



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN  
AMBIENTAL**

**Efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento,  
supervivencia y estado sanitario de *Litopenaeus vannamei* en  
etapa de precría.**

**AUTOR:**

**Br. Ronald García Camizán**

**TUMBES, PERÚ**

**2019**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN GESTIÓN  
AMBIENTAL**

**Efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento,  
supervivencia y estado sanitario de *Litopenaeus vannamei* en  
etapa de precría.**

**AUTOR:**

**Br. Ronald García Camizán**

**TUMBES, PERÚ**

**2019**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Ronald García Camizán, declaro bajo juramento que los resultados encontrados y reportados en el trabajo de investigación, es el resultado de mi trabajo en conjunto con mi asesor y los miembros del jurado en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal, a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



---

Ronald García Camizán



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

## ESCUELA DE POSGRADO

### ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los once días del mes de diciembre el año dos mil diecinueve, a las 14.00 horas, en El aula 01 de la Escuela de Posgrado, se reunieron los miembros del Jurado designados con Resolución de Consejo de Escuela N° 0185-2019/UNT-EPG-CE, Dr. Leocadio Malca Acuña - Presidente; Dr. Martín Amaya Ayala - Secretario; Mg. Ricardo Saldoya Tinedo – Vocal y con Resolución Directoral N° 0212-2019/UNTUMBES-EPG-D se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis de maestría **EFFECTO DE LA APLICACIÓN DEL PROBIOTICO EN EL CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y ESTADO SANITARIO DE *Litopenaeus vannamei* EN ETAPA DE PRECRÍA**; presentado por el egresado del Programa de Maestría en Ciencias con Mención en Gestión Ambiental **BR. RONALD GARCÍA CAMIZÁN**, asesorado por el Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado con calificativo SOBRESALIENTE dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 15 y 30 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 11 de diciembre de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
**DR. LEOCADIO MALCA ACUÑA**  
Presidente


  
\_\_\_\_\_  
**DR. MARTIN AMAYA AYALA**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**MG. RICARDO SALDOYA TINEDO**  
Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

## RESPONSABLES

Br. RONALD GARCÍA CAMIZAN



---

EJECUTOR

Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA



---

ASESOR

## JURADO DICTAMINADOR

Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA



---

PRÉSIDENTE

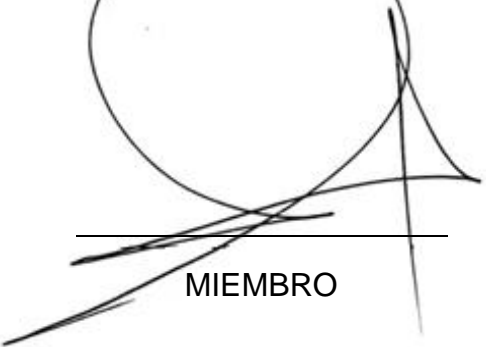
Dr. MARTIN AMAYA AYALA



---

SECRETARIO

Mg. RICARDO SALDOYA TINEDO



---

MIEMBRO

## AGRADECIMIENTO

A DIOS, por darme salud, vida y fuerza necesaria para llegar a este momento de una etapa más de mi vida en mi profanación personal como profesional que fue alcanzar esta gran meta que en un tiempo atrás me propuse.

Agradecer a mis padres **Catalino García y Hermelinda Camizán** por todo el esfuerzo e inmolación que pusieron mi formación y adiestramiento, también a mis hermanos **Cranelio, Hermenegildo, Antonio, Orfelinda, Ana Luisa y Elix**a por su apoyo incondicional en todo momento durante mi etapa de hermano y profesional.

A mi novia Isabel Huancas Alarcón por su apoyo moral, fuerza y paciencia durante todo el desarrollo de la Tesis para poder lograr juntos una meta trazada desde años atrás en el cual nos juntamos para dar paso a esta etapa.

Al Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila, por su apoyo incondicional durante todo el desarrollo de la redacción del proyecto, ejecución y redacción del informe final de la tesis.

Al Mg. Milton Socola Sunción, Peter Vaca Benítez por su apoyo y colaboración incondicional en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi Compadre Ing. Julio Farias Ariadel por su apoyo incondicional en durante la evaluación de las pruebas de laboratorio de la Tesis.

Agradecer a Jairo Reyes, José Astudillo, Kelly Sandoval, Luis Marchan, Leandro López, Keyla Chamba y Dalton Casariego, estudiantes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la universidad Nacional de Tumbes, por su apoyo incondicional durante la ejecución de la Tesis.



## **DEDICATORIA**

Primeramente, a Dios por darme la fortaleza necesaria, la vida y la salud. Por permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mi hijo\* (a) producto del gran amor de Isabel y Ronald, que aún se encuentra en la barriga de su Mamá, pero que ya se siente su presencia en la vida, formando una gran llama de amor en nuestros corazones.

A mis padres Catalino García y Hermelinda Camizán por su apoyo incondicional en todo momento de mi vida, tanto en mi vida personal como en mi formación profesional, por brindarme sus consejos y valores que permitieron desarrollarme y desenvolverme como una persona de bien.

**Ronald García C.**

**En memoria de mi hijo Andrés García Moscol.**

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>18</b>
<b>II. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.</b>	<b>22</b>
2.1. Antecedentes.	22
2.2. Bases teórico-científicas.	24
2.3. Definición de términos básicos.	28
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>31</b>
3.1. Tipo y diseño de investigación	31
3.2. Población, muestra y muestreo	32
3.2.1. Población	32
3.2.2. Muestra y Muestreo	32
3.3. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.	32
3.3.1. Material Biológico	32
3.3.2. Preparación de estanques	33
3.3.3. Captación del agua y llenado de tanques	33
3.3.4. Aireación	34
3.3.5. Recepción de las post-larvas de <i>L. vannamei</i>	34
3.3.6. siembra	35
3.3.7. Proceso de activación del probiótico	35
3.3.8. Preparación, adición de probiótico al alimento	36
3.3.9. Control de crecimiento de <i>Litopenaeus vannamei</i>	36
3.3.10. Control de supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i>	37
3.3.11. Estado Sanitario de <i>Litopenaeus vannamei</i>	38
3.3.12. Registro de parámetros de calidad de agua	39
3.4. Procesamiento y análisis de datos.	40

