



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

Unidad Integradora Curricular previo a la  
obtención del título de Ingeniero  
Agropecuario

**Unidad Integradora Curricular:**

“EFECTO DE DIETAS CON *SPIRULINA SP* CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS  
DE TIPO VIBRIO EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)”

**Autor:**

Frank Javier Castellano Araujo

**Tutor Unidad Integradora Curricular:**

Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez

**MOCACHE - ECUADOR**

**2021**



## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.**

Yo, Frank Javier Castellano Araujo, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

**Frank Javier Castellano Araujo**

**C.C.**

**AUTOR**



## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.**

La suscrita, Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Frank Javier Castellano Araujo**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, “EFECTO DE DIETAS CON *SPIRULINA SP* CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE TIPO VIBRIO EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.



Firmado electrónicamente por:

**ANA RUTH  
ALVAREZ  
SANCHEZ**

---

Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez  
**DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Ingeniera

Diana Veliz Zamora

COORDINADOR DE CARRERA DE INGENIERIA AGROPECUARIA

De mi consideración:

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad Integradora Curricular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, siguiendo las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, la suscrita Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez, en calidad de Directora del Proyecto de Investigación de Grado **“EFECTO DE DIETAS CON *SPIRULINA SP* CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE TIPO VIBRIO EN**

**CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)”**, de autoría de la estudiante **Frank Javier Castellano Araujo**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es del, 3% el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Documento	<a href="#">Tesis Frank Castellano.docx</a> (D101123637)
Presentado	2021-04-09 09:34 (-05:00)
Presentado por	frank.castellano2014@uteq.edu.ec
Recibido	aalvarezs.uteq@analysis.orkund.com
Mensaje	Tesis Urkund <a href="#">Mostrar el mensaje completo</a>

3% de estas 36 páginas, se componen de texto presente en 11 fuentes.



Firmado electrónicamente por:

**ANA RUTH  
ALVAREZ  
SANCHEZ**

---

Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez

**DIRECTORA DE LA UNIDAD INTEGRADORA CURRICULAR**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**UNIDAD CURRICULAR**

**Título:**

“EFECTO DE DIETAS CON *SPIRULINA SP* CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS  
DE TIPO VIBRIO EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de  
Ingeniero Agropecuario.

Aprobado por:

---

**Dr. Martín González Vélez**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**Dr. Yuniel Mendéz Martínez**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**Ing. Marlena Medina Villacis MSc.**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR**

## **AGRADECIMIENTO.**

Agradezco a Dios por haber estado conmigo en los momentos que más lo necesitaba por darme salud y sabiduría. Por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.

A mi madre, que con su ejemplo y dedicación me ha instruido para seguir adelante en mi vida profesional, a mi tía Inés, a mi hermano, a mis amigos/a y todas las personas que Dios puso en mi camino, por haber estado conmigo apoyándome en los momentos más difíciles.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo en especial a la Facultad de Ciencias Pecuarias, a sus autoridades y docentes, por abrir sus puertas y darme las herramientas necesarias para triunfar en la vida profesional.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento a mi tutora de tesis la Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez, PhD, por su esfuerzo, dedicación y conocimientos que hicieron que pueda crecer día a día como profesional, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

*Frank.*

## **DEDICATORIA.**

Esta tesis está dedicada a:

*A Dios principalmente, por haberme dado la vida y permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional. A mi madre Graciela Araujo, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, por enseñarme que siempre con perseverancia, dedicación y esfuerzo todo se puede lograr. A mi tía Inés por compartir momentos significativos conmigo y por estar siempre dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.*

*Agradezco a todos por su apoyo incondicional, por estar conmigo en todo este proceso. A mi familia que con sus consejos y palabras de aliento de una u otra manera, me acompañan en mis sueños.*

*Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi hermano Joselo que está en cielo, aunque no está físicamente presente, siempre fuiste y serás mi ejemplo, te llevare en mi corazón.*

***Frank.***

## RESUMEN.

La industria camaronera representa una de las actividades económicas de mayor importancia a nivel mundial, sin embargo; a pesar de su importancia, esta industria se ve afectada por la presencia de bacterias patógenas sobre todo del género *Vibrio* bacterias que ocasionan altas mortalidades y grandes pérdidas económicas. El objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto de dietas funcionales con la inclusión de *Spirulina sp.*, contra bacterias patógenas de tipo *Vibrio* en camarón blanco (*Litopenaues vannamei*). La investigación fue de tipo experimental y se desarrolló en el Campus Universitario “La María”, en los predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, bajo un diseño completamente al azar, con 3 tratamientos (2, 4 y 6% de *Spirulina sp.*) y dos controles experimentales (positivo y negativo) por triplicado. Los vibrios fueron aislados directamente del intestino del camarón, los cuales fueron cultivados en medios selectivo TCBS hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC densidad bacteriana seleccionada con un experimento previo de  $CL_{50}$ . Los organismos fueron alimentados por 41 días con dietas con inclusión de espirulina y expuestos a Vibrios. Los resultados demostraron que la dieta con mayor protección contra las bacterias patógenas del género *Vibrio* fue la de inclusión de 4% *Spirulina sp.* en el balanceado que obtuvo un 47% de mortalidad en camarones con respecto al control positivo (80%) expuestos a bacterias patógenos de Tipo *Vibrio*. Con estos resultados se generan beneficios al sector acuícola debido a que permite el control y prevención de infecciones de origen bacteriano.

**Palabras clave:** Alimento funcional, Intestino, Inmunoesimulante, Spirulina.

## **ABSTRACT.**

The shrimp industry represents one of the most important economic activities worldwide, however; Despite its importance, this industry is affected by the presence of pathogenic bacteria, especially of the *Vibrio* genus, which cause high mortalities and great economic losses. The objective of this work was to analyze the effect of functional diets with the inclusion of *Spirulina* sp, against *Vibrio*-type pathogenic bacteria in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The research was experimental and was developed at the "La María" University Campus, on the premises of the State Technical University of Quevedo, under a completely randomized design, with 3 treatments (2, 4 and 6% of *Spirulina* sp. ) and two experimental controls (positive and negative) in triplicate. The vibrios were isolated directly from the shrimp intestine, which were cultured in selective TCBS media until reaching a density of  $1 \times 10^8$  CFU bacterial density selected with a previous LC50 experiment. The organisms were fed for 41 days with diets including spirulina and exposed to Vibrios. The results showed that the diet with the highest protection against the pathogenic bacteria of the *Vibrio* genus was the inclusion of 4% *Spirulina* sp in the balance, which obtained 47% mortality in shrimp with respect to the positive control (80%) exposed to pathogenic bacteria. *Vibrio* Type. With these results, benefits are generated to the aquaculture sector because it allows the control and prevention of infections of bacterial origin.

Keywords: Functional food, Intestine, Immunosimulant, *Spirulina*.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página.</b>
PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. .	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN Y PALABRAS CLAVES.....	vii
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
CÓDIGO DUBLIN.....	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
1.1. Problema de la investigación. ....	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
Diagnóstico.....	4
Pronóstico.....	4
1.1.2. Formulación del problema. ....	5
1.1.3. Sistematización del problema. ....	5
1.2. Objetivos.....	6
1.2.1. Objetivo general.....	6
1.2.2. Objetivos específicos.....	6

1.3.	Justificación. ....	7
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....		8
2.1.	Marco conceptual. ....	9
2.2.	Marco referencial. ....	11
2.2.1.	Camarón blanco. ....	11
2.2.2.	Clasificación taxonómica de <i>Litopenaeus</i> . ....	12
2.2.3.	Producción de camarones en el mundo. ....	13
2.2.4.	Producción de camarones en el Ecuador. ....	13
2.2.5.	Ciclo biológico del camarón blanco. ....	14
2.2.6.	Parámetros generales del cultivo del camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ). ....	15
1.	Calidad de agua. ....	15
2.	Temperatura. ....	15
3.	Oxígeno. ....	15
4.	pH. ....	15
2.2.7.	Sistema inmunológico del camarón blanco ( <i>L. vannamei</i> ). ....	17
2.2.8.	Enfermedades del camarón. ....	18
2.2.8.1.	Enfermedades bacterianas más comunes. ....	18
2.2.9.	<i>Vibrios</i> . ....	20
2.2.11.	Inmunoestimulantes. ....	23
2.2.11.1.	Características de la <i>Spirulina sp.</i> ....	24
2.2.11.2.	Taxonomía de la <i>Spirulina</i> . ....	24
2.2.11.3.	Importancia de <i>Spirulina sp.</i> ....	25
2.2.11.4.	La espirulina en el Ecuador ....	25
2.2.11.5.	Condiciones de cultivo. ....	26
2.2.11.6.	Composición química de <i>Spirulina sp.</i> ....	26
2.2.11.7.	Perfil de aminoácidos ....	28
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN .....		32

3.1.	Localización.....	33
3.2.	Tipo de investigación. ....	33
3.3.	Método de investigación.....	33
3.4.	Fuentes de recopilación de la información. ....	33
3.5.	Diseño de la investigación. ....	34
3.5.1.	Tratamientos. ....	34
3.6.	Instrumentos de investigación.....	32
3.6.1.	Sistema de flujos .....	32
3.6.2.	Procedimiento experimental. ....	33
3.7.	Tratamientos de los datos. ....	37
3.8.	Recursos humanos y materiales. ....	37
3.8.1.	Recursos humanos.....	37
3.8.2.	Equipos. ....	38
3.8.3.	Materiales de oficina. ....	38
3.8.4.	Material productivo. ....	38
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		39
4.1.	Resultados y discusión. ....	40
4.1.1.	CL <sub>50</sub> .....	40
4.1.2.	Mortalidad acumulada. ....	42
4.1.3.	Supervivencia.....	44
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		46
5.1.	Conclusiones.....	47
5.2.	Recomendaciones.....	48
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA .....		49
6.1.	Bibliografía.....	50
CAPÍTULO VII. ANEXOS .....		56

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	12
<b>Tabla 2.</b> Ubicación taxonómica de <i>Spirulina</i> . .....	24
<b>Tabla 3.</b> Composición química de la espirulina.....	24
<b>Tabla 4.</b> Esquema del análisis de la varianza.....	21
<b>Tabla 5.</b> Detalle de tratamientos.....	21
<b>Tabla 6.</b> Determinación de CL <sub>50</sub> de bacterias patógenas de tipo <i>Vibrio</i> por medio del método Probit en camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	39
<b>Tabla 7.</b> Resultados del bioensayo reto con bacterias patógenas del tipo <i>Vibrio</i> .....	42
<b>Tabla 9.</b> Mortalidad acumulada a través del tiempo experimental por tratamiento.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página.</b>
<b>Figura 1.</b> Camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	11
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de producción mundial de camarón.....	12
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de un camarón.....	14
<b>Figura 4.</b> Bacteria <i>Vibrio spp</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Bacterias patógenas aisladas microbiológicamente en medio TCBs.....	38
<b>Figura 6.</b> Mortalidad Probit con diferentes concentraciones de bacterias tipo <i>Vibrio</i> .....	40
<b>Figura 7.</b> Mortalidad acumulada a través del tiempo experimental por tratamiento. ....	43
<b>Figura 8.</b> Supervivencia del camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ), bajo el efecto de dietas con inclusión de <i>Spirulina sp</i> contra bacterias patógenas de tipo <i>Vibrio</i> .....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página.</b>
<b>Anexo 1.</b> Medio de cultivo Agar TCBS.....	39
<b>Anexo 2.</b> Medio de cultivo Agar tripticasa de soya (TSA).....	40
<b>Anexo 3.</b> Compra de camarones.....	41
<b>Anexo 4.</b> Adecuación de tratamientos.....	41
<b>Anexo 5.</b> Peso del alimento y porcentajes de <i>Spirulina</i> .....	41
<b>Anexo 6.</b> Preparación del alimento.....	42
<b>Anexo 7.</b> Alimentación de camarones.....	43
<b>Anexo 8.</b> Limpieza y desinfección de materiales.....	44
<b>Anexo 9.</b> Utilización de autoclave para desinfección de materiales específicamente cajas Petri.....	44
<b>Anexo 10.</b> Agar selectivo para <i>Vibrios</i> .....	45
<b>Anexo 11.</b> Aislamiento de bacterias.....	45
<b>Anexo 12.</b> Extracción del intestino del camarón.....	46
<b>Anexo 13.</b> Raspado intestinal.....	46
<b>Anexo 14.</b> Incubación de bacterias (24 horas).....	46
<b>Anexo 15.</b> Bacterias después de la incubación.....	47
<b>Anexo 16.</b> Selección de bacterias de medio sólido a líquido, para luego ser colocadas en cada tratamiento.....	47
<b>Anexo 17.</b> Análisis de varianza de la sobrevivencia del camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ), bajo el efecto de dietas con inclusión de <i>Spirulina sp</i> contra bacterias patógenas de Tipo <i>Vibrio</i> .....	48
<b>Anexo 18.</b> Análisis de varianza de la mortalidad del camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ), bajo el efecto de dietas con inclusión de <i>Spirulina sp</i> contra bacterias patógenas de Tipo <i>Vibrio</i> .....	48

## CÓDIGO DUBLIN

<b>Título:</b>	“Efecto de dietas con <i>Spirulina sp</i> contra bacterias patógenas de tipo <i>Vibrio</i> en camarón blanco ( <i>Litopenaeus vannamei</i> )”			
<b>Autor:</b>	Frank Castellanos			
<b>Palabras clave:</b>	Alimento funcional	Intestino	Inmunoesimulante	Spirulina
<b>Fecha de publicación:</b>				
<b>Editorial:</b>				
<b>Resumen:</b>	<p><b>Resumen.-</b> La industria camaronera representa una de las actividades económicas de mayor importancia a nivel mundial, sin embargo, a pesar de su importancia, esta industria se ve afectada por la presencia de bacterias patógenas sobre todo del género <i>Vibrio</i> bacterias que ocasionan altas mortalidades y grandes pérdidas económicas. El objetivo de este trabajo consistió en analizar el efecto de dietas funcionales con la inclusión de <i>Spirulina sp</i>, contra bacterias patógenas de tipo <i>Vibrio</i> en camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>). La investigación fue de tipo experimental y se desarrolló en el Campus Universitario “La María”, en los predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, bajo un diseño completamente al azar, con 3 tratamientos (2, 4 y 6% de <i>Spirulina sp.</i>) y dos controles experimentales (positivo y negativo) por triplicado. Los vibrios fueron aislados directamente del intestino del camarón, los cuales fueron cultivados en medios selectivo TCBS hasta alcanzar una densidad de <math>1 \times 10^8</math> UFC densidad bacteriana seleccionada con un experimento previo de <math>CL_{50}</math>. Los organismos fueron alimentados con dietas con inclusión de espirulina y expuestos a Vibrios. Los resultados demostraron que la dieta con mayor protección contra las bacterias patógenas del género <i>Vibrio</i> fue la de inclusión de 4% <i>Spirulina sp</i> en el balanceado que obtuvo un 47% de mortalidad en camarones con respecto al control positivo (80%) expuestos a bacterias patógenos de Tipo <i>Vibrio</i>. Con estos resultados se generan beneficios al sector acuícola debido a que permite el control y prevención de infecciones de origen bacteriano.</p>			

	<p><b>Abstract.-</b> The shrimp industry represents one of the most important economic activities in the world, however, despite its importance, this industry is affected by the presence of pathogenic bacteria, especially of the <i>Vibrio</i> genus, which cause high mortalities and great economic losses. The objective of this work was to analyze the effect of functional diets with the inclusion of <i>Spirulina sp.</i>, against <i>Vibrio</i>-type pathogenic bacteria in white shrimp (<i>Litopenaues vannamei</i>). The research was experimental and was developed at the "La María" University Campus, on the premises of the State Technical University of Quevedo, under a completely randomized design, with 3 treatments (2, 4 and 6% of <i>Spirulina sp.</i>) and two experimental controls (positive and negative) in triplicate. The vibrios were isolated directly from the intestine of the shrimp, which were cultured in selective TCBS media until reaching a density of <math>1 \times 10^8</math> CFU bacterial density selected with a previous <math>LC_{50}</math> experiment. The organisms were fed diets including spirulina and exposed to <i>Vibrios</i>. The results showed that the diet with the highest protection against the pathogenic bacteria of the <i>Vibrio</i> genus was the inclusion of 4% <i>Spirulina sp.</i> in the balance, which obtained 47% mortality in shrimp with respect to the positive control (80%) exposed to pathogenic bacteria. <i>Vibrio</i> Type. With these results, benefits are generated to the aquaculture sector because it allows the control and prevention of infections of bacterial origin.</p>
<b>Descripción</b>	84 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm
<b>URI:</b>	

## Introducción.

El cultivo de camarón es una de las industrias económicas con un continuo desarrollo económico a nivel mundial (1). Según la FAO (2), esta especie representa el 15% del valor total de las especies alimenticias marinas comercializadas (3). *Litopenaeus vannamei* es la especie más cultivada y comercializada a nivel mundial. Los principales países productores de *L. vannamei* son China, Tailandia, Indonesia, Brasil, México y Ecuador (1).

