

**Evaluación de *Bacillus subtilis* como potencial
probiótico en camarón blanco (*Penaeus
vannamei*) en etapa de post larva en
Choluteca, Honduras**

**Kristian Josue Alvarado Caballero
Stalin Javier Aveiga Cortez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de *Bacillus subtilis* como potencial
probiótico en camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en
etapa de post larva en Choluteca, Honduras**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Kristian Josue Alvarado Caballero
Stalin Javier Aveiga Cortez**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Evaluación de *Bacillus subtilis* como potencial probiótico en camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en etapa de post larva en Choluteca, Honduras

Kristian Josue Alvarado Caballero
Stalin Javier Aveiga Cortez

Resumen. La industria camaronera en Honduras es de gran importancia por la generación de divisas para el país. En 2013, se produjeron 49,400 toneladas. La industria se ha visto afectada por patógenos que han causado grandes pérdidas económicas. La necrosis aguda hepatopancreática (AHPND), causada por una cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, ha afectado a la industria desde 2009. AHPND afecta post larvas (PL) hasta los 35 días después de siembra. El objetivo del experimento consistió en evaluar *Bacillus subtilis* como probiótico en PL de *Penaeus vannamei* para mejorar la sobrevivencia y la ganancia de peso e índice de conversión alimenticia. El estudio se llevó a cabo en febrero y abril, dividiéndose en dos ciclos mensuales. Se utilizaron seis unidades experimentales (estanques) de 1.74m³ con una densidad de 2,500 post larvas/tanque. Se usaron cuatro concentraciones de unidades formadoras de colonias (UFC) de *B. subtilis* y un control. En el primer ciclo, se utilizaron 1.16×10⁶ UFC (100%) y 9.46×10⁵ UFC (75%). En el segundo ciclo se utilizaron 5.82×10⁵ UFC (50%) y 2.9×10⁵ UFC (25%). Se utilizó un BCA como diseño experimental se realizaron ANDEVA con separación de medias utilizando DUNCAN para las variables de peso semanal como un efecto acumulativo en cada ciclo, porcentaje de sobrevivencia (%) e Índice de Conversión Alimenticia (ÍCA). Se encontraron diferencias significativas (P≤0.05) entre las diferentes concentraciones de *B. subtilis*; entre mayor concentración mayor ganancia de peso y menor porcentaje de sobrevivencia, la calidad de agua no se ven afectados por concentraciones de *B. subtilis*.

Palabras clave: Índice de conversión alimenticia, ganancia de peso, sobrevivencia.

Abstract: The shrimp industry in Honduras is important due to the generation of income. In 2013, the production was of 49,400 tons, but the industry has been affected by diseases that have caused losses in production and returns. The acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), caused by *Vibrio parahaemolyticus*, has affected shrimp since 2009, killing post larvae (PL) up to 35 days after stocking. The objective of this study was to evaluate *Bacillus subtilis* as a probiotic in *Penaeus vannamei* PL to improve survival, weight gain and feed conversion ratio (FCR). The study was between the months of February and April, consisting of two monthly cycles and was done in six tanks and each one had 1.74 m³ with a density of 2,500 PL/tank. Four probiotic concentrations were tested; on the first cycle, 1.16 × 10⁶ CFU (100%) and 9.46 × 10⁵ CFU (75%) and on the second cycle they were used 5.82 × 10⁵ CFU (50%) and 2.9 × 10⁵ CFU (25%). Weight gain, survival and FCR were analyzed using a randomized block design and an ANOVA with Duncan's means separation, using weekly weight as an accumulative effect in each. The results showed that there were significant differences on PL treated with the probiotic in weight gain and survival (P≤0.05). The more concentration of *B. subtilis*, more weight gain but less survival rate. The water quality was not affected by the concentrations of *B. subtilis*.

Key words: Feed conversion ratio, weight gain, survival.

CONTENIDO

Portadilla	ii
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iii
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	12
5. RECOMENDACIONES.....	13
6. LITERATURA CITADA.....	14

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Peso semanal (g) por unidad experimental – Primer Ciclo	6
2. Peso semanal (g) por unidad experimental – Segundo Ciclo	6
3. Parámetros de calidad de agua monitoreados en los estanques en los diferentes tratamientos.....	8
4. Porcentaje de sobrevivencia por estanque con diferentes concentraciones de <i>Bacillus subtilis</i>	9
5. Porcentaje de sobrevivencia por estanque con diferentes concentraciones de <i>Bacillus subtilis</i>	9
6. Índice de Conversión Alimenticia	10
7. Índice de Conversión Alimenticia	11