<b>IV. RESULTADOS.</b>	<b>41</b>
4.1. Crecimiento de <i>Litopenaeus vannamei</i>	41
4.2. Tasa de alimentación de <i>Litopenaeus vannamei</i>	42
4.3. Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
4.4. Factor de conversión alimenticio	44
4.5. Estado Sanitario de <i>L. vannamei</i>	45
4.6. Parámetros físicos – químicos del agua	47
4.7. Enfoque ambiental del uso de probiótico en la acuicultura	48
<b>V. DISCUSIÓN.</b>	<b>57</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	<b>64</b>
<b>VII. RECOMENDACIÓN.</b>	<b>67</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS.</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Densidad de siembra y población de <i>Litopenaeus vannamei</i> en los tanques de cultivo.	35
Tabla 2. Crecimiento y supervivencia de <i>L. vannamei</i> , tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas en etapa de precría.	41
Tabla 3. Microbiología para bacterias verdes y amarillas de post-larvas de <i>L. vannamei</i> .	46
Tabla 4. Observación en fresco de post-larvas de <i>L. vannamei</i> en tratamiento control y con probiótico.	47
Tabla 5. Registro de parámetros físicos-químicos del agua de cultivo de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría.	48
Tabla 6. Crecimiento de bacterias verdes y amarillas presentes en el agua de los tratamientos, sembrados en medio TCBS.	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Ubicación geográfica de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes.	<b>31</b>
Figura 2. Ubicación del Taller de investigación experimental en recursos acuáticos I.	31
Figura 3. Acondicionamiento de los tanques de concreto del Taller de investigación experimental en recursos acuáticos I.	33
Figura 4. Llenado de tanques de concreto	34
Figura 5. Activación de las bacterias probióticas	36
Figura 6. Balanza electrónica marca Kambor donde se realizó el peso de <i>L. vannamei</i> .	37
Figura 7. Crecimiento promedio de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría utilizando probiótico como alimentación suplementaria.	42
Figura 8. Tasa de alimentación (% de biomasa) diaria en relación al peso promedio de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría.	43
Figura 9. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría utilizando probiótico como alimentación suplementaria	44
Figura 10. Factor de conversión alimenticio de <i>L. vannamei</i> con bacterias probióticas como alimento suplementario y con alimento propio del agua.	45
Figura 11. Nivel promedio de oxígeno disuelto del tratamiento control, tratamiento con probiótico y estándar de calidad ambiental.	49
Figura 12. Nivel promedio de la temperatura en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando probiótico como biorremediador y estándar de calidad ambiental.	50
Figura 13. Nivel promedio del pH en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.	51

Figura 14. Nivel promedio del nitrito en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando probiótico como biorremediador y estándar de calidad ambiental.	52
Figura 15. Nivel promedio del amoniaco en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.	53
Figura 16. Nivel del amoniaco relacionado con el pH en el agua, tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.	54
Figura 17. Nivel del nitrito relacionado con el pH en el agua, tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.	55
Figura 18. Nivel del amoniaco relacionado con el pH y la temperatura del agua, tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.	56
Figura 19. Nivel del nitrito relacionado con el pH y la temperatura del agua, tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.	56

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
Anexo 1. Crecimiento, supervivencia, biomasa, alimento acumulado y factor de conversión en etapa de precría de <i>L. vannamei</i>	<b>75</b>
Anexo 2. Peso promedio de <i>L. vannamei</i> utilizando bacterias probióticas en etapa de precría.	76
Anexo 3. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> utilizando bacterias probióticas en etapa de precría.	77
Anexo 4. Observación en fresco de post-larvas de <i>L. vannamei</i> , en diferentes días del cultivo.	77
Anexo 5. Registro del oxígeno disuelto (mg/L) y la desviación estándar diaria en etapa de precría de <i>L. vannamei</i> .	78
Anexo 6. Registro de la Temperatura (°C) y la desviación estándar diaria en etapa de precría de <i>L. vannamei</i> .	79
Anexo 7. Registro del pH y la desviación estándar diaria en etapa de precría de <i>L. vannamei</i> .	80
Anexo 8. Registro diario del nitrito NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> presente en el agua de cultivo de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría	81
Anexo 9. Registro diario de amoníaco (NH <sub>2</sub> +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) presente en el agua de cultivo de <i>L. vannamei</i> en etapa de precría	82
Anexo 10. Registro diario de la salinidad (mg/L) en etapa de precría de <i>L. vannamei</i>	83

## RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo por objeto determinar el crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *L. vannamei* en etapa de precría, utilizando probiótico comercial (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp*), como prebiótico utilizando 6 g/kg de alimento balanceado para colonizar el tracto digestivo del animal y como biorremediador  $7,92 \times 10^7$  UFC/mL, para mejorar la calidad del agua y suelo de los tanques, y se tuvo un Control (bacterias naturales del agua de cultivo) y se alimentó solo con alimento balanceado comercial al 45 % de proteína. El mejor tratamiento fue con bacterias probióticas que se logró un crecimiento en peso promedio de 0,1 g, supervivencia del 95 %, tasa de alimentación del 13 % de su biomasa, F.C.A fue de 1,25 hallando diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), bacterias verdes presentes en las post-larvas no se encontraron durante el tiempo de cultivo,  $500 \pm 10,1 \times 10^3$  UFC/g de bacterias amarillas, también se logró el 89 % de lípidos y no se encontró deformidad de túbulos, gregarinas, detritos, ectoparásitos y necrosis; para la calidad del agua no se encontró variación significativa entre tratamientos obteniendo parámetros promedios de oxígeno disuelto:  $5,95 \pm 0,46$  mg/L, Saturación de oxígeno  $80,41 \pm 2,58$  %, Temperatura:  $25,58 \pm 0,24$  °C, Salinidad:  $33,52 \pm 0,39$  mg/L, nitrito:  $0,24 \pm 0,12$  mg/L, amoníaco:  $0,19 \pm 0,10$  mg/L y pH:  $7,66 \pm 0,16$ . En los ecosistemas acuáticos naturales, las concentraciones de amoníaco para el tratamiento control llegó hasta 1,5 mg/L, y fue superior al Estándar de Calidad Ambiental (ECA); y el oxígeno disuelto y pH, temperatura, salinidad cumplieron dentro de los ECAs; nitrito no se encuentran establecidos en estos estándares.

**Palabras clave:** Probiótico, prebiótico, biorremediador, *Litopenaeus vannamei* y calidad ambiental.



## ABSTRACT

This research work was aimed at determining the growth, survival and health status of *L. vannamei* in the pre-stage, using commercial probiotic (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* and *Nitrobacter sp*), as prebiotic using 6 g/kg of food balanced to colonize the digestive tract of the animal and as a bioremediator  $7,92 \times 10^7$  CFU/mL, to improve the quality of the water and soil of the tanks, and there was a Control (natural bacteria of the cultivation water) and fed only with commercial balanced food at 45% protein. The best treatment was with probiotic bacteria that achieved an average weight growth of 0,1 g, survival of 95 %, feeding rate of 13 % of its biomass, FCA 1,25 ( $p < 0,05$ ), green bacteria present in the post-larvae were not found during the cultivation time,  $500 \pm 10,1 \times 10^3$  CFU/g of yellow bacteria, 89 % of lipids were also achieved and no deformity of tubules, gregarins, detritus, ectoparasites and necrosis was found; for water quality, no significant variation was found between treatments obtaining average parameters of dissolved oxygen:  $5,95 \pm 0,46$  mg/L, oxygen saturation  $80,41 \pm 2,58$  %, Temperature:  $25,58 \pm 0,24$  °C, Salinity:  $33,52 \pm 0,39$  mg/L, nitrite:  $0,24 \pm 0,12$  mg/L, ammonia:  $0,19 \pm 0,10$  mg/L and pH:  $7,66 \pm 0,16$ . In natural aquatic ecosystems, ammonia concentrations for the control treatment reached up to 1,5 mg/L, and exceeded the Environmental Quality Standard (ECA); and dissolved oxygen and pH, temperature, salinity met within the ECAs; Nitrite are not established in these standards.