Ecuador es uno de los principales productores de camarón cultivado y uno de los mayores exportadores a nivel mundial (4). Su producción en el 2019 fue de 480,000 toneladas producción superior a otros países de Latinoamérica como México 178,000 toneladas y Brasil 80,000 toneladas (4). A partir de 2007 Ecuador ha mantenido una tasa de crecimiento anual constante de aproximadamente 12%, logrando triplicar las exportaciones y convirtiéndose en el principal productor en el continente (3). La producción de *L. vannamei* se ha colocado como el segundo producto no petrolero que genera mayores divisas al país, por debajo del banano (1).

Sin embargo, a pesar de que la industria camaronera representa una de las actividades de mayor importancia, uno de los problemas más graves que afecta al cultivo en las unidades de producción son las altas mortalidades causadas por enfermedades (5). Las cuales están asociadas a problemas con la degradación del ambiente y enfermedades provocadas por virus, bacterias, hongos y parásitos afectando la sustentabilidad y la economía de la industria acuícola (6).

Sumado a esto, la extensión de la actividad, el descuido del impacto ambiental generado, y los factores externos han ocasionado problemas productivos siendo uno de los más críticos las enfermedades que son de diversos orígenes y ocasionan el crecimiento de distintas especies de bacterias, siendo las del género *Vibrio* las que más destacan, así como las causantes de enfermedades, mortalidades y pérdidas económicas en el cultivo (7).

Actualmente las especies de *Vibrio* reportan innumerables pérdidas en este sector (7). Estas bacterias pueden afectar al camarón llegando hasta un porcentaje de muerte del 100%, principalmente ataca a postlarvas y juveniles (8). El consumo de *L. vannamei* infectados de *Vibrios* puede inducir grandes riesgos para la salud humana

provocando enfermedades gastrointestinales y en casos severos hasta la muerte (7). Las bacterias del género *Vibrio* más estudiadas por su capacidad zootécnica son: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, y *V. vulnificus* (9).

Los crustáceos tienen un sistema inmune no específico; esta característica biológica les confiere una desventaja bajo condiciones de cultivo, ya que son susceptibles a los ataques de patógenos, ocasionando altas mortalidades y grandes pérdidas económicas (1). Considerando que no se pueden generar vacunas, contra patógenos específicos de las diversas especies de camarón, por carecer estos de memoria inmunológica, se están buscando alternativas con alcances masivas para controlar enfermedades ocasionadas principalmente por el género *Vibrio* (7).

Una alternativa es el uso de alimentos funcionales con componentes inmunoestimulantes que además de nutrir, refuercen el sistema inmunológico de los camarones, brindando protección contra bacterias patógenas como los *Vibrios*, uno de los componentes utilizados en acuicultura por su alto valor nutricional, y su alto contenido de proteínas, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, minerales, antioxidantes, enzima, clorofilas y otros pigmentos son las microalgas y cianobacterias como la espirulina (7).

La *Spirulina sp.*, es una cianobacteria o alga verde-azul considerada comúnmente como microalga por su estructura fotosintética filamentosa no diferenciada (10), habitante de lagos alcalinos, que se cultiva para consumo humano debido a su alto contenido nutricional y al considerarse un alimento completo y una fuente potencial de energía debido a su eficiencia fotosintética, además es usada en el crecimiento, actividades de las enzimas digestivas, composición de los ácidos grasos y respuesta al estrés por amoníaco e hipoxia del camarón. Sumado a esto, se ha encontrado que la *Spirulina sp.* posee una potente actividad antimicrobiana (11).

Con base en todo lo mencionado el objetivo de este trabajo consiste en analizar el efecto de dietas con *Spirulina sp.*, contra bacterias patógenas de Tipo *Vibrio* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). La importancia de generar este trabajo radica en conocer los métodos que permitan controlar y prevenir las infecciones de origen bacteriano, mediante el uso de alternativas para la prevención o tratamiento de las enfermedades microbianas en la acuicultura.

**CAPÍTULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de la investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

En la acuicultura, la camaronicultura cobra cada vez más auge en todo el mundo, debido fundamentalmente a la alta demanda de las naciones importadoras. La problemática de la acuicultura a nivel mundial son las enfermedades bacterianas y la necesidad de desarrollar producciones sustentables es urgente.

No obstante, aun contando con condiciones óptimas para la crianza, existen elementos de riesgo relacionados fundamentalmente con la presentación de enfermedades que pueden hacer decrecer e incluso devastar la producción. Independientemente de la actividad humana para prevenir estos inconvenientes, todos los animales cuentan con su propio sistema defensivo (sistema inmune), pero los crustáceos en general y los camarones en particular, presentan características específicas al respecto, que deben ser estudiadas cuidadosamente.

En ese sentido, el mayor reto que enfrenta la camaronicultura son los problemas virales y bacterianas, por lo tanto, uno de los más grandes desafíos del camarón *L. vannamei* es el tratamiento adecuado que se le da a las infecciones de origen bacteriano, ya que estas enfermedades si no se controlan a tiempo causan perjuicios considerables dentro de la producción de camarones, así como en el medio ambiente.

#### **Diagnóstico.**

Los problemas de enfermedades relacionada a las bacterias patógenas del género *Vibrio* representa uno de los serios problemas en el cultivo de camarón, registrando mortalidades masivas tanto en laboratorios de producción larvaria como en la etapa de engorda en muchas partes del mundo. Sin embargo, la baja atención que se le ha dado a su investigación el conocimiento sobre estas patologías y la epidemiología de *Vibrio spp* en el cultivo de camarón son limitadas (10).

#### **Pronóstico.**

De no fomentar el estudio de las bacterias patógenas, y sumado el mal manejo sanitario en los cultivos de camarón, se espera un aumento en la proliferación de organismos patógenos como las bacterias de tipo *Vibrio* ocasionando grandes problemas económicos además de poner en riesgo la salud humana.

### **1.1.2. Formulación del problema.**

¿Las dietas balanceadas con *Spirulina sp*, reforzaran el sistema inmunológico del camarón blanco (*L. vannamei*), y darán una mayor protección contra bacterias patógenas del género Vibrio?

### **1.1.3. Sistematización del problema.**

¿Cuál es el método para analizar bromatológicamente las dietas con inclusión de *Spirulina sp*?

¿Cuál es la concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) de las bacterias patógenos de tipo Vibrio aisladas microbiológicamente del camarón blanco *L. vannamei*)?

¿Cuál es el efecto de las dietas con inclusión de *Spirulina sp*, contra bacterias patógenas de tipo Vibrio en camarón blanco (*L. vannamei*)?

¿Cuál será el porcentaje de mortalidad de los camarones alimentados con dietas con *Spirulina sp* expuestos a bacterias patógenos de tipo Vibrio?

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. Objetivo general.**

Determinar el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de tipo *Vibrio* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

### **1.2.2. Objetivos específicos.**

- ❖ Análisis bromatológicamente las dietas con inclusión de *Spirulina sp*.
- ❖ Conocer la concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) de las bacterias patógenos de tipo *Vibrio* aisladas microbiológicamente del camarón blanco *L. vannamei*.
- ❖ Analizar el efecto del alimento con diferentes dosis de *Spirulina sp* en camarones infectados con bacterias patógenos de tipo *Vibrio*.
- ❖ Determinar el porcentaje de mortalidad de camarones expuestos a bacterias patógenos de tipo *Vibrio*.

### 1.3. Justificación.

La industria del cultivo de camarón es una actividad económica relevante a nivel mundial y nacional, ya que presenta una posibilidad de producir alimento de alta calidad para consumo humano, y una alternativa en la captación de divisas a través de su exportación. A pesar de ello, en la última década, esta actividad, ha disminuido su desarrollo por el impacto de enfermedades causadas por los virus y bacterias, mismos que se han establecido en los sistemas donde se abastecen de agua las granjas de camarón.

Desde ese punto de vista, los inmunoestimulantes incluidos en la dieta del camarón son una alternativa para reducir las enfermedades y por ende los altos índices de mortalidad, sin embargo el impacto económico que causa el uso de estos aditivos en el alimentos podría verse favorecido en producciones a gran escala, puesto que *L. vannamei* posee un sistema inmune innato sin capacidad de memoria y el interés en la prevención de enfermedades por el uso de alimentos inmunoestimulantes o compuestos activos como la *Spirulina*, se ha incrementado con el fin de estimular la respuesta del camarón para combatir infecciones ocasionadas por patógenos, resultando en especímenes más resistentes.

Debido a estos inconvenientes se han venido aplicando diferentes métodos de control, con el único fin de minimizar el impacto de dichas enfermedades, los cuales se han tenido un proceso de innovación con el pasar los años y obteniendo diferentes tipos de resultados.

Por ende, el presente proyecto buscó evaluar el efecto de *Spirulina sp*, como alternativa para minimizar o evitar la influencia de este tipo de enfermedades, debido a que esta cianobacteria, podría tener ventajas como un nuevo agente antimicrobiano debido a su alta actividad y el incremento de la solubilidad en el agua, puesto que es considerada como una fuente rica en proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerales, ácidos grasos esenciales y pigmentos antioxidantes, tales como carotenoides. Además de su buen valor nutricional, es eficaz para la modulación de la respuesta inmunitaria características que hacen a la *Spirulina* un excelente componente de alimentos funcionales para crustáceos.

**CAPÍTULO II**  
**FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE**  
**LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco conceptual.**

### **Alimento funcional**

Representan a aquellos alimentos o productos alimenticios que además de su aporte natural de sustancias nutritivas, proporcionan un beneficio específico (12).

### **Crustáceos**

El termino crustáceo, proviene del latín crusta (“costra”, “corteza”), es una clase de animales artrópodos de respiración branquial, que cuentan con dos pares de antenas y un número variable de apéndices y que están cubiertos por un caparazón generalmente calcificado (13).

### **Camarón blanco**

Son considerados crustáceos de agua salada o dulce, de tamaños diversos según la especie (14).

### **Inmunoestimulante**

Los inmunoestimulantes, también conocidos como inmunoestimuladores, son sustancias que estimulan el sistema inmune induciendo activación o actividad creciente de cualquiera de sus componentes (4).

### **Patógeno**

Se infiere como aquel elemento o medio capaz de producir algún tipo de enfermedad o daño en el cuerpo de un animal, un ser humano o un vegetal, cuyas condiciones estén predispuestas a las ocasiones mencionadas (8).

### **Vibrio**

Género de bacterias móviles, de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  de longitud, con forma algo curvada y dotadas de un único flagelo en un extremo que les confiere una elevada movilidad. Algunas especies de *Vibrio* patógenas causan el cólera y formas epidémicas de gastroenteritis (7).

### **Vibriosis**

La *Vibriosis* es una enfermedad bacteriana, causada por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias tienen en algunos casos una patogénesis desconocida. En camarones penaeidos sólo se ha demostrado

patogenicidad de unas pocas especies de vibrios, a pesar de que se ha observado la existencia de muchas bacterias en camarones enfermos (7).

### **Zoonosis**

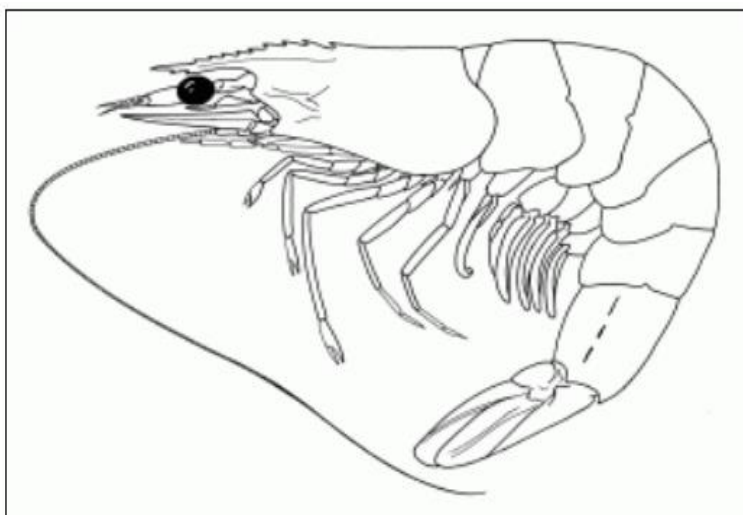
Hace referencia a la infección o enfermedad del animal que es transmisible al ser humano en condiciones naturales o viceversa. El término deriva de dos vocablos griegos: zoon (“animal”) y nósos (“enfermedad”) (1).

## 2.2. Marco referencial.

### 2.2.1. Camarón blanco.

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es una especie de camarón introducida en Centro y Sur América en el año de 1976 (15). Es una especie habitual y abundante en los sistemas lagunares. Se encuentra desde la parte norte del Golfo de California y se extiende su distribución hasta las costas de Ecuador (1).

Estas especies son artrópodos diferenciados por tener sus patas formadas por segmentos articulados y presentar su cuerpo cubierto por una capa gruesa llamada quitina (Fig. 1), la cual, necesitan cambiar o mudar para poder crecer; corresponden a la clase crustácea, son organismos mandibulados con apéndices birrámeos articulados, con dos pares de antenas, branquias, caparazón; y son de hábitos acuáticos; poseen un gran potencial reproductivo, ya que las hembras pueden desovar hasta un 250.000 huevecillos (16).



**Figura 1.** Camarón blanco (*L. vannamei*)

Fuente: (13).

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, debido a su alta tolerancia a una amplia gama de las condiciones ambientales, una mayor resistencia a diversas enfermedades, y su excelente rendimiento acuícola, es en realidad la especie de camarón más ampliamente cultivado en todo el mundo. Sin embargo, la cultura global de este camarón ha enfrentado recientemente serios problemas, especialmente aquellos relacionados con la prevalencia y la gravedad de una serie de enfermedades virales y bacterianas (17).

Un factor limitante para el desarrollo de la producción acuícola es la aparición de enfermedades infecciosas, como resultado de la incidencia de bacterias, hongos y virus, asociadas con el aumento en las densidades y deficiencias en los métodos de manejo de los cultivos. Esto ha hecho necesario el empleo de antibióticos para controlar el riesgo de infecciones por bacterias (17).

Sin embargo, el uso de estos compuestos en el cultivo de camarón puede inducir el desarrollo de bacterias resistentes a diversos antimicrobianos, que incluso pueden llegar a afectar la salud del consumidor (18).