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*), es nativo de la costa de oriente del Océano Pacífico, desde el norte de México hasta Tumbes en Perú, en hábitats marítimos tropicales con temperaturas del agua mayores a 20 °C. Inicialmente fue reproducido artificialmente en Florida en 1973 a partir de nauplios que fueron capturados en Panamá (FAO 2016). La primera etapa de *P. vannamei* larval se denominan nauplios. Esta etapa se caracteriza porque no requieren alimentación, los nauplios (2 días) se nutren de sus reversas embrionarias, las etapas de protozoa (4 – 5 días), mysis (3 – 4 días)) son planctónicas se alimenta de fitoplancton y zooplancton. Cinco días después de su metamorfosis las pos larva (PL) (10 – 15 días) cambian su hábito alimenticio y empiezan a alimentarse de detritos benthicos, gusanos, bivalvos y crustáceos (Briggs et al. 2004). En los cultivos, la siembra se realiza a partir de PL 10 – 12 (FAO 2016).

La camaronicultura en Honduras tiene sus inicios en 1973, con un programa de investigación de la “Empresa Sea Farms de Honduras” en el Golfo de Fonseca (Currie 1995). La acuicultura en el año 2013 representó el 89% de la producción pesquera con una producción de 70,400 toneladas (Tn). La Secretaría de Agricultura y Ganadería de Honduras (2013) menciona que las principales especies utilizadas en acuicultura son el camarón y la tilapia. El camarón en el año 2013 tuvo una producción de 49,400 Tn. Las exportaciones pesqueras y acuícolas produjeron un ingreso de 426 millones de USD a la economía del país en el año 2013.

Las enfermedades infecciosas causadas por la incidencia de bacterias, hongos y virus, es el principal factor que causa grandes pérdidas de producción y económicas en la industria de camarón a nivel mundial (Varela, 2016). Las enfermedades infecciosas de mayor impacto en la industria camaronera, es el virus de síndrome del Taura (TS); también conocido como la enfermedad de Cola Roja y el síndrome de la mancha blanca (WSD) estas han causado devastaciones en producción y grandes pérdidas económicas a nivel de mundial (FAO 2016).

Los brotes de la enfermedad de la necrosis aguda hepatopancreática (AHPND, por su siglas en inglés) comúnmente conocida “síndrome de la mortalidad temprana” (EMS) ha afectado a los productores de camarón desde el 2009 (FAO 2016). Hasta la actualidad, no se ha encontrado una alternativa que les ayude a combatir esta enfermedad. Los camarones afectados presentan un desprendimiento masivo de las células epiteliales hepatopancreática y posteriormente mueren. La AHPND es causada por una cepa altamente virulenta de *Vibrio parahaemolyticus* (Pantoja 2004; Varela et al. 2014). A diferencia de otras enfermedades que pueden afectar el cultivo de camarón, el patógeno puede estar presente en camarón de cultivo, en el agua o en los sedimentos (FAO 2016).

Para contrarrestar las pérdidas de producción causadas por enfermedades infecciosas, los productores de camarón utilizan agentes químicos (antibióticos) (Zizhong et al. 2009). El uso de estos fármacos tiene un efecto adverso ocasionado por la resistencia de microorganismos patógenos y sus efectos en la salud de los consumidores, por ende se busca nuevas tecnologías que ayuden a disminuir pérdidas en la producción, el riesgo para la salud humana e impacto en el medio ambiente (Zokaei et al. 2009).

Una alternativa es la implementación de tecnologías limpias a través del uso de probióticos en la acuicultura sostenible. Los probióticos se definen como microorganismos que tienen un efecto benéfico en el hospedero por la modificación en la comunidad microbiana en el organismo (Vershuere et al. 2000). La modificación se debe a la colonización del tracto gastrointestinal del huésped, adhiriéndose a la pared epitelial y proliferándose en el intestino (Mohapatra et al. 2013). Los microorganismos benéficos pueden mejorar la asimilación de alimentos y disminuir la mortalidad por enfermedades infecciosas, debido a que los microorganismos benéficos inhiben el desarrollo de esos patógenos (Ismail y Soliman 2010). Así mismo los microorganismos mejoran la calidad del agua con la reducción de concentraciones de amonio, nitratos y nitritos (Ma et al. 2009). Existen estudios con los que se han reportado resultados negativos o nulos con el uso de probióticos, como infecciones y tasas de mortalidad altas (Günther et al. 2004; McIntosh et al. 2000). Estos estudios han demostrado que no siempre los probióticos son benéficos, debido que depende de varios factores como la especie que se está utilizando, densidad de siembra y la escala que se esté utilizando (laboratorio o estanques de producción), el uso de microorganismos de otros ambientes y la cantidad de microorganismo por dosis que se está utilizando (Panwichian et al. 2010; Verschuere et al. 2000).

