	T2	T3
Biomasa (Kg)	1	1	1	1
Valor Producto	13.930	13.930	13.930	13.930
Costo de producción	9.379,0	8.734,3	9.012,0	
8.968,3				
Ganacia Bruta	4.550,4	5.195,7	4.918,0	
4.961,7				
Rentabilidad	48.5 %	59.4 %	54.5 %	55.3 %