Las enfermedades representan un problema tangible dentro de la camaronicultura, generando pérdidas económicas graves a los productores, propiciando la disminución de inversiones en este sector y pérdidas de empleos para las comunidades (19). De acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal, (OIE) (20), durante la década pasada, la producción mundial de especies acuícolas se ha visto afectada por numerosas enfermedades infecciosas, las que han impactado severamente el desarrollo y sustentabilidad de la acuicultura convirtiéndose en una restricción primaria para su desarrollo.

### 2.2.2. Clasificación taxonómica de *Litopenaeus*.

**Tabla 1.** Taxonomía

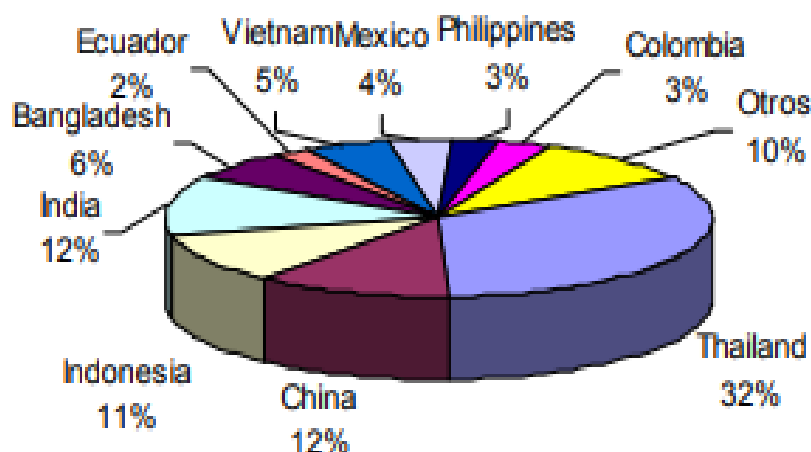
<b>Phylum</b>	<b>Artrópoda</b>
<b>Clase</b>	Crustácea
<b>Subclase</b>	Malacostráca
<b>Serie</b>	Eumalacostraca
<b>Súper orden</b>	Eucarida
<b>Orden</b>	Decápoda
<b>Sub orden</b>	Dendrobranchiata
<b>Infra orden</b>	Litopenacidea
<b>Súper familia</b>	Litopaoidea
<b>Familia</b>	Litopenaeidae
<b>Género</b>	Litopenaeus
<b>Especie</b>	vannamei

Fuente: (4).

### 2.2.3. Producción de camarones en el mundo.

La producción de camarón a nivel mundial, por captura y acuicultura, ha mostrado una gran evolución de los últimos años, ubicándose Tailandia como el país mayor productor de camarón, con alrededor del 32%, además la principal especie que se produce, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, es el camarón blanco *L. vannamei* llegando a reemplazar al camarón tigre *Penaeus monodon*, cultivado en Asia (Fig. 2) (10).

Este repunte en el cultivo del camarón blanco se debe principalmente al rápido crecimiento, a su buena supervivencia en condiciones de alta densidad y a su tolerancia a enfermedades, de manera tal que lo hacen una excelente opción para producción bajo condiciones de cultivo intensivas (7).



**Figura 2.** Porcentaje de producción mundial de camarón.  
Fuente: (21).

### 2.2.4. Producción de camarones en el Ecuador.

La demanda mundial de camarones ha estimulado la producción del camarón en el Ecuador. Las entidades con mayores cultivos son Muisne (Esmeraldas), Cojimíes (Manabí), el Golfo de Guayaquil, y El Oro, encontrando un total de 2,410 camaronerías (1). Ecuador es el productor número uno de América Latina. Por ejemplo en 1998 se exportaron aproximadamente 872 millones de dólares (2).

En la actualidad el cultivo de este crustáceo afronta una relativa inmovilización, debido entre otras razones a que el mercado internacional se está saturando, al aumento de la producción en países asiáticos como China e Indonesia; y al “Síndrome de Laura”, problema ecológico con el banano que ha hecho disminuir la productividad del camarón con pérdidas de competitividad, baja de precios y una alta mortalidad desde fines de 1993,

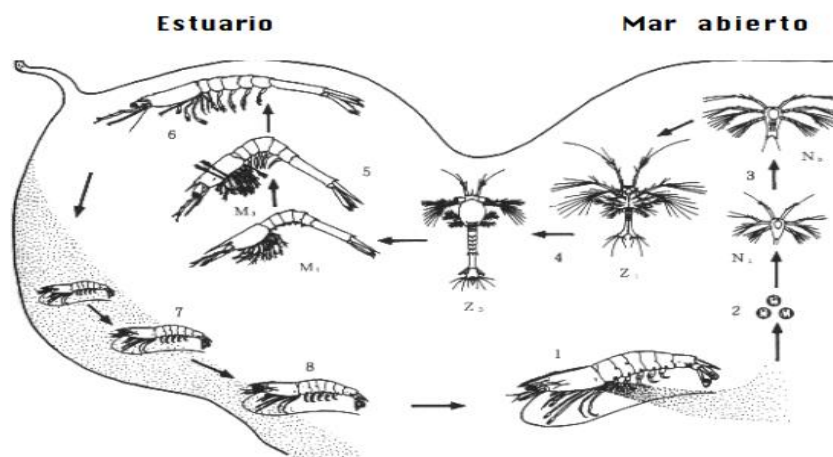
ya que la fumigación de las plantaciones de banano genera altos niveles de contaminación en el agua del Golfo de Guayaquil, produciendo pérdidas de hasta 150 millones de dólares debido al alto grado de toxicidad del agua (21).

### 2.2.5. Ciclo biológico del camarón blanco.

En cuanto al ciclo de vida, los camarones *Litopenaeus* tienen un ciclo muy complejo de unos 18 meses en el cual va desde huevo; estadios larvarios (Nauplio; Zoea; Mysis hasta Postlarva); Juvenil y Adulto (15). El desarrollo sexual en *L. vannamei* se explica de la siguiente manera: Las hembras inactivas son numerosas de febrero a agosto. El desarrollo de los ovarios empieza a incrementar en octubre, es máxima en febrero y disminuye rápidamente hasta mayo (22).

El ciclo de vida se da de la siguiente manera: los camarones blancos del pacífico *L. vannamei* desovan en mar abierto (23). Los huevecillos se hunden prontamente; el desarrollo larval comprende 11 estadios: cinco incluidos bajo el nombre de Nauplio; tres de Protozoea y tres de Mysis (estos estadios proceden a la forma verdaderamente adulta). Se usa un término para cada estadio diferente en el transcurso de la vida y se define cada uno por tamaño (24).

Bajo esas formas el camarón es planctónico se ha movido hacia las marismas, esteros y bahías en donde entra en forma de postlarvas, sustituyendo otras poblaciones que habían entrado con anterioridad (13). Al alcanzar el estado adulto inicia el movimiento inverso, es decir, hacia mar abierto influenciado por la luna y las mareas. Los camarones que logran salir al mar; son los encargados de reiniciar el ciclo (Fig. 3) (4).



**Figura 3.** Ciclo de vida de un camarón  
**Fuente:** (4).

## **2.2.6. Parámetros generales del cultivo del camarón blanco (*L. vannamei*).**

### **1. Calidad de agua.**

De acuerdo a Cheng et al. (25), los principales parámetros de calidad de agua que se deben considerar para conservar las entornos adecuados en el estanque para un buen crecimiento y sobrevivencia del camarón son: salinidad, temperatura, oxígeno disuelto, pH, sustancias y partículas disueltas, alcalinidad, turbidez, la materia orgánica y nutrientes particularmente el nitrógeno y el fosforo, así como sus compuestos metabólicos.

### **2. Temperatura.**

La temperatura en el género *Litopenaeus*, requieren para su desarrollo temperaturas tropicales, alrededor de 25 °C, aunque pueden soportar temperaturas menores; a 18 °C dejan de alimentarse y a 12 °C entran en un estado de vida latente, lo cual es aprovechado para el transporte de reproductores. A temperaturas mayores de 30 °C pueden presentarse camarones “acalambrados” ya que el metabolismo puede llegar a acelerarse demasiado (26).

### **3. Oxígeno.**

Una baja concentración de oxígeno disuelto (OD), ha sido considerada como la principal causa de estrés, bajo apetito, crecimiento lento, susceptibilidad a enfermedades y mortalidad en los cultivos acuícolas Boyd y Hanson, (13). En los estanques de cultivo, durante el día las plantas producen oxígeno mediante la fotosíntesis, a menudo tan rápidamente que la concentración de OD en el agua sobrepasa la de saturación (sobresaturación) (13).

### **4. pH.**

El pH es la concentración de iones hidrógeno de una solución. El consumo de CO<sub>2</sub> el proceso de fotosíntesis en el proceso de fotosíntesis conduce a un aumento de pH y la producción de CO<sub>2</sub> con la respiración conduce a una baja del pH. Los valores de 6,5 hasta 9 en el agua, es considerada como buena para el cultivo de camarones. Si el pH es inferior a 5 todo el tiempo, generalmente el agua tendrá ácido sulfúrico por lo tanto habrá que hacer un tratamiento con cal (2).

En los estanques de cultivo, el pH suele ser menor en la mañana debido a los cambios en la fotosíntesis del fitoplancton, dicha fluctuación suele ser mayor cuando el fitoplancton

es abundante, y suele ser menor en estanques con alta alcalinidad debido a la capacidad de amortiguación (2). La medición del pH es de suma importancia ya que dependiendo de su valor, afectara el metabolismo del camarón y ocasionando diferentes efectos.

## **5. Salinidad.**

La salinidad es la cantidad total de materia sólida disuelta en un Kg. de Agua de mar, se mide en g/Kg ‰ (ppm). La salinidad del Agua de mar es de 35 ppm, más o menos 3 ppm sin embargo, la salinidad encontrada en los estanques de cría puede variar mucho, sea subir con la evaporación o bajar con la lluvia. Los rangos de tolerancia de la salinidad para los camarones son muy amplios y pueden sobrevivir de 0 ppm hasta 50 ppm, sin embargo, el rango de crecimiento óptimo es de un promedio de 15 a 25 ppm (27).

## **6. Oxígeno disuelto.**

Una baja concentración de oxígeno disuelto (OD), ha sido considerado como la principal causa de estrés, bajo apetito, crecimiento lento, susceptibilidad a enfermedades y mortalidad en los cultivos acuícolas. En los estanques de cultivo, durante el día las plantas producen oxígeno mediante la fotosíntesis, a menudo tan rápidamente que la concentración de OD en el agua sobrepasa la de saturación (sobresaturación) (2).

Durante la noche, la respiración de los peces, plantas y otros organismos provoca que la concentración de OD disminuya. Cabe señalar que en los sistemas intensivos con mínimo recambio de agua, al aireación y la disponibilidad de OD es uno de los factores de mayor relevancia, tanto para la respiración de los organismos cultivados, como para la oxidación, la suspensión y circulación de la materia orgánica en el estanque (28).

El género *Litopenaeus* demanda concentraciones de oxígeno disuelto mayor a 3 y óptimamente alrededor de 5 mg/L. La cantidad de oxígeno disuelto en el agua determina la densidad de carga del sistema, por esta razón en sistemas intensivos e hipertensivos la aireación es indispensable. En sistemas semi-intensivos la concentración adecuada debe ser mayor de 4 mg/L. El exceso de oxígeno puede ser perjudicial y causar la enfermedad conocida como burbujas de gas (27).

## **7. Alcalinidad.**

La alcalinidad total es la medida de la capacidad del agua de neutralizar ácidos, además indica la cantidad total de bases titulables presentes en el agua, principalmente bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ), carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e hidróxidos ( $\text{OH}^-$ ). El bicarbonato es la

principal forma de alcalinidad (29). El carbonato y el hidróxido pueden ser significativos cuando la actividad de las algas es alta y en ciertos tipos de agua o residuos de agua. Si la alcalinidad es menor de 40 ppm, el camarón tendrá problemas para mudar y si el pH es menor a 7.5, es posible que se pueda observar algo de mortalidad en el cultivo.

El rango óptimo de alcalinidad está entre 80 y 100 ppm. Sin embargo, si la alcalinidad es alta (200 -300 ppm) y el pH es mayor de 8.5, el camarón tampoco podrá mudar. Para recuperar los niveles de alcalinidad hay que aplicar cal. A su vez, la alimentación incrementa la alcalinidad por la producción de iones de carbono. La alcalinidad en un estanque de cultivo de *P. vannamei* no debe bajar de 80 mg/L CaCO<sub>3</sub> para lograr un óptimo crecimiento y buena supervivencia (30).

### **2.2.7. Sistema inmunológico del camarón blanco (*L. vannamei*).**

Como todo invertebrado, el sistema inmunológico de los camarones peneidos esta mediado por los hemocitos (hialinos, granulares, y semi-granulares) quienes poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les facilita las funciones de coagulación, reconocimiento, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (19).

El sistema inmune de los camarones cuenta también con la presencia de varios componentes plasmáticos (péptidos antimicrobianos, histonas, enzimas lisosomales, lipopolisacáridos, proteínas de reconocimiento a glucanos), sistema profenoloxidasa, y la cascada de coagulación que favorece la destrucción de los patógenos (16).

#### **2.2.7.1. Sistema inmunológico innato.**

La inmunidad innata de estos crustáceos, requiere de una compleja participación en conjunto de grupos celulares, especializados y factores humorales específicos que son generados contra un antígeno (31). El sistema innato de los crustáceos, está controlado por un grupo de proteínas conocidas como receptoras de reconocimiento de patrones (PPR), estas carecen de la afinidad de unión de anticuerpos, pero pueden reconocer y unirse a algunas clases de polisacáridos, otros receptores reconocen y se unen a moléculas presentes en la superficie de microorganismos, activando directamente funciones de defensa celular.

Al tratarse de un sistema inmune sin capacidad de memoria, el uso de vacunas no es práctico, mientras que el uso de antibióticos se encuentra restringido, dejando como

principal opción el uso de inmunoestimulantes y aditivos que mejoren la respuesta celular del camarón. La utilización de estos en la acuicultura está tomando popularidad; microorganismos de ipopolisacáridos (LPS), y peptidoglicanos han sido empleados como activadores del sistema inmune de los camarones incrementando las funciones de fagocitosis, melanización, encapsulación y coagulación. El sistema inmunológico de los crustáceos, está formada por las partes humoral y celular:

### **1. Humoral.**

Se encuentran varios componentes plasmáticos como lectinas, radicales libres, citosinas, chaperoninas, péptidos antimicrobianos, un sistema de profenoloxidasa, y la cascada de la coagulación que trabajan en conjunto para favorecer la destrucción de patógenos (13).

### **2. Celular.**

La celular esta mediada por los hemocitos que poseen capacidad citotóxica y comunicación intercelular que les permite llevar a cabo funciones las funciones de reconocimiento, coagulación, fagocitosis, melanización, formación de nódulos y encapsulación (10).

#### **2.2.8. Enfermedades del camarón.**

La presencia de enfermedades en los cultivos acuícolas es el principal obstáculo para una acuicultura exitosa. La influencia negativa de las condiciones ambientales afecta al sistema inmunológico del camarón, en donde el estrés se manifiesta inicialmente a nivel bioquímico y molecular, induciendo una serie de respuestas funcionales, y estructurales en la regulación hormonal, metabolismo, osmoregulación, y regulación inmunológica (16).

Estos factores hacen más susceptibles a infecciones ocasionadas por virus o bacterias presentes de manera natural en el medio de cultivo, aunque los organismos se muestren sanos al inicio del cultivo, inmediatamente después de un brote de estrés puede desencadenar en una mortalidad masiva (13).