El uso de probióticos a base de cepas de género *Bacillus* en acuicultura, es una práctica de manejo nutricional que tiene auge en la piscicultura intensiva especialmente en Asia (Watson et al. 2008). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA) aprobó el uso de *Bacillus cereus* var. *toyoi* y *B. subtilis* C-3102. Los probióticos con cepas de *Bacillus* comercialmente son utilizadas para el ganado, aves de corral, conejos y cerdos, y recientemente en la piscicultura (Albuquerque et al. 2013; Mohapatra et al. 2013). El objetivo del ensayo fue evaluar ganancia de peso y sobrevivencia de postlarva de *Penaeus vannamei* con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en la finca camaronera Barrancones ubicada en la aldea de Punta Ratón a 15.8 km de Mojaras, en el municipio de Marcovia, departamento Choluteca, Honduras. A una altura de 5 msnm con temperaturas promedio anual de 35 °C. La finca cuenta con una área de 195 Ha, divididas en ocho lagunas y cinco viveros. Estas se abastecen con agua del estero de Punta Ratón con salinidades promedio de 35 ppm. El ensayo se realizó de febrero a abril con cuatro concentraciones divididas en dos tiempos de 30 días cada uno.

Unidades experimentales. Se utilizaron seis estanques de concreto con una dimensión de $4.35 \times 1 \times 0.6$ m, con un volumen aproximado de 1.74 m³. Cada una de estos estanques se abastecía con agua del canal de abastecimiento de la finca utilizando una bomba marca Honda de cinco hp y de tres pulgadas de diámetro de caudal. Los estanques se dividieron en tres pares para inocularlas con la bacteria en diferentes concentraciones. En el primer par se utilizó como control, el segundo par se inoculó con 75% de concentración de la bacteria y el tercer par se inoculó con el 100% de la concentración durante el primer mes (febrero - marzo). Los recambios de agua se hicieron semanales para aprovechar la bacteria e inocular una vez cada semana. Durante el segundo mes (marzo - abril), se utilizó el primer par de estanques como control, el segundo par con 25% de la concentración de bacteria y el tercer par con el 50% de la concentración. Los recambios se hicieron semanales al igual que las inoculaciones como el primer mes. La densidad sembrada fue de 2,500 post larvas por estanque en ambos ciclos.

Se utilizó un blower regenerativo marca Sweetwater[®] de 1/3 hp para proveer oxígeno a la post larva durante la noche de 5 pm a 7 am, durante todo el ciclo del cultivo. El sistema de oxígeno mediante el blower estaba compuesto por un reductor de 1 a 1/2 pulgada ubicado en la salida de aire del blower. Posteriormente se instaló una tubería principal de seis metros de longitud, conectada a las tuberías secundarias que estaban en cada pila mediante seis conexiones “T” (una por cada estanque). Las tuberías secundarias eran de 1/2 pulgadas de diámetro y con cuatro metros de longitud. Se les hicieron perforaciones cada 50 cm a las tuberías secundarias para permitir el acceso del aire generado por el blower. El diámetro de las perforaciones fue de 1 cm. Toda la red de tuberías del sistema fue de material PVC (poli cloruro de vinilo). El blower a su vez, se conectó a un generador de energía a combustible marca Honda de 5 hp. El consumo de combustible del generador fue de tres galones diario.

Descripción de los organismos. Se utilizó post larva de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) del laboratorio de larvicultura UNIFINCA, ubicado en el municipio de Cedeño, Marcovia en el departamento de Choluteca. La siembra en los dos ciclos fue directa. El primer ciclo se sembró en un estadio de PL11 y el segundo se sembró en un estadio de PL30. El transporte de la larva se realizó en yogos plásticos con estanques de oxígeno

regulados y así evitar mortalidad de la post larva durante el transporte. La siembra se hizo a partir de las 5:00 pm con el fin de evitar estrés por las altas temperaturas durante el día, para tener una aclimatación más rápida de temperatura y salinidad del agua de los estanques y de los yogos.

Descripción de la bacteria. Las cepas de *Bacillus subtilis* fueron reproducidas por el laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. La bacteria se utiliza para el control de varios patógenos del suelo agrícola.