**Keywords:** Probiotic, prebiotic, bioremediator, *Litopenaeus vannamei* and environmental quality.

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la acuicultura está considerada como una de las actividades con mayor desarrollo, debido a que viene creciendo a pasos agigantados por su excelente calidad de alimento y además es una fuente de trabajo e ingresos para un gran número de personas generando millones de dólares debido a los incrementos de oferta del langostino, sin embargo, la acuicultura crece exponencialmente debido a que es una fuente de trabajo e ingreso a un gran número de personas.

El cultivo de *Litopenaeus vannamei* posee expectativas muy positivas en el ámbito de la acuicultura global, sin embargo, presenta riesgos significativos en cuanto a la aparición de enfermedades, cultivos desordenados que conllevaron a una degradación ambiental y bajos niveles de producción, además al aumentar las densidades de siembra, también aumenta la cantidad de materia orgánica en descomposición debido a que se utiliza mayor cantidad de alimento balanceado en el manejo del cultivo, consecuentemente se obtiene alimento no consumido, de la misma forma aumenta las heces de los camarones.

La calidad del agua de abastecimiento y suelo de los estanques en la acuicultura específicamente de los cultivos de *L. vannamei*, depende generalmente del manejo del cultivo, asimismo de la densidad de siembra de la especie, sin embargo, los sedimentos orgánicos e inorgánicos son la fuente principal de la contaminación ambiental, debido a que la descarga de los efluentes de los cultivos de camarón son vertidos directamente a los canales de marea, sirviendo como sumideros de los efluentes acuícolas aumentando la presencia de nuevos microorganismos patógenos que alteran el impacto ambiental, además estos canales de marea sirven a su misma vez como fuente de abastecimiento para los mismos cultivos.

La acuicultura es una de las actividades consideradas con mayor desarrollo a nivel mundial, se produce seis millones cuatrocientos mil toneladas de langostino, destinando el 55 % para el autoconsumo de los países productores, equivalente a 2 millones 800 mil toneladas y un 45 % equivalente a 1 millón 872 mil toneladas fueron destinados a los mercados

mundiales, sin embargo la producción mundial de camarón es de 29 639 millones de dólares debido a los incrementos de la oferta del langostino a nivel mundial (Sagarpa 2011).

En el Perú la actividad langostinera se encuentra en ascenso, luego de las bajas que sufriera debido al Fenómeno El Niño 1997-1998, y en el año 2000, por el virus de la mancha blanca (WSSV). En el 2005 esta actividad generó más de 33 millones de dólares; más del 50% de las exportaciones de acuicultura del Perú en valor y volumen desde 2004, según la Comisión para la Promoción de Exportaciones – PROMPEX (Berger 2004).

En Tumbes, Perú, las actividades acuícolas, extractivas y agrícolas impactan negativamente al agua, los sedimentos, la flora y fauna, sobre los ecosistemas del manglar de la Región Tumbes, sin embargo, los valores de los máximos límites permisibles de las variables físico-químicas del agua y suelo están dentro de los estándares propuestos por la ley de aguas (Clase VI: Aguas de zona de preservación de fauna y pesca comercial) (Hidalgo 2007).

En Tumbes, Perú, la actividad langostinera se desarrolla desde la década de los años 70, con una extensión aproximada de 3 500 ha, desde entonces se ha incorporado nuevos avances tecnológicos y empresariales en el cultivo de *L. vannamei*, manteniendo un producto de alta calidad y demanda en el mercado nacional y extranjero, debido a que existe una alta demanda mundial de recursos hidrobiológicos que la pesca extractiva no puede atender (Socola 2016).

Con el crecimiento anual del 8 % implicó que los animales en cultivos intensivos se vean expuestos a constante estrés lo que conlleva a generar problemas relacionados con enfermedades y avería ambiental dando como resultando pérdidas económicas, debido a que se utilizó medicina veterinaria como prevención y control de enfermedades, sin embargo el uso de agentes antimicrobianos genero resistencia a los diferentes tratamientos de los patógenos, conllevando a buscar nuevas estrategias para el control de patógenos, entre ellos aparecen los probióticos (García 2015).

El control de enfermedades en acuicultura, tanto profiláctico como terapéutico, se basó históricamente en el uso de antimicrobianos (Cabello *et al.* 2013); sin embargo, esta práctica es ampliamente criticada en la actualidad por su impacto en la acumulación de residuos en el ambiente y el desarrollo de resistencia, lo que también afecta la aceptación de los productos por parte de los consumidores (Kumar *et al.* 2016; Liu *et al.* 2014). Por otro lado, se requiere de buenas prácticas acuícolas que garanticen un mejor aprovechamiento del alimento por parte de los animales con el fin de incrementar la productividad del proceso. La administración de microorganismos para aumentar la resistencia a enfermedades y mejorar el estado nutricional de los camarones es un método amigable con el medio ambiente y más seguro (Camacho 2012).

El cultivo de langostino actualmente está siendo afectado por enfermedades causadas especialmente por patógenos oportunistas que dan como resultado grandes pérdidas económicas. El efecto adverso de la quimioterapia en la producción de langostino es no utilizar antibióticos y optar por agentes amigables con el medio ambiente como son los probióticos que vienen siendo un enfoque novedoso debido a que causan respuesta inmune innata en el cultivo de *L. vannamei*, debido a que combaten las enfermedades producidas por bacterias y virus (Kumar *et al.* 2016).

El uso de probióticos como suplementos de la alimentación animal de granja, originalmente fueron incorporados en alimentos para aumentar el crecimiento del animal y mejorar su salud aumentando su resistencia a las enfermedades. Los resultados obtenidos en muchos países han indicado que algunas de las bacterias utilizadas en los probióticos son capaces de estimular el sistema inmune (Fuller 1992). Las bacterias probióticas son añadidas a los sistemas de producción acuícola para mejorar y manipular las comunidades microbianas presentes en el agua y sedimento, para reducir o eliminar a las especies patógenas seleccionadas, y para mejorar el crecimiento y supervivencia, de las especies acuáticas en cultivo (Morales 2012).