##### **2.2.8.1. Enfermedades bacterianas más comunes.**

Las principales enfermedades en el desarrollo larvario del *L. vannamei* son de origen bacteriano y estas a su vez causan pérdidas considerables de población, si no son controladas a tiempo, uno de los patógenos principales que se encuentra en estos sistema

de cultivo son las bacterias del género *Vibrio*, presentes en casi todos los lugares donde se cultivan larvas (31).

Sin embargo, cabe acentuar que las infecciones que se presentan son originadas por bacterias oportunistas que atacan cuando las larvas se debilitan por algún factor biótico o abiótico (6).

Dentro de las enfermedades bacterianas destacan las siguientes:

- ❖ Estadios larvarios
- ❖ Bacterias luminiscentes
- ❖ Bolitas blancas ó Síndrome de Zoea II
- ❖ Epibiontes bacterianos

Adicionalmente otras enfermedades tales como *Baculovirus penaei* (BP), Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHNV), hongo de tipo *Lagenidium*, cuando estas se presentan en el cultivo ocasionan crecimientos deficientes, retrasos en muda, disparidad de tallas y mortalidad (7). Además de *Vibrios* al ser una de las enfermedades más peligrosas en crustáceos, puesto que tienen la capacidad de afectar en cualquier estadio del crecimiento del camarón, siendo su mortalidad dependiente del sitio u órgano afectado (32).

### **1. Síndrome de muerte temprana.**

Las especies de *Vibrios* se encuentran general en el cultivo de camarón como agentes oportunistas, una infección secundaria o como en este caso, un patógeno verdadero.

El síndrome de la muerte temprana (EMS), surgió en China en el año 2009, donde se detectaron mortalidades del 60 – 80%, y a pesar de que se desconocía el agente causal de la enfermedad, se la denominó síndrome de la muerte temprana, para el año 2011, fase aguda de la enfermedad, se le dio un nombre más descriptivo: síndrome de necrosis hepatopancreático agudo o AHPND. En el año 2013, se identificó que el agente causal de EMS, era la bacteria gran negativa de Tipo *Vibrio*, que al ser infectada por un bacteriófago, genera una toxina dañando mortalmente al camarón.

EMS es una enfermedad epidémica que altera el sistema digestivo de los camarones, afectando larvas de camarón después de los 20 – 35 días de cultivo, con mortalidades que pueden llegar al 100%. La patología de esta bacteria está limitada al hepatopáncreas y esta mediada por las toxinas Pir- A y Pir-B. Los signos clínicos en el camarón son visibles

después de los 10 días de infección, donde se puede observar un hepatopáncreas de color blanco pálido debido a la pérdida de pigmentos en las células R, así como una reducción del 50% de su tamaño, en la fase terminal de la enfermedad se observan manchas negras debido a depósitos de melanina por la actividad de hemocitos.

La enfermedad se presenta en tres fases:

- ❖ En fase aguda se observa pérdida de funcionalidad de las células epiteliales de almacenamiento y digestión de los tubos hepatopáncreáticos, mientras que en las células germinales dejan de dividirse y migran hacia el intestino.
- ❖ En la fase intermedia se genera melanización de los túbulos necrosados y
- ❖ En la fase terminal se generaliza la destrucción del hepatopáncreas por la acción de la bacteria.

### **2.2.9. *Vibrios*.**

El género *Vibrio*, son bacterias Gram negativas de tipo facultativo anaeróbico, con forma de bastón curvilíneo y un flagelo polar que pertenecen a la familia Vibrionaceae. Según Serrano, (32), los *Vibrios* habitan sectores marino costeros (entre la microbiota), y su distribución ambiental está regulada por factores como temperatura, salinidad, nutrientes del agua, etc (22).

Los camarones pueden contagiarse de *Vibrios* por medio de heridas o poros en el exoesqueleto, branquias e intestino medio a través de la ingesta de sedimento, agua y alimentos (12). Sin embargo su colonización puede ser favorable para el huésped. Los *Vibrios* en la naturaleza pueden estar en un estado inactivo o no ser capaces de crecer en los medios selectivos empleados (33).

Es decir, dentro del ecosistema marino los *vibrios* cumplen funciones importantes como biodegradación de la materia orgánica y regeneración de nutrientes, también actúan como patógenos de organismos acuáticos de importancia comercial, que bien pueden llegar afectar al hombre (16).

Es un género de bacterias que afectan a todas las especies de *Litopenaeus spp* en camarones juveniles y adultos; los síntomas más visibles, incluyen signos conductuales y clínicos producidos por la infección. La conducta de los camarones afectados puede incluir periodos de nado errático o desorientado, alternados con periodos largos de letargo. Los signos clínicos varían con el tipo de infección (17).

Entre las especies del *Vibrio* denominadas *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* son las más comunes que causan infecciones y enfermedades en *L. vannamei*. La mortalidad en la población de camarones es del 90% (34).

El género *Vibrio* se localiza en el tracto digestivo, branquias, cutículas y hemolinfa del camarón, provocando enfermedades como Vibriosis, Hepatopáncreas edematoso y necrótico en larvicultura y granjas. Reconociendo la existencia de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *Photobacterium* en piscinas y *V. harveyi* y *V. splendidus*, a nivel de laboratorios de larvas (Fig. 4) (14).



**Figura 4.** Bacteria *Vibrio spp.*  
Fuente: (26).

### 2.2.9.1. Tipos de *Vibrios*.

#### 1. *Vibrio alginolyticus*

Es un bacilo corto curvo o recto, Gram negativo quimiorganotrofico, móvil por flagelos peritricos y polares, es el más halófilico de todos ya que es capaz de crecer en concentraciones de 3, 6, 8 y hasta 10% de NaCl. Se aísla con frecuencia de aguas costeras templadas y tropicales, especialmente en cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C. El reservorio de este microorganismo lo constituyen las aguas (principalmente las saladas) y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar (22).

Utiliza como fuente de carbono y energía la D – glucosa y como fuente de nitrógeno, sales biliares, produce ácido a partir de: glucosa, maltosa, manitol y sacarosa. En cuanto a su morfología colonial, se describe en base a su crecimiento en agar tiosulfato citrato

sales biliares sacarosa (TCBS), como colonias de 2 a 4 mm de diámetro, de color amarillo, esto por la fermentación de la sacarosa presente en el medio, característica con la cual se clasifican como sacarosa positiva (35).

## **2. *Vibrio parahaemolyticus*.**

Es una bacteria de hábitat marino, Gram negativo, con un tamaño de 1.4 – 2.6  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.5 – 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, móvil, crece en condiciones de salinidad entre el 3 al 8 %, crece a temperatura entre 10°C – 44°C con una temperatura optima de 35°C – 37°C, en cuanto al pH varia de 5 a 11 con intervalo óptimo de 7.5 a 8.6, es anaerobio facultativo (tolera el oxígeno) (22).

Con metabolismo oxidativo y fermentativo, tiene como reservorios: sedimento, partículas suspendidas, plancton, pescados y mariscos (almejas, ostiones, camarón, calamar y cangrejo), se adhiere a las superficies de quitina (componente estructural de algunos mariscos, como es el caso de la superficie del camarón), sobre ellas incrementa su concentración, ya que los nutrientes para su utilización se encuentran más disponibles (13).

## **3. *Vibrio vulnificus*.**

Es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales, puede estar presente en alimentos de origen marino como los bivalvos (ostiones, almejas, entre otro), y pescados que tienen un importante papel en la transmisión de agentes etiológicos debido a que se consumen crudos o insuficientemente cocidos. Este microorganismo también está presente en el sedimento, plancton y otras formas de vida marina (36).

## **4. *Vibrio harveyi*.**

Es una bacteria marina Gram negativa, bioluminiscente del género *Vibrio*, tiene forma de bastón, es móvil (a través de flagelos polares), facultativamente anaeróbico, halófilo y es competente para el metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. Se puede encontrar nadando libremente en aguas marinas tropicales, en la microflora intestinal de animales marinos, y como patógeno primario y oportunista de los animales marinos, incluidos corales de *Gorgonia*, ostras, langostinos, róbalo común, rodaballo (37).

## **5. *Vibrio hollisae*.**

Es una especie halófila que recientemente fuere clasificada como *Grimontia hollisae*, Se sabe que este microorganismo ha estado asociado a casos de gastroenteritis, que van de moderados a graves por el consumo de alimentos marinos. Las bacterias *Grimontia hollisae* son Gram negativas, móviles por un flagelo polar y oxidasa positiva (38).

### **2.2.10. Ecología de los *Vibrios*.**

Toleran un amplio rango de salinidades, siendo el óptimo requerimiento de NaCl de ~ 2.0 a 2.5% (peso/ volumen). Algunas especies (halófilas) requieren al menos una concentración del 0.5% de NaCl en el medio para crecer, mientras que especies no halófilas como *V. cholerae*, *V. mimicus* o *V. hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (39).

En la naturaleza los *Vibrios* habitan en ambientes marinos, estuarinos y dulceacuícolas, en formas de vida que van desde planctónica dentro de la columna de agua, bentónica formando parte de sedimentos y al interior del tracto digestivo de organismos silvestres y cultivables (40).

Su distribución está marcada en función de gradientes físicos como temperatura, salinidad, nutrientes y componentes biológicos tales como, depredación y abundancia de dinoflagelados y hospedadores. Los *Vibrios* son más comunes en aguas que bordean los 17°C, aunque en aguas tropicales y subtropicales su presencia es baja (14).

En la etapa de engorde, el estanque es un sistema propicio para la interacción de las comunidades microbianas que se favorecen de nutrientes orgánicos e inorgánicos, y son susceptibles a fluctuaciones de los diferentes factores de control, con lo que pueden pasar de ser benéficos a tóxicos rompiendo el equilibrio y modificando su composición y número (35).

### **2.2.11. Inmunoestimulantes.**

Los inmunoestimulantes son sustancias de diverso origen que tienen la capacidad de regular o modificar la respuesta inmune, por lo que también se les conoce como inmunomoduladores o inmunopotenciadores y pueden ser definidos como un componente natural que modula el sistema inmune y que se ve reflejado por el incremento de la resistencia del hospedero contra enfermedades que son causadas por patógenos. El uso de

inmunoestimulantes como suplementos dietéticos, puede mejorar la defensa innata de los organismos y ofrecer resistencia a agentes patógenos en los períodos de alto estrés (10).

El efecto de los inmunoestimulantes puede ser cuantificado mediante parámetros inmunitarios. Su eficiencia se establece en función de la capacidad de alerta del sistema inmune sin desgastarlo, induciendo una respuesta persistente, por ejemplo una mayor proliferación de células inmunitarias más activas. Esta reacción puede generar un desgaste energético, por lo que es necesario evaluar la calidad de la respuesta inmune en términos de otros efectos tales como crecimiento o respuesta ante verdaderos desafíos microbianos (41).

#### **2.2.11.1. Características de la *Spirulina* sp.**

En otras palabras lograrla alerta del sistema inmune no implica necesariamente una mayor resistencia. Dentro de ello se encuentra el uso de la *Spirulina* sp (*Arthrospira platensis*), la cual es un alimento natural único de alta calidad, que posee una proteína de gran calidad con un buen perfil de aminoácidos, óptima para la producción acuícola (10).

Además no posee paredes celulares de celulosa lo que implica que no sea necesario un tratamiento previo para hacerla fácilmente digerible, como sería en el caso de la soja. Y por tanto posee una digestibilidad de la proteína de un 84% aproximadamente (41).

Actualmente uno de los métodos más utilizados por productores acuícolas para prevenir enfermedades en sus cultivos, es el uso de compuestos comerciales como inmunopotenciadores, inmunoestimulantes, o suplementos alimenticios que mejoran la salud, estos son considerados como un elemento estructural proveniente de un microorganismo, que basa su principio en la estimulación del sistema inmune innato para incrementar la resistencia a patógenos (14).

#### **2.2.11.2. Taxonomía.**

**Tabla 2.** Ubicación taxonómica de *Spirulina*.

<b>Dominio:</b>	<b>Bacteria</b>
Clase:	Cyanobacteria
Orden:	Oscillatoriales
Familia:	Oscilatoriaceae
Género:	<i>Spirulina</i>
Especie:	<i>S. máxima</i> (=Arthrospira)

Fuente: (41).

La espirulina se clasifica bajo el Orden Nostocales: las células dispuestas en hilos denominados tricomas, con una película mucilaginosa de mucopolisacáridos en lugar de la membrana celular predominantemente celulósica, como es característica de las células vegetales; sin un núcleo definido, dado que los ácidos nucleicos y otros componentes nucleares se encuentran distribuidos aleatoriamente en toda la masa celular (10).

#### **2.2.11.3. Importancia de *Spirulina sp.***

La *spirulina* porta más cualidades a los piensos, ya que algunos estudios en peces parecen demostrar que tiene propiedades estimuladoras del sistema inmune, así como del crecimiento (41). Lo que implicaría un menor uso de antibióticos y de materia prima en la producción, reduciendo costes tanto económicos como medioambientales. Entre los beneficios podemos destacar:

- ❖ Incrementa la tasa de crecimiento
- ❖ Mejora la calidad y coloración a la carne del pez.
- ❖ Aumenta la supervivencia.
- ❖ Efecto antioxidante.

Este tipo de beneficios no solo son importantes a nivel de producción industrial. En producciones pequeñas y artesanales tiene una fácil aplicación, ya que el cultivo de *spirulina* por los propios acuicultores es barata y fácil de implementar (11). Las investigaciones sobre el sistema inmune de camarón están motivadas por el interés de mejorar el crecimiento, supervivencia y control sobre las enfermedades que afectan a este organismo; siendo estos componentes de gran relevancia en la producción en sistemas de cultivo comercial de este crustáceo (10).

#### **2.2.11.4. La espirulina en el Ecuador**

La principal planta productora de espirulina de Ecuador, se encuentra en la sierra, a 30 kilómetros de Quito, en Pintag. El cultivo de esta microalga, reconocida por el Fondo de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el alimento más nutritivo del planeta, se realiza bajo un sistema único de unidades productivas, conformado por fosas de cultivo y piscinas bajo invernadero, que, después de un proceso de transformación dirigido, termina como un polvo verde azulado tonalidad que garantiza su pureza y calidad, que es exportado a

Estados Unidos, Colombia, Perú, Argentina, Bélgica, Francia, República Checa y Alemania (12).

Además el viejo sistema no garantiza la calidad del producto, por su exposición a la contaminación ambiental. La salud de las microalgas que crecen en la profundidad de las piscinas se ve afectada porque no están expuestas a la turbulencia por bombeo necesaria para que crezcan, además de que no reciben las cantidades de luz adecuada y no pueden deshacerse del oxígeno que producen, llevándolas a un estado oxidativo. También, el ambiente costero expone a la espirulina a una alta carga bacteriana (41).

#### **2.2.11.5. Condiciones de cultivo.**

##### **❖ Hábitat.**

Lo que diferencia el género espirulina, del resto de las cianobacterias, en su particular nicho ecológico, ya que estos microorganismos proliferan en aguas muy mineralizadas, extremadamente alcalinas y en ocasiones calientes. Estas condiciones excluyen a la mayoría de los seres vivos (45). El desarrollo de la espirulina, en este tipo de medios se debe a tres fenómenos:

- a. Al consumir los carbonatos y bicarbonatos de su medio, la espirulina, tiende a aumentar todavía más la alcalinidad del líquido llegando incluso a un pH 11.5.
- b. Como son altamente pigmentadas y a menudo flotantes, los filamentos de espirulina, forman una pantalla muy eficaz, que priva de luz solar a las raras algas que se pueden acomodar a su medio de cultivo.
- c. Se ha demostrado que la espirulina, es capaz de secretar moléculas proteicas como medio de defensa en su medio natural (14).