Alimentación. El alimento proporcionado a la post larva fue un alimento de inicio KR-1 de Nicovita con 35% de proteína cruda. Se inició suministrando 20 gr de alimento por ración. Se le proporcionaba ocho raciones en 24 horas, haciendo un total de 200 gr al día y cada tres días se le incrementaban 10 gr hasta llegar a 24 gr por ración, o 240 gr diarios. Esto se calculó con la fórmula 1 utilizada en la industria camaronera.

$$(\text{N}^{\circ} \text{ de larvas} \times \% \text{ sobrevivencia}) \times 10\% \text{ del peso vivo total [1]}$$

Muestreo. Los muestreos para determinar la ganancia diaria de peso se efectuaron cada 7 días al momento de realizar los recambios de agua. Se escogían 100 animales aleatorios por estanque, dividiéndolos en grupos de 20 en recipientes plásticos y posteriormente se pesaban para sacar un promedio de peso. Se pesaron en una balanza digital expresada en unidades de gramo y se capturaban con una red de mano. Los muestreos para ver las condiciones del agua se realizaban dos veces al día, en horas de la mañana y tarde. Se muestreaba temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad. Para medir temperatura y oxígeno disuelto se utilizó un oxigenómetro marca YSI55. Para salinidad se utilizó un refractómetro con lecturas en partes por mil y para pH un potenciómetro. El porcentaje de sobrevivencia se determinó al finalizar cada ciclo, con el número inicial de animales sembrados y el número de animales cosechados. Esto se hizo con el fin de saber que tanto afectaba la bacteria la sobrevivencia de las unidades y determinar en qué concentraciones hay una mejor sobrevivencia. Para calcular el porcentaje de sobrevivencia se utilizó la fórmula 2:

$$(\text{N}^{\circ} \text{ de animales sembrados})/(\text{N}^{\circ} \text{ de animales cosechados}) \times 100 [2]$$

Inoculación. Los estanques experimentales fueron inoculados en pares con diferentes concentraciones en los dos ciclos. La aplicación de la bacteria fue en líquido debido a que esta venía diluida en agua en presentaciones de un galón. Durante el primer ciclo se utilizaron dos concentraciones más la de control. Estas fueron de 100% (cuatro litros de solución madre de probiótico) con una concentración de $(1.16 \times 10^6 \text{ UFC/ml.})$, y 75% (tres litros) con una concentración de $(9.46 \times 10^5 \text{ UFC/ml.})$. Cada semana se inoculaban los estanques después de cada recambio de agua. La primera inoculación se aplicó el día de la siembra y se dejó por una semana. El día de recambio a la siguiente semana se retiró el 90% del agua que estaba en los estanques, el 90% de la bacteria se fue diluida junto con el agua, quedando nada más un 10% dentro de los estanques. Con base a eso, las inoculaciones fueron variando y se aplicó menos cantidad. A la de 100% (cuatro litros) ya no se le dieron cuatro litros, sino 3.6 L. Igual paso con los estanques que tenían 3 L de concentración. Se les redujo el 10% que ya estaba en los estanques. El objetivo de este procedimiento fue

evitar la aplicación de más de la dosis a evaluar. La metodología del segundo ciclo fue la misma solo de que las concentraciones fueron diferentes. Se utilizaron 50% (2 L) con una concentración de (5.8×10^5), y 25% (1 L) con una concentración de (2.9×10^5) respectivamente.

Diseño Experimental. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (BCA) compuesto por 4 tratamientos para un total de 8 unidades experimentales. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statistical Analysis Systems (SAS® 2013) versión 9.1 como sistema de análisis estadístico, con un nivel de probabilidad de $P \leq 0.05$. La separación de medias se analizó con la prueba DUNCAN a una significancia de $P \leq 0.05$ para las variables porcentaje de sobrevivencia e índice de conversión alimenticia (ÍCA), ganancia diaria de peso (GDP) y sobrevivencia (%). Para evaluar variables de calidad de agua se utilizaron técnicas estadísticas descriptivas. Estas variables fueron temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ganancia Diaria de Peso. Las diferencias en los pesajes semanales de los tratamientos de la bacteria en el ciclo 1. Se observó que los estanques con un mayor tratamiento de la bacteria, obtuvieron un mayor peso en comparación a los otros estanques con sus respectivos tratamientos (Cuadro 1). Pero no se puede decir que el tratamiento tuvo influencia en el peso, debido a que la sobrevivencia varió en cada estanque. A mayor tratamiento de la bacteria, hubo mayor mortalidad en el estanque. Sin embargo, a pesar de que los estanques con el 100% tuvieron mejores pesos, no hubo diferencia ($P \leq 0.05$) en comparación al resto de los estanques.