Las enfermedades causadas por patógenos principalmente como bacterias, protozoarios, virus y hongos constituyen un factor limitante en el desarrollo del cultivo de *L. vannamei* y en la acuicultura general, una alternativa viable para el control de estas enfermedades es la prevención utilizando microorganismos benéficos llamados probióticos como control biológico que son bacterias que estimulan el crecimiento y mejora la salud de los organismos (Partida 2009).

En este contexto se pretende utilizar probiótico con la finalidad de mejorar los estándares de calidad ambiental, asimismo que permita la colonización a nivel del intestino de post-larva de *L. vannamei*. Se ha reportado que la aplicación de probiótico en el cultivo de crustáceos y peces combate contra organismos patógenos y producen sustancias antimicrobianas. Así mismo es una alternativa para no utilizar antibióticos que puedan poner en peligro la sustentabilidad de los recursos naturales, y la salud humana.

Por esta razón se plantea la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *Litopenaeus vannamei* en etapa de precría?

Para esta investigación se planteó como objetivo general:

Determinar y analizar el efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *L. vannamei* en etapa de precría.

## II. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

### 2.1. Antecedentes

La producción de *L. vannamei* actualmente la controlan algunos países principalmente del Sudeste Asiático y América Latina, sin embargo, existen cultivos de langostino en más de 55 países alrededor del mundo, además en los países desarrollados se trabaja para desarrollar nuevas tecnologías de cultivos super-intensivos, además la recirculación del agua, alimentación automatizada, posiblemente esta tendencia no cambie significativamente en un futuro cercano, sin embargo, es posible que América Latina y Asia compitan en un futuro (Jory 2001).

Las bacterias tienen un mecanismo de acción con respecto a la disminución del pH por la producción de ácido orgánico hasta producir peróxido de hidrógeno que en muchos de los casos es patógeno para los patógenos, degradan la materia orgánica, controlan el crecimiento de las cianofitas y disminuyen los gases como amoníaco, nitratos y sulfuros en el agua, sin embargo, también pueden mejorar la calidad de agua y suelo según la dosis y características de bacterias que se adicionen al medio de cultivo (Gullian 2001).

Los probióticos disminuyen los niveles de gases de amonio, nitritos y sulfuro de hidrógeno aplicando dosis de 6 kg/ha repitiendo la dosis cada siete días, debido a que los probióticos están compuestos por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, además señalan que en estanques sembrados a 41 PL/m<sup>2</sup>, los niveles de amonio en promedio fueron bajos en los estanques que se les adicionó bacterias probióticas (0,0926 ppm) en comparación a los que no se aplicaron (0,1676 ppm) (Tabbu *et al.* 2000).

Las post-larvas de *L. vannamei* en precría asegura un potencial de crecimiento compensatorio, mejora la supervivencia y se aumenta la resistencia a enfermedades recurrentes en los estanques de engorde. Con respecto a la eficiencia de este sistema de cultivo depende de la

densidad de siembra, alimentación natural, alimentación balanceada y factores de calidad agua, además la precría se ha vuelto una práctica común en países como Perú y Ecuador, además ya se realizan en invernaderos (Socola 2016).

Los tanques pertenecientes a los sistemas de precría permiten calcular con mayor eficiencia la población existente, además cuando se realiza la transferencia a los estanques de engorde aumenta la probabilidad del porcentaje de supervivencia de la población, tanto en sistemas de cultivo semi-intensivo como en sistemas de cultivo intensivo (Saldarriaga 1995).

El del sistema de precría, ayuda a la reducción significativa de los días de cultivo debido a que los organismos cultivados en este sistema tienen un mejor aprovechamiento del alimento suministrado, además en los estanques de engorde tienen mejor crecimiento, supervivencia y resistencia a enfermedades, asegurando además una mejor aclimatación y adaptación de los animales al momento la transferidos a los estanques de engorde (Ching 2014; Vanoni 2014; Arias 2010).

La palabra probiótico al largo del tiempo ha alcanzado una diversidad de usos, naciendo a principios del siglo XX con los trabajos de Metchnikoff, quien sustentó que la ingestión de microorganismos benéficos era un buen mecanismo de control contra el establecimiento de microorganismos patógenos (Gullian 2001).

En la actualidad los probióticos son utilizados como control biológico como son las bacterias de los géneros (*Vibrio*, *Bacillus*, *Seudomonas* y *Levaduras*) en la prevención contra agentes patógenos, además representan una alternativa para mejorar la salud y el crecimiento de los organismos en la acuicultura (Balcazar *et al.* 2007).

El efecto probiótico ha sido contemplado en el fitoplancton (microalgas), que es la base de la cadena trófica acuática, siendo generadores de nutrientes gracias a su acción fotosintética. Los organismos superiores en su mayoría tienen incapacidad para sintetizar “ácidos grasos poli-

insaturados y vitaminas”. Un estudio realizado anteriormente evaluó la factibilidad de co-cultivar el probiótico C7b, junto con la microalga *Chaetoceros muelleri*, demostrando que, sin afectar a esta microalga, estos organismos se pueden cultivar juntos a densidades altas y servir de alimento para camarones (Kumar *et al.* 2016).

Los probióticos hacen referencia a todos los alimentos complementarios basados en microorganismos vivos, entre los que sobresalen son “los productos elaborados con Géneros como *Aeromonas*, *Bacilos*, bacterias acidificantes (*Lactobacilos*, *Bifidobacterias*), *Streptococos*, *Levaduras*, Microalgas, *Pseudomonas*, *Vibrio* o subproductos provenientes de éstos que pueden ser suministrados en las dietas, directo en el medio y/o al interior del organismo” (Espinoza 2017).

Las investigaciones sobre probióticos para la acuicultura actualmente están en una etapa temprana de su desarrollo. Las bacterias probadas como probióticos son las de géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y algunos *Lactobacillus*, sin embargo, la información existente no es concluyente y con poca claridad en su diseño, conllevando a una evaluación crítica de los estudios (Gomez\_Gil *et al.* 2000).

## **2.2. Bases teórico-científicas**

Ministerio del Ambiente (2017), aprueban los estándares de calidad ambiental mediante el Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM dentro de sus disposiciones complementarias los niveles permitidos para la conservación del ambiente acuático son: nitratos 13 mg/L, amoníaco 2 mg/L, oxígeno disuelto mayor que 4 mg/L, potencial de hidrogeno entre 6,8 a 8,5 iones de hidrogeno, temperatura que no varíe más de 2 °C, demanda biológica de oxígeno 10 mg/L, solidos suspendidos totales menor que 30 mg/L y para los sulfuros 0,002 mg/L.