#### **2.2.11.6. Composición química de *Spirulina sp***

La composición química de la espirulina y su aceptación como alimento saludable, rico en proteínas, vitaminas y minerales, motivó a proponer su uso con niños desnutridos en diversas regiones. En América Latina, Ecuador es uno de los productores más importantes, aunque la producción en la región es mayoritariamente artesanal (41).

**Tabla 3.** Composición química de la espirulina.

<b>Componente nutricional</b>		<b>Porcentaje (%)</b>	
		<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Total Nitrógeno orgánico %		10.85	13.35
Total Nitrógeno proteico %		9.60	11.36
Proteínas crudas (%N ´ 6.25)		60.00	75.00
Relación eficiencia proteica %		2.2	2.6
Utilización neta proteica %		53.00	61.00
Digestibilidad %		83	84
Humedad residual %		4.0	7.0
Cenizas %		6.4	9.0
Proteína %		60.0	75.0
Fibra cruda %		0.1	0.9
Xantófilas g/kg de producto		1.4	1.8
Beta-caroteno g/kg de producto		1.5	1.9
Clorofila g/kg de producto		6.1	7.6
<b>Minerales</b>			
Calcio mg/kg		1045	1315
Fosforo mg/kg		7617	8942
Hierro mg/kg		475	580
Sodio mg/kg		275	412
Cloruros mg/kg		4000	4400
Magnesio mg/kg		1410	1915
Manganeso mg/kg		18	25
Zinc mg/kg		27	39
Potasio mg/kg		13305	15400
Otros mg/kg		36000	57000
Carbohidratos totales %		13.0	16.5
Lípidos totales %		6.0	7.0
<b>Ácidos grasos</b>	Total ácidos grasos %	4.9	5.7
	Laurico (C12) mg/kg	180	229
	<b>Saturados</b> Mirístico (C14) mg/kg	520	644
	Palmítico (C16) mg/kg	16500	21141

	Esteático (C18) mg/kg	trazas	353
	Palmitoleico (C16) mg/kg	1490	2035
	Palmitolinoleico (C16) mg/kg	1750	2565
	Heptadecanoico (C17) mg/kg	90	142
<b>No saturados</b>	Oleico (C18) mg/kg	1970	3009
	Linoleico (esencial) mg/kg	10920	13784
	d - Linoleico (esencial) mg/kg	8750	11970
	a - Linoleico mg/kg	699	7000

Fuente: (41).

#### **2.2.11.7. Perfil de aminoácidos**

En estado seco -es decir, tal como se la consume- contiene entre el 60-70 % de proteínas (es el alimento de mayor contenido proteico conocido) distribuidas de acuerdo a un perfil cualitativo y cuantitativo excepcional y compuestas por aminoácidos esenciales y puede decirse que la espirulina es un complemento nutricional ideal (46).

### 2.3. Investigaciones relacionadas.

*Estudios de Morales (42), relataron que los ambientes de cultivo han sido invadidos por bacterias oportunistas en general del orden de las Vibrionaceas del género Vibrio y como también las Aeromonas. Junto a esto, la combinación de un manejo inadecuado y una mayor densidad de siembra, tanto intensiva y semi-intensiva, promueve una reducción en la calidad del agua de los cultivos, lo que lleva a los cambios ambientales que generan estrés en los animales con alteraciones en el sistema inmune, que puede resultar en la aparición de enfermedades.*

*De acuerdo al trabajo realizado por Álvarez et al. (43), en los ejemplares analizados se encontró áreas melanizadas en el exoesqueleto relacionadas con la presencia de Vibrios spp y Vibrio harveyi predominando esta última.*

*En estudios realizados por Aguirre et al. (40), observaron que concentraciones de V. harveyi en el agua de  $10^5$  y  $10^7$  UFC/mL<sup>-1</sup> provoca una sobrevivencia baja en larvas de Litopenaeus vannamei, siendo la última dosis la que presentó los valores más bajos de sobrevivencia. Además, en los sub-estadios larvarios y en el de post-larva fueron más resistentes a este patógeno al aumentar la edad de los mismos.*

*Morales et al. (44), detectaron la necrosis del hepatopáncreas séptico (NHP-S), en ocho regiones de Latinoamérica con prevalencia promedio de 19.05%. Los organismos que presentaron esta enfermedad estuvieron asociados con una o dos especies de bacterias en la hemolinfa y hepatopáncreas ( $1 \times 10^5$  UFC), observándose Vibrio campbellii, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio brasiliensis y Streptococos spp., con infiltración de hemocitos, nódulos hemocíticos con cúmulos de bacterias en el centro, hipertrofia del lumen, melanización, necrosis, atrofia (de moderada a severa) de los túbulos del hepatopáncreas y desprendimiento celular. La infiltración de hemocitos y la formación de nódulos hemocíticos con presencia de colonias de bacterias se apreciaron también en corazón, branquias, órgano linfoide, tejido conectivo, músculo y ciegos hepáticos, alcanzando en general una prevalencia de 10,3% con grados de severidad 2 y 3.*

*García et al. (45), encontraron actividad antibacteriana significativa de cianobacterias contra Vibrio alginolyticus y V. parahaemolyticus y una baja toxicidad contra el crustáceo Artemia salina. Sin embargo, su uso como potencial probiótico para la larvicultura de camarón no fue evaluada.*

*Igualmente, Rivera & Rodríguez (46), en su trabajo utilizaron una combinación de cinco ácidos orgánicos (ACID5FIVE) en dos camaroneras (Isla Puná e Isla los Chalenes), expresando que no se encontraron síntomas de camarones enfermos o mortalidades masivas; revelando que el uso de ACID5FIVE tiene un 95% de significancia en el rendimiento de su cosecha, tasa de conversión alimenticia y supervivencia. El estado de salud larval mejora en los tratamientos con probióticos a diferencia del testigo, donde se encontró la mayor cantidad de protozoarios. Tendencia que corresponde por lo establecido, quienes no registraron síntomas, enfermedad o mortalidad masiva con un 95 % de significancia en el rendimiento de su cosecha. A diferencia de (47), cuyos resultados mostraron resistencia a un antibiótico y ninguno de los patógenos habría tenido sensibilidad a probióticos comerciales*

*Sobre el asunto de profundizar el cultivo de *L. vannamei* en jaulas durante doce semanas para probar cuatro tratamientos de alimentación, donde el tratamiento con probióticos fue superior a todos, el tratamiento con ácidos orgánicos fue superior al control, pero inferior al de probióticos, finalmente la combinación de ácidos orgánicos y probióticos no aportó mejores resultados frente al uso individual del probiótico (48).*

*Al mismo tiempo el uso de aceites esenciales y prebióticos Aquavianca como aditivo en el balanceado, mejora formidablemente la sobrevivencia y desarrollo a los 112 días de cultivo, los resultados mostraron un incremento del 8% del peso promedio usando el aditivo y una reducción del 24 % del factor de conversión alimenticia con respecto a los controles (49).*

*Al respecto, estudios realizados por Guzman et al. (50) con camarones (*P. vannamei*) y lenguado (*Paralichthys olivaceus*) cultivados en sistemas de recirculación y con probióticos, demuestran que los individuos presentan una tasa de supervivencia y crecimiento superior; en tal caso, la biología microbiana de estos sistemas de producción todavía se investiga de manera ineficaz y requiere una comprensión superior en cuanto a los benéficos relacionadas con la utilización de probióticos. El mayor valor se registró en el tanque B con 92,30 % en PL 3 disminuyendo hasta 84,80 % en PL 9 y 12; el tanque testigo presento bajas sobrevivencia, entre 61 al 47,45 %, determinándose diferencias significativas. La sobrevivencia en las larvas de camarón que se desarrollaron con la combinación del Activo Aqua + Salgard fue superior a la registrada con el otro*

*tratamiento y el testigo, coincidiendo con (51), quienes en sus resultados también obtuvieron mayor supervivencia al utilizar este tipo de combinaciones de probióticos.*

*Flores et al. (52), observaron que la adición de la mezcla probada en el alimento en *L. vannamei*, causa inmunoestimulación en *L. vannamei* retado con *Vibrio sinaloensis*. Observaron un incremento significativo en el número total de hemocitos cuando se alimentaron diariamente, pero no así cuando se alimenta cada tres y seis días. Sin embargo, la supervivencia fue significativamente mayor respecto al control cuando se alimentaron cada 3 días. Además, demostraron la actividad de 9 enzimas hidrolíticas en el plasma y 6 en el sobrenadante de lisado de hemocitos.*

*Rojas et al. (2013), identificaron la presencia de *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* en todas las muestras, es decir en 13 de 20 muestras que representan el 65% y solo 7 fueron negativas para el aislamiento de esta bacteria. *V. Parahaemolyticus* se aisló en una mayor cantidad con un máximo valor de  $2 \times 10^4$  UFC, en cambio para *V. cholerae* el valor máximo obtenido fue de  $4 \times 10^3$  UFC. El ambiente marino desarrolla las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de diferentes especies de Vibrios, sin embargo en este estudio se observó alta prevalencia de *V. cholerae**

*Por otro lado, Abarca (56) evaluó la ( $CL_{50}$ ) o concentración letal media en dosis de Nitrato de Plomo aplicadas en postlarvas de camarón (*Litopenaeus vanammei*) y se determinó mediante el análisis estadístico Probit que la dosis que causó la muerte estuvo en 0.58 mg/l de  $(NO_3)_2Pb$ , determinado por el mayor número de animales muertos. En la prueba de toxicidad, en las postlarvas expuestas a las soluciones de nitrato de plomo se observó una natación confusa en círculos y choques continuos en las paredes de los recipientes.*

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.**

### 3.1. Localización.

La investigación se realizó en el campus universitario “La María”, en los predios de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicada en el km 7 ½ de la vía Mocache, provincia de Los Ríos, cuyas coordenadas son 1° 06 s de Latitud Sur y los 79° 29 s de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical.

**Tabla 4.** Características agrometeorológicas de la finca experimental “La María”.

<b>Datos agrometeorológicos.</b>	<b>Valores medios.</b>
Temperatura promedio:	26°C
Humedad relativa:	87.77 %
Heliofanía:	915 horas/luz/año
Precipitación anual:	2271.14 m.m
Topografía del terreno:	Plana
Zona ecológica	Bh -T

Fuente: (55).

### 3.2. Tipo de investigación.

La investigación que se desarrolló tributa a la línea de investigación: Desarrollo de sistemas de producción que promuevan el uso eficiente de los recursos.

### 3.3. Método de investigación.

El método de investigación que se llevó a cabo la presente investigación corresponde al siguiente:

- ❖ **Método exploratorio y experimental.-** este método consistió en evaluar los efectos de las variables estudiadas, mediante la aplicación del análisis estadístico, y permitió realizar un análisis general con la información obtenida, emitiendo conclusiones partiendo de los hechos o resultados encontrados.

### 3.4. Fuentes de recopilación de la información.

- ❖ **Primarias.-** corresponden a la observación directa del camarón blanco.
- ❖ **Secundarias.-** se describen en la búsqueda de información de libros, revistas científicas, entre otras, que serán utilizadas para discutir los hallazgos o resultados derivados de la investigación.

### 3.5. Diseño de la investigación.

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco tratamientos (Testigo 1 Negativo a Vibrio), Testigo 2 (Positivo a Vibrio), Balanceado con 2, 4 y 6% de *Spirulina sp*) con tres repeticiones (tres peceras con dimensiones de 25 x 35 m, y una capacidad de 9 litros por pecera). Se utilizaron 50 camarones por pecera. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se aplicó la prueba de rangos múltiple de Tukey al 5% de probabilidad. El modelo estadístico, bajo el cual se analizaron las variables de respuesta, es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = el modelo total de una observación.

$\mu$  = medida de la población

$T_i$  = Efecto "i-ésimo" de los tratamientos

$E_{ijk}$  = Efecto aleatorio (error experimental)

**Tabla 5.** Esquema del análisis de la varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	
Tratamiento	t-1	4
Error experimental	t x (r - 1)	10
Total	t x r - 1	14

#### 3.5.1. Tratamientos.

Los tratamientos se describen en la tabla 6:

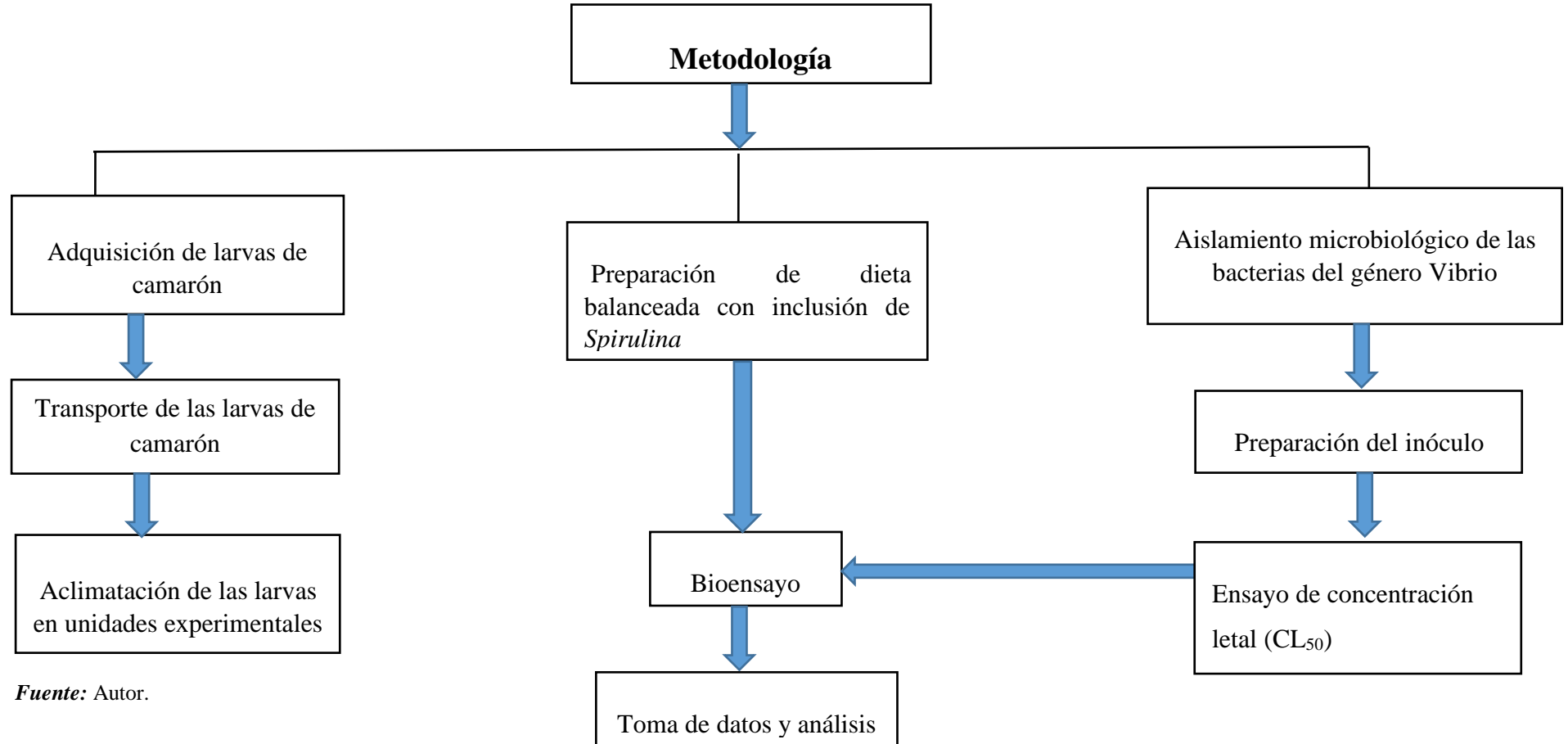
**Tabla 6.** Detalle de tratamientos

Tratamientos	Descripción tratamientos
T1	(-) Testigo 1 (Negativo a Vibrio)
T2	(+) Testigo 2 (Positivo a Vibrio)
T3	Balanceado con 2% <i>Spirulina sp</i>
T4	Balanceado con 4% <i>Spirulina sp</i>
T5	Balanceado con 6% <i>Spirulina sp</i>

### 3.6. Instrumentos de investigación.

#### 3.6.1. Sistema de flujos

El sistema de flujos que se realizó para esta investigación se muestra en el siguiente esquema:



*Fuente:* Autor.