Cuadro 1. Peso semanal (g) por unidad experimental – Primer Ciclo

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Semana			
	1	2	3	4
Control	0.01	0.11	0.31	0.66 b [£]
9.46×10^5 (75%)	0.02	0.12	0.33	1.01 b
1.16×10^6 (100%)	0.02	0.12	0.44	1.16 a
Probabilidad	0.0001			
Coefficiente de varianza	27.5			

£ = valores en columnas con distinta símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

En el Cuadro 2, se puede observar que existieron diferencias en cuanto al peso de las unidades en los diferentes tratamientos ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Peso semanal (g) por unidad experimental – Segundo Ciclo

Tratamiento UFC/ml de <i>Bacillus subtilis</i>	Semana			
	1	2	3	4
Control	0.15	0.44	0.79	1.35 b [£]
5.8×10^5 (25%)	0.16	0.64	0.89	1.52 a
5.8×10^5 (50%)	0.16	0.56	0.81	1.35 b
Probabilidad	0.0102			
Coefficiente de varianza	8.54			

£ = valores en columnas con distinta símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

El probiótico fue incapaz de mejorar los pesajes promedio en los muestreos de las unidades experimentales. Corrales (2015) reportó que los ensayos de *B. subtilis* mezclado con el alimento utilizados en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) mostraron diferencias significativas en cuanto a los pesos promedio de los muestreos en comparación con un alimento comercial. Far et al. (2009) usaron un probiótico compuesto por *B. subtilis* adherido en el alimento (pellets) mediante unos procesos en el laboratorio, los resultados de su ensayo fueron positivos mostrando mayor peso y crecimiento al final del ensayo. Como diferencia, en este ensayo se aisló la bacteria del tracto digestivo de un juvenil de *Macrobrachium rosenbergii* que es un camarón de agua dulce y los recambios de agua se hacían a diario. Con estos resultados se puede inferir que la presentación más eficiente para brindar la bacteria es adherida al alimento diario y no en un medio acuoso brindado una vez a la semana. Melgar et al. (2013) reportaron diferencias significativas en pesos finales en un ciclo (120 días) con la mezcla de microorganismos (*Rhodopseudomonas palustris*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Saccharomyces cerevisiae*) utilizados como probióticos adicionados en el agua con recambios de agua semanal en estanques de tierra.

Se puede sostener que el uso de microorganismos benéficos tiene un impacto positivo en la industria camaronera. En la forma como se suministra el probiótico (adherido a alimento o aplicado en el agua) puede tener un efecto de como los microorganismos benéficos se implanta en el hospedero. El uso de los probióticos ayuda al incremento de peso y crecimiento debido a que se instala en el tracto gastrointestinal del camarón, facilita la absorción de los nutrientes y ayuda a balance de la microflora (Gatesoupe 2008). Por lo tanto, ayuda a su metabolismo se haga más eficiente y desarrolle defensas contra los patógenos.

Calidad de Agua. La post larva de *Penaeus vannamei* requiere temperaturas mayores a 20 °C, siendo su rango óptimo entre 26 y 32 °C (Fenucci 1988). El crecimiento de *P. vannamei* se ve reducido por debajo de 20 °C, por el contrario temperaturas por encima de 35 °C afectan la ganancia de peso, que se ve reducida por el alto metabolismo (Limsuwan 2005). La temperatura promedio fue de 29 ± 2 °C en cada uno de los tratamientos con las diferentes concentraciones.

El rango óptimo de oxígeno disuelto para *P. vannamei* es entre cuatro a nueve ppt. Se ha comprobado que concentraciones de oxígeno disuelto (OD) menores de dos ppt producen una alta mortalidad de cultivo (Fenucci 1988), valores por encima del rango pueden significar un exceso de fitoplancton. Los valores obtenidos de OD se encuentran dentro del rango óptimo (Fenucci 1988) en cada uno de los tratamientos con valores entre 4.9 ± 0.5 ppm. El rango óptimo de pH es de 7.6 a 8.6 (Wang et al. 2004), pero se ha demostrado que un pH por debajo de cinco no es perjudicial para el camarón. La elevación o disminución de este parámetro puede desequilibrar la ecología del estanque (Fenucci 1988), se obtuvieron valores de $pH 8 \pm 0.4$ en los diferentes tratamientos y no se observó diferencia en los diferentes tratamientos. Los rangos de salinidad pueden oscilar entre las 15 y 40 ppm (Fenucci 1988), si la salinidad se encuentra por debajo del rango óptimo se presentan problemas por falta de minerales. Los valores promedios obtenidos por salinidad en cada tratamiento fueron de 35.5 ppm.