Saldarriaga (2013), determino los niveles de las características del agua de los ecosistemas acuáticos naturales, sumideros de efluentes



del cultivo intensivo de *Penaeus vannamei*, y la eficiencia de remoción del efluente tratado mediante dos procesos: 1) Sedimentación-biofiltración con bacterias probióticas (Gram positivas de los géneros: *Streptobacillus*, *Bacillus*, *Diplobacillus* y *Coccobacillus*) a  $10^8$  UFC/mL y  $10^9$  UFC/mL utilizó tres tiempos de retención hidráulica (TRH): 6 h, 12 h y 24 h, el mejor tratamiento fue el de biofiltración con  $10^9$  UFC/mL y 24 h de TRH: Sólidos suspendidos totales (SST) 97,30 %; nitrógeno amoniacal total (TAN) 29,76 %; nitrato, 79,41 %; bacterias heterotróficas: 99,83 %; coliformes termotolerantes, 90,34 %; el oxígeno disuelto y pH estuvieron dentro de lo que establece el ECAs.

Massaut *et al.* (2005), citado por Saldarriaga (2013), señalan que incrementando la densidad de siembra en el cultivo de *L. vannamei* también aumenta la tasa de alimentación y la biomasa de un estanque de cultivo, sin embargo, mencionan que del alimento que se agrega al estanque de cultivo sólo el 25 % al 45 % del nitrógeno, 20 % al 30% del fósforo y entre el 10% al 15 % del carbono, son convertidos en tejido de langostino, el otro porcentaje es aprovechado por la microflora, también se acumula como nutrientes inorgánicos que pueden alcanzar concentraciones tóxicas para el langostino, que luego son descargados directamente al medio ambiente en los recambios de agua y cosecha.

Massaut *et al.* (2005), reportaron que en cultivo intensivo de *L. vannamei* (langostino) los niveles de variación de los parámetros encontrados durante el tiempo del cultivo fueron para el Nitrógeno Amoniacal (TAN) fluctuó entre 0,00 mg/L a 7,00 mg/L, nitritos entre 0,00 mg/L a 6,20 mg/L, nitratos entre 0,00 mg/L a 18,00 mg/L, nitrógeno total entre 0,50 mg/L a 13,00 mg/L, fosfatos entre 0,00 mg/L a 8,59 mg/L, fósforo total entre 0,05 mg/L a 28,60 mg/L, Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $DBO_5$ ) entre 1 mg/L a 50 mg/L, Total de Sólidos Suspendidos (TSS) entre 9 mg/L a 1 147 mg/L y Clorofila  $\alpha$ , entre 20  $\mu$ g/L a 250  $\mu$ g/L.

Chandran *et al.* (2014) utilizó *Bacillus cereus* como bacteria probiótica a una concentración de (0,1-0,4% / 100 g de alimento) en las dietas D1-

D4. Durante el experimento se cultivó post-larvas de *P. monodon* (PL-15) en tanques de 1 m<sup>3</sup> de capacidad durante 90 días obteniendo una supervivencia de 82.0 ± 1.60 %, mientras que en el control fue de 65.0 ± 1.33 %, Sin embargo, los parámetros de calidad del agua mostraron variaciones no significativas (P > 0.05). Reportando que *B. cereus* a una concentración de 0,4% / 100 g de alimento es eficaz para estimular el crecimiento y la inmunidad en los camarones.

Orellana y Ayala (2017), realizaron análisis de agua en estanques de cultivo de *L. vannamei* en Usulután, El Salvador, realizaron cultivos en tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y pseudomona cetrímide, encontrando 100 U.F.C./mL de colonias amarillas y 200 UFC/mL para las colonias verdes en diluciones de 1/100 y 1/100.

Dalmin *et al.* (2001), utilizaron *Bacillus spp.* En un estanque de cultivo de *P. monodon*, reportando resultados que las poblaciones de *Bacillus spp.* En el estanque experimental aumentaron y los vibrios disminuyeron después de cada aplicación de probióticos, sin embargo, en el estanque control los *Bacillus spp.* Eran bajos y los niveles de vibrios eran altos, también indicó que los probióticos promueven el crecimiento y las tasas de supervivencia y aumenta el estado de salud de los camarones sin estrés y brotes de enfermedades.

Villamil y Martínez (2009), utilizaron probiótico a base de *bacillus*, además menciona que no existen muchos reportes de investigación de estos microorganismos en larvas de *L. vannamei*, además señala que son capaces de reducir las concentraciones de nitrito, nitratos y amoníaco en el agua y la interacción de las microalgas estabilizando los factores nutricionales del alimento vivo que contribuye a la microflora intestinal.

Yan (2007), evaluó el efecto de los probióticos sobre el crecimiento y la actividad enzimática digestiva del camarón *P. vannamei*. Se añadió el probiótico, bacterias fotosintéticas y *Bacillus sp.* a cada una de las dietas basales en tres tratamientos: T-1, 2 g/kg; T -2, 10 g/kg y T-3, 20

g/kg. Se utilizaron 12 acuarios con tres repeticiones para cada grupo de tratamiento y un grupo control. Después de 28 días de recibir las dietas suplementadas con probióticos los camarones mostraron un rendimiento significativamente mejor que los alimentados con la dieta basal (control).

Socola (2016), estudio la densidad de siembra en etapa de precría de 7 560 000 post-larvas, en estadio PL-12, con un peso promedio de 3,13 mg  $\pm$  0,16 mg, sembró a densidades de 20 PL/L, 30 PL/L y 40 PL/L, utilizó alimento balanceado con 45 % de proteína, con una tasa de alimentación inicial de 25 % de la biomasa, la cual disminuyó a razón de 1 % por día, distribuido en 12 frecuencias durante un periodo de tiempo de 10 días. Encontrando el mejor crecimiento y supervivencia con la menos densidad y fue peso promedio final de las post-larvas a las densidades de 20 PL/L, 30 PL/L y 40 PL/L fue de 27,00 mg  $\pm$  2,08 mg, 21,33 mg  $\pm$  2,09 mg y 17,67 mg  $\pm$  1,53 mg, respectivamente, obteniendo diferencias significativas entre estos pesos ( $p < 0,05$ ). La supervivencia promedio final a 20 PL/L y 30 PL/L fue de 96,98 %  $\pm$  0,74 % y 96,15 %  $\pm$  1,07 %, respectivamente, que no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Saldarriaga (2013), señala que la polución de un estanque de cultivo de *L. vannamei* en Tumbes de forma de materia orgánica depende de la densidad de siembra y la frecuencia de alimentación balanceada, que influyen directamente en los niveles de sólidos disueltos y metabolitos tóxicos hallados en los efluentes, puesto que al aumentar las densidades de siembra, el aporte alimenticio balanceado también aumenta, en efecto el alimento no consumido y las excretas de los camarones ayudan en tener malas condiciones de la calidad de agua.

Sánchez-Ortiz *et al.* (2015), estudiaron bacterias probióticas (*Enterococcus casseliflavus*, *Citrobacter koseri*, *Bacillus subtilis subtilis* y *Staphylococcus sp*) para evaluar su potencial en cultivo de *L. vannamei* realizado, sus resultados fueron que *Bacillus subtilis subtilis* y una mezcla de todas las bacterias mencionadas presentaron un

crecimiento significativo versus el control y además presentó una mejor tasa de supervivencia en *L. vannamei*.