### **3.6.2. Procedimiento experimental.**

#### **❖ Dieta balanceada con inclusión de *Spirulina*.**

Se utilizó alimento balanceado comercial (LORICA – Alimento balanceado para camarones 35%) molido y constituido con *Spirulina sp* al 2, 4 y 6% y aglutinado con grenetina. Se utilizó 150 g de balanceado puro para cada dieta, añadiendo 2, 4 y 6% de *Spirulina*.

Luego para peletizar esta mezcla se añadió grenetina (5 g por cada dieta), disuelta en agua formando una masa homogénea, la misma que fue colocada en una jeringa para formar los pallets, para luego ser secados al aire libre por 48 horas. Una vez seco se procedió a cortar la medida requerida (3 mm) para facilitar la alimentación de los organismos. Todas las dietas se hicieron de la misma manera pero con diferentes cantidades experimentales.

#### **❖ Obtención y climatización de camarones.**

Se obtuvieron un total de 250 camarones con un peso aproximado de 5 g, de la granja comercial “Torres” ubicada en el cantón Posorja, provincia del Guayas. Los camarones fueron transportados al laboratorio de Acuicultura de la finca Experimental La María de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, UTEQ. En un recipiente con agua salina y aireación constante. El tiempo de aclimatación de los camarones fue de 7 días en agua marina a 35 UPS de salinidad y una temperatura de 27 °C.

#### **❖ Aislamiento microbiológico.**

1. Se seleccionaron de manera aleatoria 10 camarones en la etapa adulta, se diseccionaron y se extrajo el intestino, el cual, con ayuda de una aza bacteriológica se realizó un raspado intestinal. El inóculo se colocó en diluciones seriadas en factores de 1:1 a 1:10 con agua salina al 0.9 %. De cada dilución se tomaron 20 µL y se cultivaron en cajas Petri con el medio selectivo TCBS. Las bacterias fueron incubadas durante 24 horas y posteriormente, seleccionadas y aisladas para los retos de los bioensayos.

#### **❖ Preparación del inóculo de bacterias patógenas del género *Vibrio*.**

Las bacterias se sembraron en agar tripticasa de soya (TSA) para su reactivación, después de 24 h se resembraron por crecimiento masivo múltiple en medio líquido.

El pelet fue lavado y resuspendido en una solución salina (3% NaCl) estéril, hasta llegar a una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 540 nm. Posteriormente, de esta solución se realizaron diluciones y se sembró en TCBS (Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) para conteos y determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro. Previamente al bioensayo se retó (con una duración aproximada de 816 horas) con las bacterias patógenas y se determinó la concentración letal, 50% para determinar la concentración necesaria para someter los camarones a las bacterias patógenas (54).

#### ❖ **Concentración letal, 50%**

Se tomaron 10 organismos por cada dosis a probar de bacterias patógenas del tipo Vibrio aisladas microbiológicamente a una concentración ( $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$  cel/mL) y un blanco experimental. Las bacterias se agregaron directamente a las peceras. Los camarones se revisaron cada seis horas registrando los cambios de comportamiento, coloración y supervivencia. Toda el agua utilizada durante el bioensayo, alimento no consumido y las mudas fueron desinfectadas con pastillas de hipoclorito de sodio durante 24 horas. Los organismos muertos, cajas Petri, tubos de ensayo expuestos al crecimiento bacteriano fueron esterilizados. Para ello se utilizó la siguiente formula:

$$y = ax + b$$

**Donde:**

❖ **a**= log concentración

❖ **b**= Valor probit

❖ **x**= incógnita  $CL_{50}$

$$y = 5.68 x + (-0.09)$$

$$5 = 5.68 x + 0.09$$

$$5 + 0.09 = 5.68 x$$

$$x = (5 + 0.09) / 5.68$$

$$0.89612676$$

$$CL_{50} = \text{Antilog } 10^{0.89} =$$

$$CL_{50} = 7.6$$

### ❖ **Bioensayo.**

Se evaluaron el efecto de las dietas balanceadas con la inclusión de *Spirulina sp.*, adicionadas al 2, 4 y 6%, al someter los camarones con bacterias patógenas tipo *Vibrio*. Los camarones fueron alimentados con el alimento funcional durante una semana antes del bioensayo. Posteriormente, fueron sometidos con un total de  $1 \times 10^8$  UFC de bacterias tipo *Vibrio* vertidas directamente en el medio para seguidamente anotar los resultados referentes a mortalidad acumulada y supervivencia.

Se cultivó con agua estéril de mar a 35 UPS y  $27 \pm 1$  °C de temperatura con una línea de aireación constante y un difusor de aire. Las larvas de los camarones fueron colocadas durante el experimento, se recambió el 50% de agua a todas las peceras experimentales cada dos días.

### ❖ **Respuestas determinadas.**

#### **Composición química de las dietas**

**1. Humedad.-** Para la determinación de humedad Inicial se aplicó la siguiente fórmula:

$$H = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la Muestra (gr.)

$W_1$  = Peso de la funda más la muestra después del secado.

$W_2$  = Peso de la funda más la muestra antes del secado

#### **2. Ceniza**

$$C = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

$W_0$  = Peso de la Muestra (g)

$W_1$  = Peso del crisol vacío.

$W_2$  = Peso del crisol más la muestra calcinada.

### 3. Grasa

$$G = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

G = Porcentaje de grasa

W<sub>0</sub> = Peso de la muestra

W<sub>1</sub> = Peso del vaso beaker vacío

W<sub>2</sub> = Peso del vaso más la grasa

### 4. Energía

$$Hg = \frac{T_w - e_1 - e_2 - e_3}{m}$$

Hg = Calor de combustión Cal/gr.

T = Temperatura final – Temperatura inicial

W = Energía equivalente del calorímetro 2410,16

e<sub>1</sub> = Mililitros consumidos de sol. Carbonato de Sodio

e<sub>2</sub> = (13.7 X 1.02) peso de la pastilla

e<sub>3</sub> = cm. del alambre restante X 2.3

m = Peso de la pastilla

### 5. Proteína bruta

$$\%PB = \frac{(V_{HCl} - V_b) \cdot 1.401 \cdot N_{HCl} \cdot F}{g. \text{ muestra}}$$

**Siendo:**

1.401 = Peso atómico del nitrógeno

NHCl = Normalidad de Ácido Clorhídrico 0.1 N

F = Factor de conversión (6.25)

VHCl = Volumen del ácido clorhídrico consumido en la titulación

Vb = Volumen del Blanco (0.3)

### 6. Fibra bruta

$$\% \text{Fibra bruta} = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100$$

**CL<sub>50</sub>.**- Con el método Dosis-Respuesta (PROBIT) se obtuvieron las concentraciones letales medias CL<sub>50</sub>, con sus límites de confianza al 95%; teniendo en cuenta el coeficiente de determinación más alto se escogió el modelo de mayor ajuste para estas; se realizaron gráficas de CL<sub>50</sub> (mortalidad vs. concentración) para 24, 48, 72, 96 y 120 horas en todos los casos, donde se graficaron valores desde 96 horas, se ajustó la curva con la ecuación respectiva en cada tiempo de exposición. La regresión lineal por mínimos cuadrados ordinarios, se determinó tanto para las ecuaciones de toxicidad como para el tiempo letal medio, cada uno de estos análisis con sus límites de confianza (56).

**Supervivencia.**- El muestreo de supervivencia se realizó con el objetivo de conocer cuántos camarones sobrevivieron al final del experimento por unidad experimental. A través de la siguiente fórmula (55).

$$\% \text{ *Supervivencia* } = \frac{\text{Total de csmarones}}{\text{Número de camarones finales}} * 100$$

**Mortalidad acumulada:** la mortalidad acumulada se midió cada 24 horas después de la infección con las bacterias patógenas de tipo Vibrio, a través de la siguiente fórmula (56):

$$\% \text{ *Mortalidad acumulada* } = \frac{\text{Número de camarones muertos}}{\text{Total de csmarones}} * 100$$

### **3.7. Tratamientos de los datos.**

Para la recolección de los datos y estudio de cada una de las variables se utilizó una libreta de campo, para proceder a realizar los análisis se hizo uso de una base de datos en una hoja electrónica (Excel) y al software estadístico. El análisis estadístico se lo realizó con la ayuda del software estadístico Statical American System (SAS).

### **3.8. Recursos humanos y materiales.**

#### **3.8.1. Recursos humanos.**

- ❖ Estudiante: Frank Javier Castellano Araujo
- ❖ Tutora: Dra. Ana Ruth Álvarez Sánchez
- ❖ Laboratorista: Ing. Erick García

### **3.8.2. Equipos.**

- ❖ Kit de disección
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Mechero
- ❖ Matraz de Erlenmeyer
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Centrifuga
- ❖ Autoclave

### **3.8.3. Materiales de oficina.**

- ❖ Libro de campo
- ❖ Lápices
- ❖ Computadora
- ❖ Impresora
- ❖ Cámara fotográfica.

### **3.8.4. Material productivo.**

- ❖ Camarón blanco.

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados y discusión.

### 4.1.1. Análisis bromatológico

**Tabla 7.** Composición química de las dietas

Composición	Porcentajes		
	T3 (Balanceado con 2% <i>Spirulina sp</i> )	T4 (Balanceado con 4% <i>Spirulina sp</i> )	T5 (Balanceado con 6% <i>Spirulina sp</i> )
Humedad	11.51	12.25	12.18
Proteína	39.96	45.19	46.89
Grasa	7.27	7.41	7.59
Fibra	3.56	3.98	4.42
Ceniza	12.44	12.52	12.67

De acuerdo a los resultados encontrados, el mayor porcentaje de humedad (12.25%) lo reportó el T4 (Balanceado con 4% *Spirulina sp*).

El mayor contenido de proteína en la dieta fue para el T5 (Balanceado con 6% *Spirulina sp*), con 46.89%.

En cuanto al mayor contenido de grasa registrada en las dietas fue para el T5 (Balanceado con 6% *Spirulina sp*), con 7.59%.

La fibra obtuvo el mayor porcentaje en el T5 (Balanceado con 6% *Spirulina sp*), con 4.42%.

Los valores de ceniza fueron más altos en el T5 (Balanceado con 6% *Spirulina sp*), con 12.67%.

#### 4.1.2. CL<sub>50</sub>

La evaluación de la dosis letal media (CL<sub>50</sub>) indicó que valores por encima de 7.76 corresponden a la dosis letal; es decir entre las concentraciones de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$ , cuyos valores se aproximan al 50% (Tabla 8).

La cepa de bacterias patógenas tipo *Vibrio* aislada de intestino de camarón presenta mortalidades en concentraciones superiores a  $1 \times 10^3$  observando una tendencia exponencial en la mortalidad al aumentar la concentración de bacterias añadidas (Figura 6).

Abarca (56), en su estudio sobre la CL<sub>50</sub> o concentración letal media aplicadas en postlarvas de camarón (*Litopenaeus vanammei*) registró concentraciones entre 0.55mg/L a 0.61 mg/L de (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pb estableciéndose que las dosis promedio entre las repeticiones, fluctuó en 0.56 mg/L de (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pb, es decir  $10^6$ . La concentración media letal dependerá del tipo de contaminante o patógeno a utilizar.

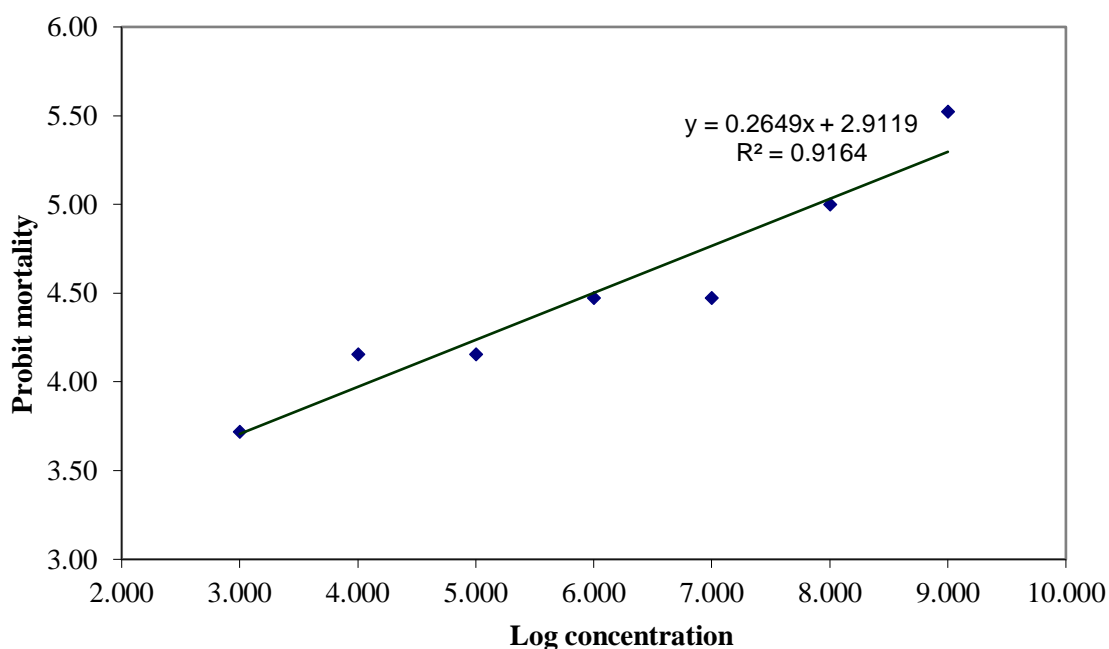
**Tabla 8.** Determinación de CL<sub>50</sub> de bacterias patógenas de tipo *Vibrio* por medio del método Probit en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

Tratamiento	Concentración cel/mL	Log10 UFC/mL	Log10 Concentración	Total ind	# Muertos	% Mort	Probit
1	Testigo	0	0	10	0	0	0
2	$1 \times 10^1$	1	0	10	0	0	0
3	$1 \times 10^2$	2	0.301	10	0	0	0
4	$1 \times 10^3$	3	0.477	10	1	10	3.72
5	$1 \times 10^4$	4	0.602	10	2	20	4.16
6	$1 \times 10^5$	5	0.698	10	2	20	4.16
7	$1 \times 10^6$	6	0.778	10	3	30	4.48
8	$1 \times 10^7$	7	0.845	10	3	30	4.48
9	$1 \times 10^8$	8	0.903	10	4	40	4.75
10	$1 \times 10^9$	9	0.954	10	5	50	5
11	$1 \times 10^{10}$	10	1	10	7	70	5.52

\*Tto= Tratamiento. \*%Mort= Mortalidad. \*Total ind= Total individuos.

$$CL_{50} = \text{Antilog } 10^{0.89} =$$

$$CL_{50} = 7.6$$



**Figura 6.** Mortalidad Probit con diferentes concentraciones de bacterias tipo *Vibrio*.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica que la concentración bacterias patógenas tipo *Vibrio* influye en el 82% del 50% de la mortalidad de los organismos infectados. Cabe mencionar que los datos se ajustaron mejor en un modelo lineal; sin embargo no existen reportes para comparar los resultados.