Se observó que los parámetros de calidad de agua obtenidos en el ensayo se encuentran dentro de los parámetros recomendados para el desarrollo adecuado del cultivo de *P.vannamei*. Los datos recolectados concuerdan con los reportados por Zokaei et al. (2009), con temperaturas de 26 – 28 °C y rangos de salinidad de 25 a 28 ppm. Los parámetros observados en la temperatura y salinidad pueden estar influenciados por los parámetros ambientales y no tiene que ver una relación directa por la actividad microbiana. No se obtuvo diferencia de pH en el ensayo, por lo contrario Melgar et al. (2013) reportaron que existió diferencia significativa en los valores de pH, en los cuales obtuvieron valores de pH más bajo en los tratamientos con probióticos. Farzanfar (2006), Verschuere et al. (2000) y Zizhong et al. 2009 reportaron que los probióticos pueden producir sustancias orgánicas como: lisozimas, proteasas, peróxido de hidrogeno los cuales pueden alterar los niveles del pH. En el ensayo no se observó diferencias en las concentraciones de oxígeno disuelto, los datos obtenidos se encuentra dentro del rango óptimo (Fenucci 1988). Kumar et al. (2016) reportaron concentraciones de oxígeno disuelto de 4.8 a 6.2 en los estanques con probióticos y concentraciones de oxígeno disuelto de 4.1 a 5.3 ppm; por lo contrario Melgar et al. (2013) reportan mayores concentraciones de oxígeno disuelto en los estanques que fueron inoculados por probióticos.

Cuadro 3. Parámetros de calidad de agua monitoreados en los estanques en los diferentes tratamientos

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (ppt)	pH	Salinidad (ppt)
Control C1	28	4.76	8.1	35
Control C2	29	5.26	7.9	34
2.9×10^5 (25%)	28	5.16	8.3	34
5.8×10^5 (50%)	26	4.93	8.1	35
9.46×10^5 (75%)	27	4.84	8.2	34
1.16×10^6 (100%)	28	4.88	8.3	35

Sobrevivencia. Al finalizar los ciclos de 30 días de duración cada ciclo se obtuvieron en el ensayo los que se muestran en el Cuadro 4. Los tratamientos con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis* presentaron sobrevivencias bajas comparadas a las del control. En el primer ciclo se encontró diferencia ($P \leq 0.05$) entre el control y los tratamientos con el 75 y 100% de las concentraciones de *Bacillus subtilis*, obteniendo el porcentaje de sobrevivencia más baja con en el tratamiento del 100% con un 26.28 % de sobrevivencia en uno de los estanques y 100% de mortalidad en uno de los estanques a la semana después de la siembra de los post larvas.

Cuadro 4. Porcentaje de sobrevivencia por estanque con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo	Sobrevivencia
Control	1	96.44 a [£]
9.46×10^5 (75 %)	1	55.98 b
1.16×10^6 (100 %)	1	26.28 c
Probabilidad	0.0066	
Coeficiente de varianza	18.8	

£ = valores en columnas con distinta símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

En el segundo ciclo no se encontró diferencia ($P \leq 0.05$) entre el control y el tratamiento con el 25% de concentración de *Bacillus subtilis*, obteniendo la sobrevivencia más baja en el tratamiento con el 50% de concentración de *Bacillus subtilis*, pero no difieren entre si los tratamientos con concentraciones de 25 y 50% de *Bacillus subtilis* (Cuadro 5).

La sobrevivencia obtenida en el segundo ciclo fue más alta que en el primer ciclo, tal como se muestra en los cuadro 4 y 5.

Cuadro 5. Porcentaje de sobrevivencia por estanque con diferentes concentraciones de *Bacillus subtilis*

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo	Sobrevivencia
Control	2	88.78 a [£]
2.9×10^5 (75 %)	2	75.24 ab
5.8×10^5 (50 %)	2	59.64 b
Probabilidad	0.0066	
Coeficiente de varianza	18.8	

£= valores en columnas con distinta símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

En los resultados obtenidos en el ensayo se puede observar una tendencia en los tratamientos, que a mayor concentración de *Bacillus subtilis* la sobrevivencia fueron más bajas, hasta el 100% de mortalidad en uno de los estanques con la concentración de 100% de *Bacillus subtilis*. Balcazar et al. (2007) reportaron diferencias significativas en la sobrevivencia de los camarones a los 28 días de la aplicación del probiótico con cepas de *Bacillus subtilis* UTM, el porcentaje de sobrevivencia obtenido fue del 94.3% en los camarones que se les fue suministrado el probiótico.

Corrales (2015), reportó datos de sobrevivencia del 99%, utilizando *Bacillus subtilis* con una concentración 5.3×10^7 UFC/mL, en tilapia roja (*Oreochromis* sp). Zokaei et al. (2013) reportaron que la concentración menor de 2.7×10^{10} de *Bacillus subtilis* el porcentaje de sobrevivencia era más alto en *Penaeus vannamei*. Melgar et al. (2013) reportaron diferencias significativas en la sobrevivencia en los tratamientos con probiótico comercial (Tecnología EMTM, Japón) y la menor sobrevivencia se obtuvo en los camarones sin probióticos con 45%, mientras que no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre los camarones con probióticos con $61 \pm 8.76\%$. Decamp et al. (2008), reportaron que no hubo diferencia significativa en la sobrevivencia en los camarones donde se aplicó una mezcla comercial con cepas de *Bacillus* (SANOLIFE® MIC) y uso de antibióticos, los camarones fueron infectados con cepas patógenas de *Vibrio*, los probióticos que compiten con las bacterias patógenas por los nutrientes e inhiben la proliferación y desarrollo.