Camacho (2012), evaluó el crecimiento, supervivencia y factor de conversión alimenticio para este trabajo utilizó aditivos comerciales a base de probióticos en las dietas para camarón *L. vannamei*, reportando que encontró mejores resultados en crecimiento, supervivencia y factor de conversión alimenticio a los tratamientos que fueron alimentadas con probióticos como alimento suplementario, a diferencia de la dieta control que no se utilizó probióticos.

Partida (2009), evaluó el efecto de probiótica insulina, *bacillus*, bacterias ácido lácticas y levaduras en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune de *L. vannamei*, el probiotico se adicono al alimento por aspersion con aceite de pescado. Encontró que el crecimiento control su peso promedio fue de  $7,01 \pm 0.17$  g y supervivencia del 97 %, mientras que en los tratamientos experimentales fue de  $7,08 \pm 0.20$  g y 100 % de supervivencia.

### **2.3. Definición de términos básicos.**

- **Acuicultura**

Es el conjunto de métodos, técnicas, protocolos de producción y actividades cuyo objetivo es el cultivo en cautiverio de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos, reptiles o algas) (Partida 2009). Es el control de crecimiento y producción de especies susceptibles a ser cultivadas en un medio acuático, controlando su crecimiento y rentabilidad (Naranjo y Salvador 2016).

- **Cultivo Intensivo**

Es el sistema de cultivo de organismos acuáticos con densidades altas de siembra. Requiere un especial diseño de la infraestructura y aireación mecánica permanente, y alimento artificial,

complementada por alimento natural” (*flocs*) (Cuéllar-Ángel *et al.* 2010).

- **Densidad de siembra**

En acuicultura se describe al número de camarones por metro cuadrado, además influye de forma directa en el crecimiento y supervivencia de la especie (Naranjo y Salvador 2016).

- **El crecimiento**

Es el desarrollo del incremento en peso en función al tiempo de cultivo producto de las mudas (Gisbert *et al.* 2013).

- **Sobrevivencia**

En acuicultura se describe como la cantidad de organismos que resisten diferentes fases en su ciclo de vida como cambios climáticos, patologías, etc durante el tiempo de cultivo en medio acuático.

- **Calidad de agua**

Son las características físicas, químicas y biológicas del agua, así como factores bióticos y abióticos, que influyen en un cuerpo de agua en función al desempeño de las especies (Saldarriaga 2013).

- **Frecuencia de Alimentación**

Se refiere al número de repeticiones que se requiere suministrar por día a un cultivo de langostino (Socola 2016).

- **Probiótico**

g son microorganismos o sustancias producidas por los mismos con la capacidad de ayudar a mantener el equilibrio del microbiota intestinal (López *et al.* 2013).

- **Biorremediador**

Es la inoculación del probiótico en un sustrato de melaza y agua para su activación con una temperatura de 36,5 y 37°C y se aplican estos microorganismos al agua (Melgar *et al.* 2012).

- **Prebiótico**

Se agrega al alimento como cultivo liofilizado y se mezcla con lípidos para recubrir el pellet del balanceado, como también se puede utilizar el método del secado convencional y preservar las ácido-lácticas adicionadas al alimento (Kumar *et al.* 2016).

- **Genero Bacillus**

Son bacterias anaeróbicas Gram (+) que forman esporas y producen compuestos antagónicos, encontrados en forma natural en el intestino del langostino, agua dulce y de mar (Decamp *et al* 2006).

- **Genero Lactobacillus**

Bacteria ácido láctica gram positiva, benigna y anaeróbica debido a que convierten la lactosa y monosacaridos en ácido láctico permitiendo la inhibición de bacterias patógenas (Partida 2009).

- **Antagonismo**

Es un fenómeno de equilibrio entre los microorganismos benéficos y los microorganismos patógenos, las interacciones microbianas cumplen un rol muy importante (Aguirre, Lara, Sánchez, Campa y Luna., 2012). Se estima que, en los sistemas de cultivo, la principal acción que acontece es la inhibición del crecimiento de otros microorganismos (Priyadarshini *et al.* 2013).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Tipo y diseño de Investigación

La investigación se llevó a cabo en el Taller de investigación experimental en recursos acuáticos I de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la localidad de Puerto Pizarro, distrito y provincia de Tumbes, a 0567428 E y 9612561 N, Zona geográfica 17 (Figura 1).



Figura 1. Ubicación geográfica de la Facultad de Ingeniería Pesquera y ciencias del Mar de la Universidad nacional de Tumbes (Fuente Google Earth).



Figura 2. Ubicación del Taller de investigación experimental en recursos acuáticos I (Imagen de propio autor).

De acuerdo al fin que se persigue la investigación es de tipo aplicada – experimental (Tresierra 2000), porque consistió en la aplicación de conocimientos en las pruebas realizadas sobre el efecto del Probiótico en la acuicultura y el medio ambiente para transformar luego estos conocimientos científicos en tecnología que sea aplicara a la industria de la acuicultura y el cuidado del medio ambiente.

En el diseño experimental se tomó dos grupos experimentales definidos, un grupo se experimentó utilizando las bacterias probióticas a una concentración de  $3 \times 10^7$  UFC/mL como biorremediador, además como método preventivo se dosificó 6 g de probiótico comercial/kg de alimento balanceado y un control con bacterias naturales presentes en el agua.

### **3.2. Población, muestra y muestreo de estudio.**

#### **3.2.1. Población.**

La población total fue de 36 000 post-larvas de *Litopenaeus vannamei* de 0,0040 g y con pelegramo de 250 postl/g que fueron adquiridas del laboratorio de post-larvas Texcumar S. A, Sn pablo, Guayaquil de la República del Ecuador y sembradas en 6 tanques de 2.5 m<sup>3</sup> de capacidad cada uno.

#### **3.2.2. Muestra y Muestreo.**

Para el control de los parámetros como el crecimiento y supervivencia de *L. vannamei* fue diariamente por 18 días de cultivo que duro el experimento, consistió en tomar una muestra de post-larvas/tanque y pesarlas en una balanza grámera y luego se contaron y se devolvieron a sus respectivos tanques, para el control microbiológico y de patología en fresco la muestra fue de 30 post-larvas/ tratamiento que se sacrificaron repitiendo esta evaluación cada tres días.

### **3.3. Métodos, Técnicas e Instrumentos de Recolección de datos**

#### **3.3.1. Material Biológico**



Se utilizó 36 000 post-larvas de *Litopenaeus vannamei*, provenientes del laboratorio de post-larvas Texcumar S. A, Sn pablo, Guayaquil de la República del Ecuador, además se utilizó un probiótico comercial que contiene bacterias como: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp* a una concentración de  $1 \times 10^3$  UFC/g.