#### 4.1.3. Mortalidad acumulada.

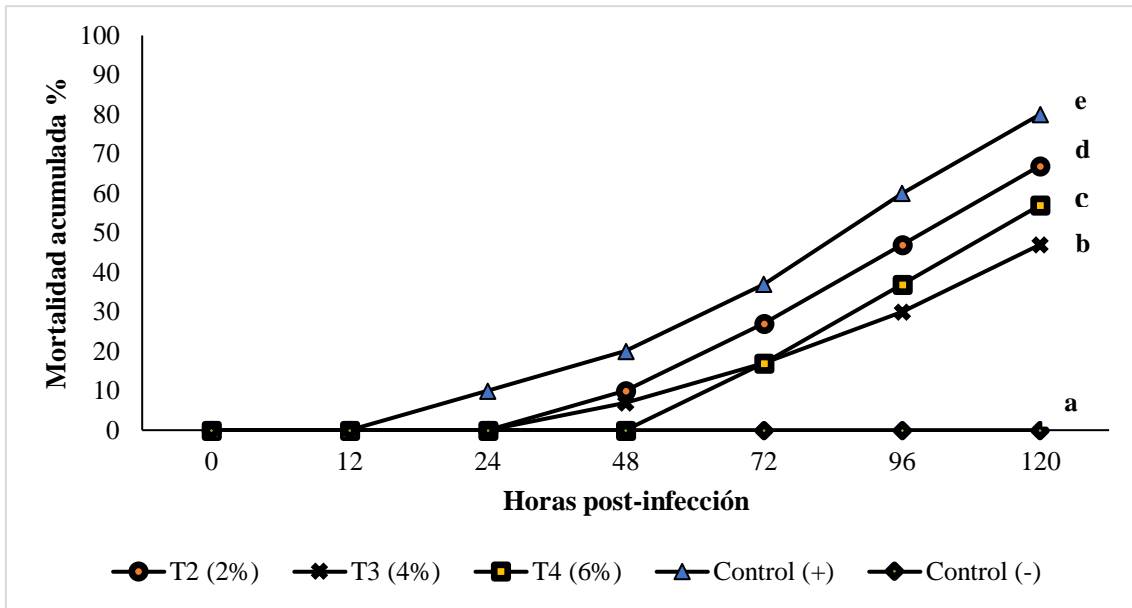
Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad acumulada fue el tratamiento T3 (Balanceado con 2% *Spirulina sp*) con el 67%, y menor mortalidad presentado fue T4= (Balanceado con 4% *Spirulina sp*) con el 47% de mortalidad, en cuanto a los controles experimentales se observó que el control negativo (Sin bacterias patógenas) presento el 0% de mortalidad mientras que, el control positivo a la bacterias patógenas presento una mortalidad acumulada del 80% (Tabla 9).

Estos resultados fueron similares a los reportados por Rivera y Rodríguez (46), quienes utilizaron una combinación de cinco ácidos orgánicos dentro del alimento peletizado, expresando que no se encontraron síntomas de camarones enfermos o mortalidades masivas; revelando un 5% de significancia en la mortalidad de camarones, sin embargo, la sobrevivencia en las larvas de camarón que se desarrollaron con la combinación del Activo Aqua + Salgard fue superior a la registrada por el testigo, concordando con Díaz et al. (51), quienes en sus resultados también obtuvieron una mayor supervivencia al utilizar este tipo de combinaciones de probióticos en el alimento.

El estado de salud larval, mejoró en los tratamientos con probióticos a diferencia del testigo, donde se encontró la mayor cantidad de protozoarios, tendencia que corresponde con Sotomayor et al. (47), cuyos resultados mostraron resistencia a los patógenos, puesto que ninguno habría tenido sensibilidad a probióticos comerciales.

**Tabla 9.** Resultados del bioensayo reto con bacterias patógenas del tipo *Vibrio*.

Bioensayo										
Tiempo de exposición y mortalidad										
Tratamiento	Descripción	Vibrio UFC/mL	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120h	Total	Porcentaje de mortalidad
T0	Testigo (-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0 <sup>c</sup>
T1	Testigo (+)	1 x 10 <sup>8</sup>	0	3	3	5	7	6	24	80 <sup>a</sup>
T2	Balanceado con 2% <i>Spirulina sp</i>	1 x 10 <sup>8</sup>	0	0	3	5	6	6	20	67 <sup>b</sup>
T3	Balanceado con 4% <i>Spirulina sp</i>	1 x 10 <sup>8</sup>	0	0	2	3	4	5	14	47 <sup>d</sup>
T4	Balanceado con 6% <i>Spirulina sp</i>	1 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	5	6	6	17	57 <sup>c</sup>



**Figura 7.** Mortalidad acumulada a través del tiempo experimental por tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) con la prueba de Tukey.

#### 4.1.4. Supervivencia.

El tratamiento con mayor supervivencia fue el tratamiento T3= (Balanceado con 4% *Spirulina sp*), con el 53% de supervivencia el cual, presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con los demás tratamientos. Siendo el tratamiento T4= (Balanceado con 6% *Spirulina sp*) quien presentó valores más bajos de supervivencia con el 43% (Figura 8). Referente a los controles, el control negativo a la exposición de bacterias patógenas sobrevivieron el 100% mientras que, el control positivo a las bacterias patógenas a una concentración de  $1 \times 10^8$  se observó una supervivencia del 20%, infiriendo que la cepa utilizada tiene una alta mortalidad en altas concentraciones, además de ocasionar problemas de salud en los camarones.

Los resultados indicaron más del 50% de supervivencia con la adición de 4% de *Spirulina* en la dieta, por cuanto representa una alternativa de alimentación y evitar o minimizar la presencia de patógenos, no obstante los organismos presentar signos clínicos durante la exposición con bacterias patógenas del tipo *Vibrio*, correspondientes a enrojecimiento del cuerpo (patas rojas), letargia, nado errático en el borde y en la superficie de los estanques, además de reducción en la alimentación.

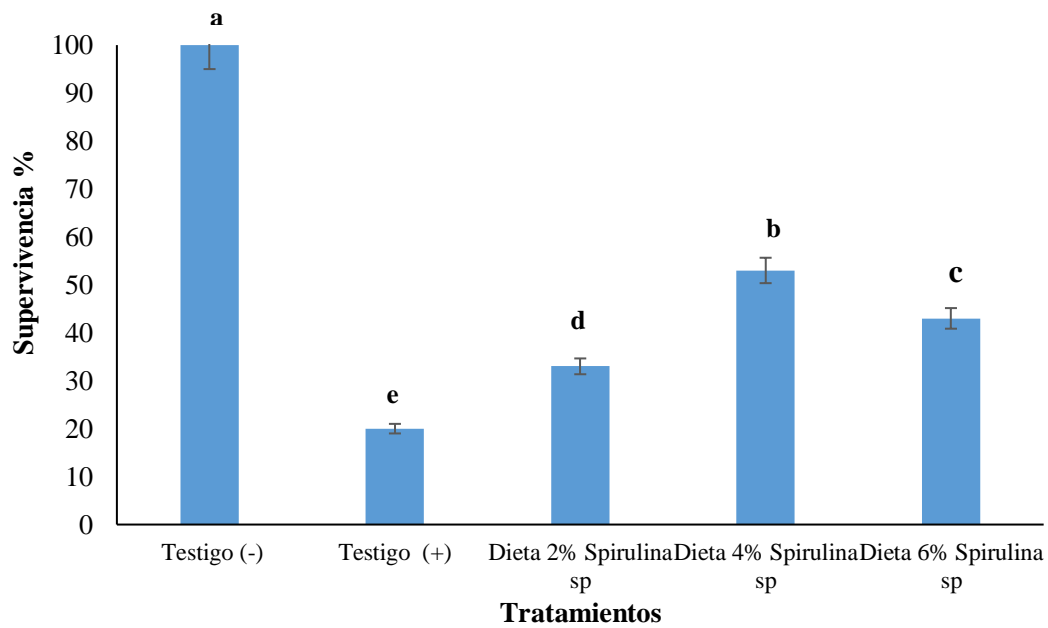
Resultados similares fueron los reportados por Álvarez et al. (43), quienes encontraron áreas melanizadas en el exoesqueleto relacionadas con la presencia de *Vibrios spp* con predominancia de *Vibrio harveyi*. Así mismo Aguirre et al. (40), observaron que concentraciones de *V. harveyi* en el agua de  $10^5$  y  $10^7$  UFC/mL provoca una sobrevivencia baja en larvas de *Litopenaeus vannamei*, sin embargo; los sub-estadios larvarios y en el de post-larva fueron más resistentes a este patógeno al aumentar la edad de los mismos.

Por su parte, García et al. (45), encontraron actividad antibacteriana significativa de cianobacterias contra *Vibrio alginolyticus* y *Vibro parahaemolyticus* y una baja toxicidad contra el crustáceo *Artemia salina*.

Así mismo, Siguencia (49), el uso de aceites esenciales y prebióticos Aquavianca como aditivo en el balanceado en la producción de *Litopenaeus vannamei*, mejora considerablemente la sobrevivencia a los 112 días de cultivo.

Al respecto, estudios realizados por Guzman et al. (50) con camarones (*P. vannamei*) y lenguado (*Paralichthys olivaceus*) cultivados en sistemas de recirculación con

probióticos, demostraron que los individuos presentaron una tasa de supervivencia superior al 50%.



**Figura 8.** Supervivencia del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), bajo el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de tipo *Vibrio*. Las letras diferentes presentan diferencias significativas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones.

De acuerdo al análisis realizado, surgen las siguientes conclusiones:

- ❖ Los valores más altos en la composición química de las dietas los obtuvo el T3 (Balanceado con 6% *Spirulina sp.*).
- ❖ La dosis letal media (CL<sub>50</sub>) de la cepa de *Vibrio colera* aislada del intestino de camarón fue de concentración 1x10<sup>8</sup>.
- ❖ La dosis de *Spirulina* incluida en el alimento balanceado que presentó mejores resultados fue la del 4%.
- ❖ La protección brindada fue del 53% con el uso de balanceado más 4% *Spirulina sp.*

## 5.2. Recomendaciones.

En consideración de los resultados obtenidos durante la presente investigación, se aconseja lo siguiente:

- ❖ Considerar aumentar el tiempo del bioensayo para mejorar el análisis en cuanto a dosis letales en camarones adultos.
- ❖ Continuar con investigaciones con el uso de *Spirulina* en la dieta de camarones para mejorar su rendimiento y evitar pérdidas en el sector camaronero. Considerando el uso de *Spirulina* para combatir el ataque de bacterias patógenas en el sector camaronero, debido a que los costos de aplicación no representan un monto relativamente alto, si se considera la producción a obtener.
- ❖ Considerar los valores de mortalidad de camarones expuestos a bacterias patógenas de tipo *Vibrio* en la toma de decisiones para la búsqueda de alternativas que ayuden a mitigar estos impactos negativos en el sector acuícola.

**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Bibliografía.

1. CNA. (Camara de Acuicultura del Ecuador). 77: 52-53. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura. 2009.
2. FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). El estado mundial de la pesca y acuicultura: Oportunidades y desafíos. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014.
3. Martínez E. Aspectos fisiológicos de los camarones. UNAN-León. Pág. 8. 2009.
4. Barreto F. Crecimiento de camarones *Litopenaeus vannamei* asociado a factores de manejo. Pág. 2. 2003.
5. Spann K, Donaldson R, Cowley J, & Walker P. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. 42: 221-225. Dis. Aquat. Organ. 2000.
6. Wyban J & Sweeney J. Intensive shrimp grow out trials in a round pond. 76: 215-225. Aquaculture. 2009.
7. Aguirre G, Lopez E, & Vázquez M. Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobre vivencia de larvas de *Litopenaeus vannamei*. 4 (2), 121-127. Scientia Agropecuaria. 2013.
8. Trujillo T, y Aguirre G. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio sp.* en juveniles de camarón blanco del Pacífico. (27):12–13. Ciencia y Mar. 2005.
9. Garrity G, Brenner D, Krieg N & Stanley J. Bergey's manual of systematic bacteriology. The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer. 2005.
10. Bricknell I & Dalmo R. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. 457-472. Fish & Shellfish Immunology. 2005; 19(5).
11. Peña A. Salsas dietéticas a base de microalgas. 1-4. Patentscope. 2001.
12. Tacon G. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. 2004.

13. Atwood H, Young S, Tomasso J & Browdy C. Survival and growth of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low salinity and mixed salt environments. 34: 518-523. Journal of the World Aquaculture Society. 2003.
14. Mugnier C, Justou C, Lemonnier H, Patrois J, Ansquer D y Goarant C. Evaluación de los parámetros biológicos, fisiológicos, inmunológicos y nutricionales en camarones *Litopenaeus stylirostris* afectados por vibriosis. 388-391: 26-31. Acuicultura. 2013.
15. Castille F, Samocha T, Lawrence A, He H, Frelier P & Jaeneke F. Variability in growth and survival of early postlarval shrimp. (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931)., 113: pág 65-81. Acuicultura. 2003.
16. Zhen C, Liu G, Zhao S, Li J & Peng Y. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. 86, 1227–1241. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010.
17. Lightner D. Enfermedades del camarón. Enfermedades producidas por vibrios. MX.AGT editor.p.170.; 1993.
18. Vera M. Efecto de una combinación del probiótico *Pediococcus acidilactici* con vitaminas y antioxidantes en el crecimiento y supervivencia del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Universidad de Guayaquil. Ecuador; 2014.
19. Aguirre G, Sánchez J, Campa A, Luna A & Ascencio F. Penaeid shrimp immune system: A Minireview. 39, 205. Thai Journal of Veterinary and Medicine. 2009.
20. OIE. (Organización Mundial de Sanidad Animal). Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos Paris.; 2009.
21. Globefish.. Shrimp Analysis. 2001.
22. Cuéllar J. Síndrome de mortalidad temprana (EMS). 7 p. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. 2011.

23. Doñate, C; Balasch, A; Callol, J; Bobe, L; Tort, A & MacKenzie, S. The effects of immunostimulation through dietary manipulation in the rainbow trout; evaluation of mucosal immunity, 12: 88-99. Mar. Biotechnol. 2010.
24. Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture., 48(2):149–158. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2006.
25. Cheng K, Hu C, Liu Y, Zheng S & Qi X. Effects of dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-Sali. 2005.
26. Wang Y, Chang P, & Chen H. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. 23: 1161-1177. Fish Shellfish Immun. 2007.
27. Auró A. El libro del camarón. México.; 2006.
28. Boyd C & Hanson T. Dissolved-Oxygen concentrations in pond Aquaculture. 40-41p. Global Aquaculture Advocate. 2010.
29. Ching A. La alcalinidad en el agua de cultivo del camarón de mar., 1-2. Nicovita. 2007.
30. Limsuwan C. Cultivo intensivo de camarón blanco.. Nicovita. 2005.
31. Vidal O, Granja F, Aranguren J, Brock M, & Salazar M. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus, 32: 364-372. J. World Aquacult. Soc. 2001.
32. Serrano L. Control biológico de patógenos de camarón mediante el uso de microorganismos aislados de muestras de biol y suelos de la antártida. Escuela Politécnica del Litoral. 2004.
33. Brown J & Leff L. Comparison of fatty methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. 62: 2183-2185. Applied and Environmental Microbiology. 1996.