La eficacia de un probiótico depende de varios factores como la composición de la especie, si se utiliza especies de otro ambiente, nivel de producción (laboratorio o estanque) frecuencia de aplicación, la concentración de las bacterias y condiciones ambientales. (Panwichian et al. 2010; Verschuere et al. 2000). Balcazar et al. (2007) recomienda que los organismos que se utilicen como probióticos se deben aislar de los propios hospederos y tienen que tener la capacidad de reproducirse en el tracto digestivo. Las bacterias de *Bacillus subtilis* UTM que se utilizaron en otros estudios, como en el de Balcazar et al. (2007) que se aislaron a partir del tracto gastrointestinal de camarones adultos de *Penaeus vannamei*.

Índice de conversión alimenticia (ICA). Se compara la cantidad de alimento ofrecido con el crecimiento del camarón con el ICA. Este factor se calcula con el peso del camarón producido por cantidad de alimento ofrecido. El valor del ICA va depender de la densidad de siembra, calidad del alimento abastecido y peso del camarón cosechado (Talavera et al. 1997). En el primer ciclo no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre el control y el tratamiento con el 75% de concentración de *B. subtilis*. El tratamiento con el 100% de concentración de *B. subtilis* se encontró diferencia significativa.

Cuadro 6. Índice de Conversión Alimenticia

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo	ÍCA
Control	1	4.24 a [£]
9.46×10^5 (75%)	1	4.64 a
1.16×10^6 (100%)	1	8.98 b
Probabilidad	0.0018	
Coeficiente de varianza	10.4	

£ = valores en columnas con distinto símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

En el segundo ciclo no se encontró diferencia ($P > 0.05$) entre control y el tratamiento con el 25% de concentración de *B. subtilis*. Pero el tratamiento con el 50% de concentración de *B. subtilis* se encontró diferencia significativa.

Cuadro 7. Índice de Conversión Alimenticia

Tratamiento UFC/ml. de <i>Bacillus subtilis</i>	Ciclo	ÍCA
Control	2	2.30 a [£]
2.9×10^5 (25%)	2	2.43 a
5.8×10^5 (50%)	2	3.74 b
Probabilidad	0.0018	
Coeficiente de varianza	10.35	

£= valores en columnas con distinta símbolo difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$)

Melgar et al. (2013) evaluaron el efecto de probiótico comercial EMMT compuesto por tres microorganismos bacterias fotosintéticas, bacterias lácticas y levaduras, reportaron que no encontraron diferencias significativas en los ICA ($P > 0.05$).

Corrales (2015) evaluó el uso de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* como promotores de crecimiento en tilapia roja (*Oreochromis* sp.) y reportó que no encontró diferencia significativa en el ICA ($P > 0.05$). Balcazar et al. (2007) evaluaron efecto de cuatro potenciales probióticos en *Penaeus vannamei*, reportaron que no existió diferencia significativa del ICA en los tratamientos ($P > 0.05$). EL índice de conversión alimenticia está influenciado por la cantidad de camarones cosechados, como se obtuvieron sobrevivencias bajas en los tratamientos de 50% y 100% de concentración de *B. subtilis*.

4. CONCLUSIONES

- Al agregar *Bacillus subtilis* en cualquier concentración se disminuye la sobrevivencia de camarón en la etapa de post larva, sin embargo hay mayor ganancia de peso en esta etapa debido a la mayor disponibilidad de alimento.
- A medida que se aumenta la concentración de *Bacillus subtilis*, la sobrevivencia de post larva de camarón es menor, teniendo una mortalidad de 75% a concentraciones de 1.16×10^6 UFC/ml.
- Los parámetros de calidad de agua (Temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH), no están afectados por las cepas de *Bacillus subtilis*, al igual los parámetros de calidad de agua no influyen en el desempeño de las bacterias
- Al agregar *Bacillus subtilis* en cualquier concentración los parámetros de calidad de agua (Temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH), no se ven afectados.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar concentraciones de *Bacillus subtilis* menores a 25% (2.9×10^5 UFC/ml.) para obtener porcentajes de sobrevivencia más altas.
- Utilizar microorganismos benéficos que sean aislados del tracto gastrointestinal de organismos marinos para utilizarlos como probióticos
- Realizar una sola aplicación de los microorganismo que se van a utilizar como probiótico en camarón en la etapa de post larva.
- Adherir las cepas de la microrganismos benéficas que se vayan a utilizar como probiótico al alimento que se le suministre a los camarones.