### 3.3.2. Preparación de los tanques

Los 6 tanques de concreto de 2,5 m<sup>3</sup> de capacidad fueron limpiados con escobas y escobillas refregando el fondo y los lados internos y externos de los tanques y se lavó con abundante agua, luego se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5 %, y se dejó secar por 3 días.



Figura 3. Acondicionamiento de los tanques de concreto del Taller de Investigación experimental en recursos acuáticos I (Imagen propio autor).

### 3.3.3. Captación del agua y llenado de tanques

El agua será captada del canal de marea Puerto Rico con una electrobomba trifásica marca Pentair de 3 " de diámetro y 2,5

HP de potencia, luego fueron llenados los seis tanques a un tirante de agua de 1 m de tirante de agua.



Figura 4. Llenado de tanques de concreto (Imagen del propio autor).

#### **3.3.4. Aireación**

Se instaló aireación mecánica mediante un blower de 2 HP, que distribuyó el aire a los tanques donde se realizó el cultivo mediante mangueras de 5 mm de diámetro y piedras difusoras para tener menor tamaño de la burbuja, la aireación estuvo en funcionamiento las 24 horas del día durante los 17 días que duró el cultivo.

#### **3.3.5. Recepción de las post-larvas de *L. vannamei***

Las post-larvas de *L. vannamei* fueron adquiridas del laboratorio de larvas Texcumar S.A de San Pablo, Guayaquil –Ecuador, estas post-larvas llegaron con un peso promedio de 0,0040 g con pelegamo de 250 postl/g, con parámetros físicos- químicos, oxígeno disuelto de 4 mg/L, Salinidad de 33 mg/L, temperatura a 23 °C y pH de 7,5.

### 3.3.6. Siembra

Para la siembra se utilizó 36 000 post-larvas de *L. vannamei* de 0,0040 g de peso promedio, y fueron sembrados a una densidad de siembra de 2 400 postl/m<sup>3</sup>, equivalente a 6 000 post-larvas por tanque de cultivo, la siembra se dio con los siguientes parámetros físicos-químicos del agua: temperatura 25,2 °C, oxígeno disuelto a 5 mg/L, amoníaco (NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>) de 0,01 mg/L, nitrito (NO<sub>2</sub>) de 0,01 mg/L, Ph de 7,3; Salinidad 32,8 mg/L, es necesario mencionar que se pudo las fundas que contenían las larvas en contacto con el agua de los tanques para aclimatar la temperatura mediante difusión, para luego liberarlas a los tanques.

Tabla 1. Densidad de siembra y población de *Litopenaeus vannamei* en los tanques de cultivo.

Tratamiento	Tanque 1		Tanque 2		Tanque 3	
	Densid. (PI/L)	Poblac.	Densid (PI/L)	Poblac.	Densid. (PI/L)	Poblac.
Control	2,5	6 000	2,5	6 000	2,5	6 000
Experimental	2,5	6 000	2,5	6 000	2,5	6 000

### 3.3.7. Proceso de activación del Probiótico.

Para activar el probiótico comercial consistió en pesar 5 g del Probiótico comercial en una balanza gramera marca exbell 520 con un rango de medición de 0,00 a 300 mg; este probiótico contiene bacterias como *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp*, y se disolvió en 15 litros de agua del canal de marea Puerto Rico, 60 g de polvillo de arroz y 60 mL de melaza, y se dejó fermentar por 48 horas y luego se aplicó por 18 días a razón de 5 L de probiótico activado al tratamiento experimental a una concentración de  $7,92 \times 10^7$  UFC/mL.



Figura 5. Activación de las bacterias probióticas.

### 3.3.8. Preparación, adición de probiótico y alimentación.

Para la preparación del alimento con probiótico para el grupo experimental (3 tanques) se utilizó la siguiente relación: 1kg de alimento comercial de 45 % de proteína de 0.5 mm de diámetro del *pellet* y 6 g de probiótico comercial y 2 ml de melaza 8 ml de probiótico activado. La alimentación suministrada al voleo, se realizó 12 veces al día a razón de 2 horas/ dosis, además la dosis fue ajustada diariamente bajando 1 % de supervivencia diaria y cada dos días bajando el porcentaje de biomasa que comenzó en 25 %.

### 3.3.9. Control de crecimiento de *Litopenaeus vannamei*

El control de crecimiento consistió en obtener una muestra significativa por cada tanque de cultivo de post-larvas de *L. vannamei* se pesó en una balanza grámera marca exbell 520 y luego se procedió a contar los individuos y luego se devolvieron a sus respectivos tanques y para obtener el peso promedio consistirá en dividir el peso entre en número de individuos pesados obteniendo tal como lo menciona (Socola 2016), además se calculó el pelegramo realizando una

operación de matemática básica que consistió en dividir la unidad entre el peso promedio obteniendo la cantidad de post-larvas equivalentes a un gramo de biomasa.

$$Wx = P/N^{\circ}$$

Donde:

Wx = peso promedio

P = Peso

N<sup>o</sup> = Número de individuos pesados



Figura 6. Balanza electrónica marca Kambor donde se realizó el peso de *L. vannamei*.

### 3.3.10. Control de supervivencia de *Litopenaeus vannamei*

Para el registro de la supervivencia se estimó por experiencia propia del 1 % de mortalidad diaria, sin embargo, la supervivencia real se dio cuando se realizó la cosecha mediante la fórmula de (Socola 2016).

$$S=(Nt/No) \times 100\%$$

Donde:

S = Supervivencia (%)



Nt = Población actual

No = Población inicial

### 3.3.11. Estado Sanitario de *Litopenaeus vannamei*

- **Preparación de Solución Salina al 2,5 %**

Para la solución salina se pesó 2,5 g de NaCl<sub>2</sub> y se disolvió en 100 ml de agua destilada, Luego de autoclavó a 121°C por 20 minutos.

- **Preparación del Medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS)**

Se pesó 5 g de medio TCBS y se disolvió en 10 ml agua destilada en un matraz. Se puso a calentar en un termo agitador (Microondas) hasta que hirvió (dos veces), posteriormente se dejó enfriar a una temperatura de 45 °C. y luego se vació en placas de Petri (aproximadamente 20 ml/placa de 90x10). Se esperó a que gelifique y se puso a secar en un horno a 30°C durante 24 horas.

- **Siembra en medio TCBS ajustado al 2,5 %.**

Se tomaron 30 post-larvas vivas pesaron de manera individual, luego se tomó una post-larva con una pinza y se colocó en una malla de 150 µl, se comenzó a lavar con ayuda de una jeringa estéril de 5 ml con agua destilada estéril, alcohol al 70 % y solución salina estéril al 2,5 %, Luego se trituró la muestra con la ayuda de un macerador de acero inoxidable, posteriormente se agregó 9 ml de solución salina a 2,5%, se homogenizó bien la muestra, manteniendo una relación de dilución de 1/10.