34. Tsang S, Aguilón C y Méndez M. Manual de reproducción y cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Enfermedades que afectan el cultivo de camarones. *Vibrios spp.* Los Cobanos, Sonsonate, SV. p. 21.; 2013.
35. Gomez B, Roque A y Guerra A. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. 315–346. *Camaronicultura y medio ambiente*. 2001.
36. Dávalos S. Patógeno oportunista *Vibrio vulnificus*. ISSN 1067-6079.. *Revista Digital Universitaria*. 2005; 6(4).
37. Surette M, Miller M & Bassler B. Quorum sensing in *Escherichia coli*, salmonella typhimurium and vibrio harveyi: A new family of genes responsable for autoinducer production (En línea). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1999.
38. Hinestroza F, Maderira R & Bourbeau P. Severe Gastroenteritis and Hypovolemic Shock caused by *Vibrio* (*Vibrio*) *hollisae* infection. DOI: 10.1128/JCM01205077. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007.
39. Leyton Y y Riquelme C. Vibrios en los sistemas marinos costeros. 441–456. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*., 2008; 43(3).
40. Aguirre G, López E y Vásquez M. Efecto de *Vibrio harveyi* en la sobrevivencia de las arvas de *Litopenaeu vannamei*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas. México; 2013.
41. Benavidez R, Ballesteros M, Vega B y Camacho E. Degradación térmica de *Spirulina sp.* *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2010.
42. Morales M. Necrosis del hepatopáncreas (NHP) en camarones de cultivo causado por bacterias extracelulares e intracelulares. pp. 33-39. *Tilapia & Camarones*. 2010..
43. Álvarez J, Agurto C, Obregon J y Peroza L. Detección de *Baculovirus penaei* y de casos de Vibriosis en *Litopenaues vannamei* y *L. stylirostris* en una granja de la costa occidental de Venezuela. 4: 255-262; 2003.

44. Morales M, Moura A, Solís V, Ruíz A & Conroy G. Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*Penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. Rev. Científica FCV-LUZ. 2011.
45. García N, Ponce E & Muñoz E. Antibacterial properties and biotoxicity of extracts from marine cyanobacteria isolated from shrimp ponds in San Felipe Baja California, México. Journal of Applied Microbiology. 2008.
46. Rivera L y Rodríguez C. Uso de ácidos orgánicos (ACID5FIVE). Congreso Ecuatoriano de Acuicultura (aquaexpo2016). Ecuador.; 2016.
47. Sotomayor M, Reyes A, Panchana F, Maldonado M, Borbor M, Malavé R, Solórzano R, Rodríguez J & Bayot B. Sensibilidad bacteriana a las medidas terapéuticas más utilizadas en la larvicultura de camarón *Penaeus (Litopenaeus vannamei)* SHRIMP. XVIII Congreso Ecuatoriano de Acuicultura Guayaquil; 2016.
48. González Y. Efecto de la adición de ácidos orgánicos y probióticos sobre el crecimiento del camarón (*Litopenaeus vannamei*). (Tesis de grado) Universidad Técnica De Machala, Facultad De Ciencias Agropecuarias. Ecuador.; 2014.
49. Siguencia L. Uso de aceites esenciales y prebióticos como aditivo sobre el alimento balanceado, evaluación de su efecto en la tasa de crecimiento y sobrevivencia en *Litopenaeus vannamei*. Universidad de Guayaquil, Facultad de ciencias Naturales. Ecuador; 2014.
50. Guzmán A, Lara F, Sánchez M y Campa C. Una revisión sobre el uso de probióticos en el cultivo de organismos acuáticos. Congreso Ecuatoriano de Acuicultura (aquaexpo), Ecuador.; 2013.
51. Díaz J, Pérez R, Hernández V y Pérez L. Efecto de la dieta y el sistema de cultivo en la supervivencia y desarrollo larval del camarón bandeado *Stenopus hispidus*.. Revista Mexicana de Biodiversidad. 2017.
52. Flores M, Luna A, Campa A, González H, Fierro J & Partida B. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamea*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. 320: 51-55. Aquaculture. 2011.

53. Montaña L. Situación de salud e higiene para cultivar especies acuáticas. 2017.
54. Balcázar J & Cunningham D. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of the Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. 96:47-150. J. Invertebr Pathol. 2007.
55. Departamento Agrometeorológico del INIAP. Información agrometeorológica de la Finca Experimental "La María". Quevedo, Ecuador: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), Estación Experimental Tropical Pichilingue; 2018.
56. Abarca D. Determinación de la toxicidad aguda cl50 con plomo en juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei* y alevines de tilapia roja *Oreochromis sp.* Machala : Universidad Técnica de Machala; 2014.
57. Goarant C, Reynaud Y, Ansquer D, Decker S & Saulnier S. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. Systematic and Applied Microbiology. 2006; 29..
58. APHA, AWWA & WPCF (American Public Health, American Water Works Association y Water Pollution Control Federation). Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. American Public Health Association. Washington DC, EUA. 1992; 1193.
59. Narciso L. The influence of the diet on the growth and survival of *Penaeus kerathurus* larvae. Fish and Shellfish Larviculture Symposium.. 1995.
60. Rojas, N; Muñoz, G; Gárate, L; González, D; Del Pozo, M. (2013). Aislamiento microbiológico de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero en la ciudad de Puebla. Microbiolog (33)4: 147 – 151.
61. Morán V. Efecto de probióticos en el crecimiento de larvas del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en cautiverio. Guayaquil; 2017.

## **CAPÍTULO VII**

### **ANEXOS.**

#### **7.1. Anexos**

### 7.1.1. Reactivos utilizados.

#### Anexo 1. Medio de cultivo Agar TCBS.



#### Anexo 2. Medio de cultivo Agar tripticasa de soya (TSA).



**Anexo 3.** Bacterias patógenas aisladas microbiológicamente en medio TCBS.



**7.1.2. Fotografías.**

**Anexo 4.** Compra de camarones.



**Anexo 5.** Adecuación de tratamientos



**Anexo 6.** Peso del alimento y porcentajes de *Spirulina*.



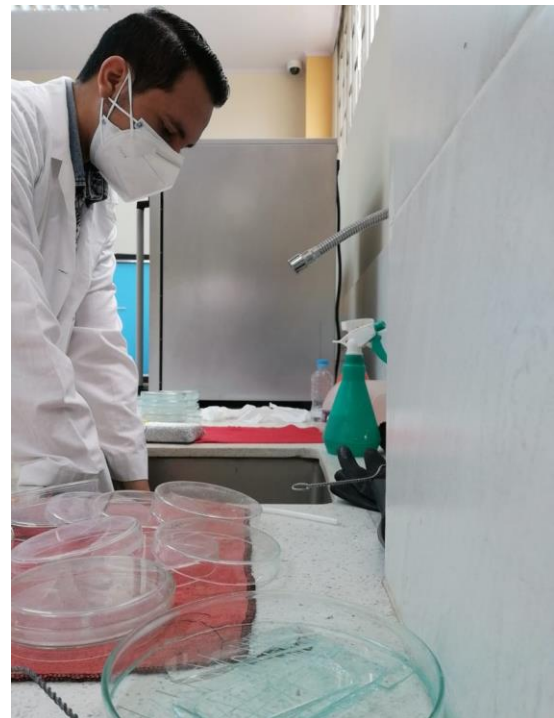
**Anexo 7.** Preparación del alimento.



**Anexo 8.** Alimentación de camarones.



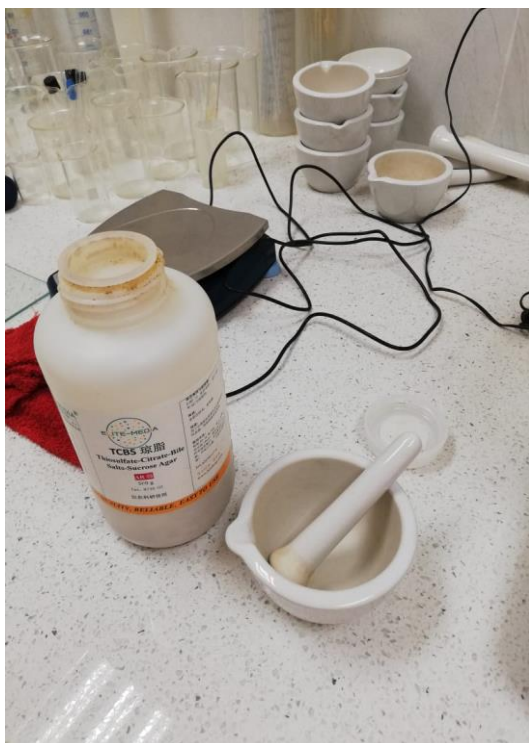
**Anexo 9.** Limpieza y desinfección de materiales.



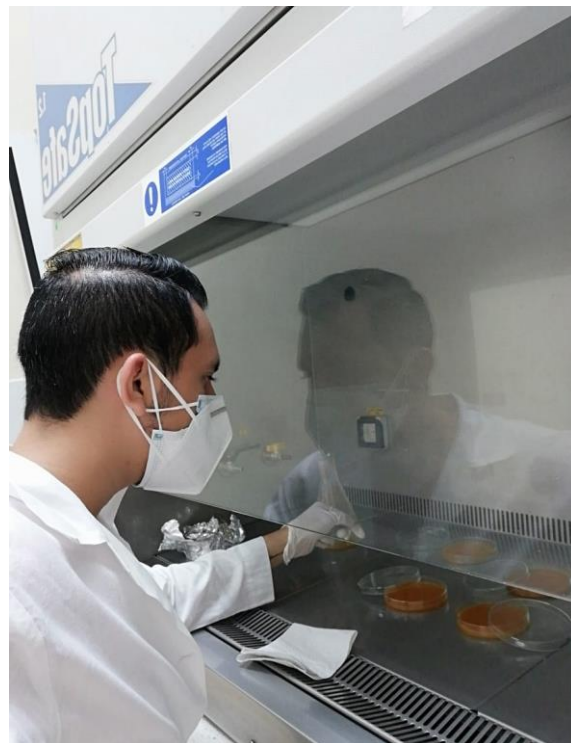
**Anexo 10.** Utilización de autoclave para desinfección de materiales específicamente cajas Petri.



**Anexo 11.** Agar selectivo para *Vibrios*.



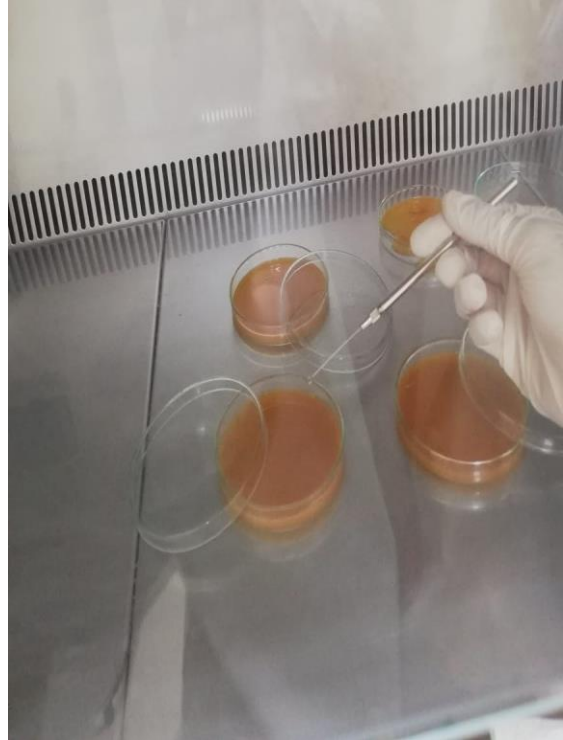
**Anexo 12.** Aislamiento de bacterias.



**Anexo 13.** Extracción del intestino.



**Anexo 14.** Raspado intestinal.



**Anexo 15.** Incubación de bacterias.



**Anexo 16.** Bacterias después de la incubación



### 7.1.3. Análisis de varianza de las variables estudiadas.

**Anexo 17.** Mortalidad del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), bajo el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de Tipo *Vibrio*.

T0 TESTIGO (-)							
HORAS	R1	R2	R3	Suma	SD	% Mort	% Mort Acum
12	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0	0
$\Sigma$	0	0	0	0		0	

T1 TESTIGO (+)							
HORAS	R1	R2	R3	SUMA	SD	% Mort	% Mort Acum
12	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
24	1	1	1	3	0.00	10.00	10.00
48	2	0	1	3	1.00	10.00	20.00
72	1	3	1	5	1.15	16.67	36.67
96	2	2	3	7	0.58	23.33	60.00
120	2	1	3	6	1.00	20.00	80.00
$\Sigma$	8	7	9	24		80.00	

T2 Balanceado más 2% <i>Spirulina sp</i>							
HORAS	R1	R2	R3	SUMA	SD	% Mort	% Mort Acum
12	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
24	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
48	1	2	0	3	1.00	10.00	10.00
72	3	1	1	5	1.15	16.67	26.67
96	2	2	2	6	0.00	20.00	46.67
120	3	2	1	6	1.00	20.00	66.67
$\Sigma$				20		66.67	

T3 Balanceado más 4% <i>Spirulina sp</i>							
--	--	--	--	--	--	--	--

<b>HORAS</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>SUMA</b>	<b>SD</b>	<b>% Mort</b>	<b>% Mort Acum</b>
<b>12</b>	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
<b>24</b>	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
<b>48</b>	0	1	1	2	0.58	6.67	6.67
<b>72</b>	1	1	1	3	0.00	10.00	16.67
<b>96</b>	2	0	2	4	1.15	13.33	30.00
<b>120</b>	3	1	1	5	1.15	16.67	46.67
$\Sigma$				14		46.67	

**T4 Balanceado más 6% *Spirulina sp***

<b>HORAS</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>SUMA</b>	<b>SD</b>	<b>% Mort</b>	<b>% Mort Acum</b>
<b>12</b>	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
<b>24</b>	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
<b>48</b>	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00
<b>72</b>	1	3	1	5	1.15	16.67	16.67
<b>96</b>	3	2	1	6	1.00	20.00	36.67
<b>120</b>	2	1	3	6	1.00	20.00	56.67
$\Sigma$				17		56.67	

**Anexo 18.** Análisis de varianza de mortalidad del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), bajo el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de Tipo *Vibrio*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Tiempo	3	0.34581	0.11527	6.42	0.002
Tratamiento	3	0.05966	0.019888	1.11	0.361
Tiempo*Tratamiento	9	0.08129	0.009032	0.5	0.861
Error	32	0.57483	0.017963		
Total	47	1.06159			

P-valor: 0.861

\***Valor F (fisher)** = 0.5

**Anexo 19.** Análisis de varianza de mortalidad del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), bajo el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de Tipo *Vibrio*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Tiempo	3	0.34581	0.11527	6.42	0.002
Tratamiento	3	0.05966	0.019888	1.11	0.361
Tiempo*Tratamiento	9	0.08129	0.009032	0.5	0.861
Error	32	0.57483	0.017963		
Total		47	1.06159		

**P-valor: 0.002**

\* **Valor F (fisher)** = 6.42

**Anexo 20.** Análisis de varianza de mortalidad del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), bajo el efecto de dietas con inclusión de *Spirulina sp* contra bacterias patógenas de Tipo *Vibrio*.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
<b>Tiempo</b>	3	0.34581	0.11527	6.42	0.002
<b>Tratamiento</b>	3	0.05966	0.019888	1.11	0.361
<b>Tiempo*Tratamiento</b>	9	0.08129	0.009032	0.5	0.861
<b>Error</b>	32	0.57483	0.017963		
<b>Tiempo</b>		3	0.34581	0.11527	6.42

**P-valor: 0.002**

\* **Valor F (fisher)** = 1.11