6. LITERATURA CITADA

Albuquerque DM, Marengoni NG, Boscolo WR, Ribeiro RP, Mahl I, Moura MCd. 2013. Probióticos em dietas para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. Cienc. Rural. 43(8):1503–1508. Doi: 10.1590/S0103-84782013000800026.

Balcazar JL, Rojas-Luna T, Cunningham DP. 2007. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. J Invertebr Pathol. 96(2):147–150. eng. doi:10.1016/j.jip.2007.04.008.

Briggs M, Funge-Smith S, Subasinghe R, Phillips M. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Bangkok: Food and Agriculture Organization of the United Nations. RAP publication 2004/10. <http://www.fao.org/docrep/007/ad505e/ad505e00.htm>.

FAO. 2016. FAO Fisheries & Aquaculture - Programa de información de especies acuáticas - *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 15 p.

Currie, D. 1995. Potencial de la camaronicultura en Centroamérica y el impacto en el uso de post-larvas silvestres, PRADEPESCA Programa Regional de Apoyo al Desarrollo de la Pesca en el Istmo Centroamericano. Panamá.

Decamp O, Moriarty DJW, Lavens P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. Aquaculture Res; [accessed 2016 Sep 12]. 39(4):334–338. <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x/asset/j.1365-2109.2007.01664.x.pdf?v=1&t=it0ci083&s=e924b016e0f94541ebefb74dc8e8e47c8121e702>. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x.

Farzanfar A. 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. FEMS Immunol Med Microbiol. 48(2):149–158. eng. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00116.x.

Fenucci, J.L. 1988. Manual para la cría de camarones peneidos. Documento de Campo 8, FAO. Brasilia, Brasil.

Gatesoupe F-J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. J Mol Microbiol Biotechnol. 14(1-3):107–114. eng. doi:10.1159/000106089.

Günther J, Jiménez-Martínez R. 2004. Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio. *Revista de Biología Tropical*. 52(4):937–943.

Ismail MM, Soliman WS. 2010. Studies on Probiotic Effects of Lactic Acid Bacteria against *Vibrio vulnificus* in freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *American Journal of Science*. 8(6):781–787.

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274(1):1–14. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.11.019.

Kumar NJ, Srideepu K, Reddy HM, Reddy KV. 2016. Effect of water probiotic (Pro-W) on *Litopenaeus vannamei* culture ponds of Nellore, Andhra Pradesh, India. *International Journal of Environmental Sciences*. 6(5):846–849.

Limsuwan C. 2005. CULTIVO INTENSIVO DEL CAMARON BLANCO: Resumen de visitas y conferencias a camaronerías del Perú en Noviembre 2005. Nicovita. Boletín Nicovita: Camarón de Mar. http://www.nicovita.com/extranet/Boletines/oct_dic_2005_01.pdf.

Ma C-W, Cho Y-S, Oh K-H. 2009. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11. *Aquaculture*. 287(3-4):266–270. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.061.

McIntosh, D., T.M. Samocha, E.R. Jones, A.L. Lawrence, D.A. McKee, S. Horowitz y A. Horowitz. 2000. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. *Aquaculture Engineering* 21(3): 215-227.

Melgar Valdes CE, Barba Macías E, Álvarez-González CA, Tovilla Hernández C, Sánchez AJ. 2013. Microorganisms effect with probiotic potential in water quality and growth of the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) in intensive culture. *Revista de Biología Tropical*. 61(3):1215–1228.

Pantoja C. 2012. Hepatopancreatitis Necrotizante: Capítulo 2.2.4. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals [Manual Acuático de la OIE].

Qi Z, Zhang X-H, Boon N, Bossier P. 2009. Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect. *Aquaculture*. 290(1–2):15–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.012.

Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Román L, Acosta B, Real F. 2010. Uso de probióticos en Acuicultura. *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*. (6 y 7):51–54.

Xingqiang W, Shen M, Shuanglin D. 2004. Studies on the biology and cultural ecology of *Litopenaeus vannamei*: a review. *Transactions of Oceanology and Limnology*. (4):94–100.

Qi Z, Zhang X-H, Boon N, Bossier P. 2009. Probiotics in aquaculture of China — Current state, problems and prospect. *Aquaculture*. 290(1–2):15–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.012.

Zokaei Far H, Saad CR, Daud HM, Harmin SA, Shakibazadeh S. 2009. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *African Journal of Biotechnology*. 8(14):3369–3376. <http://www.academicjournals.org/AJB>.