Se agregó 50 µl de la dilución de la muestra y se sembró en una placa con medió TCBS ajustado con 2,5% de

cloruro de sodio (NaCl<sub>2</sub>), la técnica de sembrado fue por agotamiento, luego se incubó a 30 °C durante 24 Horas y por último ya pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de colonias para establecer las Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g).

- **Observación en fresco de post-larvas de *L. Vannamei***

Para el análisis de patología en fresco de post-larvas fue una técnica que se basó básicamente en la observación con un microscopio, los tejidos o partes de camarones afectados, con el fin de establecer en la medida lo posible, un diagnóstico presuntivo. Las muestras se colocaron sobre una lámina porta objeto luego se vertió unas gotas de solución salina al 2,5 %, posteriormente se cubrió con una lámina cubre objeto y visualizadas con objetivo de 10X y 40X.

Luego se visualizó los túbulos hepatopancreáticos para ver la deformación de túbulos y se determinó el grado de severidad, causadas por microorganismos causantes de distintas enfermedades en el langostino, además se visualizan las branquias para poder detectar presencia de ectoparásitos, necrosis branquial y presencia de detritus y finalmente se visualizó el contenido intestinal para ver la presencia de endoparásitos como las gregarinas.

### **3.3.12. Registro de parámetros de calidad de agua**

Se registró la temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L) (06:00, 12:00, 18:00 y 00:00 horas), mientras que el nitrito, amonio, salinidad y pH una vez al día a las 08:00 horas.

### **3.4. Procesamiento para análisis de datos.**

En cuanto al procesamiento y análisis de datos se recolecto a través de la hoja electrónica de cálculo del Programa Excel de Microsoft Office y se determinó la diferencia entre los tratamientos con respecto al crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *L. vannamei*, además, se utilizó el análisis de varianza (ANVA) del diseño al azar de nivel de significancia ( $\alpha= 5\%$ ) (Calzada 1982).

También se utilizó el software estadístico SPSS. y se realizó a un nivel de confianza de 95 %.



## IV. RESULTADOS

### 4.1. Crecimiento de *Litopenaeus vannamei*

En la figura 7 se logra observar las líneas de tendencia relacionada con el crecimiento de los tratamientos control y con probiotico de que se utilizó en la alimentación para *L. vannamei*, indicando que el grupo que se nutrió con alimento balanceado más bacterias probióticas *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp* como suplemento para su alimentación y de la misma forma como método preventivo contra algún agente patógeno registra un mejor crecimiento a partir del día tres hasta finalizar los diecisiete días de cultivo que duro la etapa de precría.

En la tabla 2, se observa que el peso promedio inicial para el tratamiento control fue de  $0,004 \pm 0,16$  y finalizo con un peso promedio final de  $0,07 \pm 0,27$ , sin embargo, el tratamiento que se utilizó bacterias probióticas se inició con un peso promedio de  $,004 \pm 0,14$  y en diecisiete días obtuvo un peso promedio final de  $0,10 \pm 0,24$  con diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabla 2. Crecimiento y supervivencia de *L. vannamei*, tratamiento control y tratamiento utilizando bacterias probióticas en etapa de precría.

variables	Control		Probiótico	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Peso promedio (g)	$0,004 \pm 0,16$	$0,07 \pm 0,27$	$0,004 \pm 0,14$	$0,10 \pm 0,24$
Supervivencia (%)	$100 \pm 0,0$	$74 \pm 0,1$	$100 \pm 0,0$	$95 \pm 1,2$

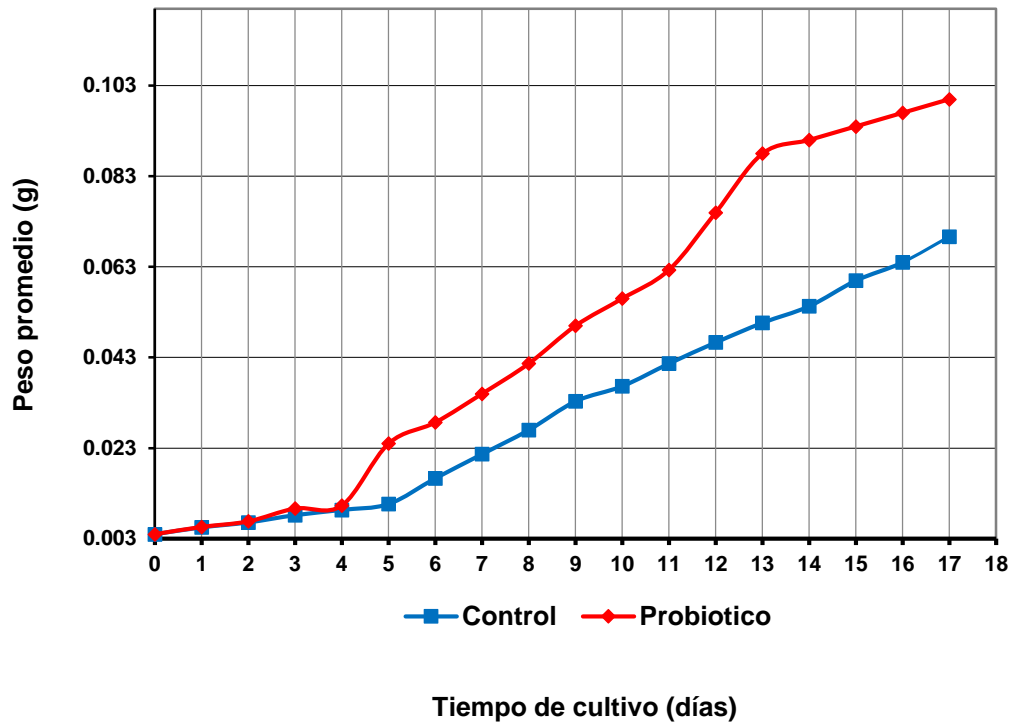


Figura 7. Crecimiento promedio de *L. vannamei* en etapa de precría utilizando probiótico como alimentación suplementaria.

#### 4.2. Tasa de alimentación para *Litopenaeus vannamei*

En la figura 8, se observa las líneas de tendencia relacionadas a la tasa de alimentación relacionada con el peso promedio de *L. vannamei* en etapa de precría, sin embargo, se logra apreciar que la tasa de alimentación comenzó con 25 % de biomasa y disminuyó 1 % de biomasa cada 2 días, esto se dio durante los primeros 8 días de cultivo, luego esta tasa disminuyó 1 % por día llegando a finalizar en el 13 % de biomasa.

Es necesario mencionar que en esta figura también se observa la diferencia en peso promedio de langostino, sin embargo, la tasa fue la misma para ambos tratamientos, lo que indica un mejor aprovechamiento por parte de *L. vannamei* del alimento balanceado con bacterias probióticas como alimentación suplementaria, a diferencia que el tratamiento control que tiene un crecimiento bajo, sin

embargo, se alimentó con la misma cantidad y porcentaje de biomasa con respecto a la tasa de alimentación.

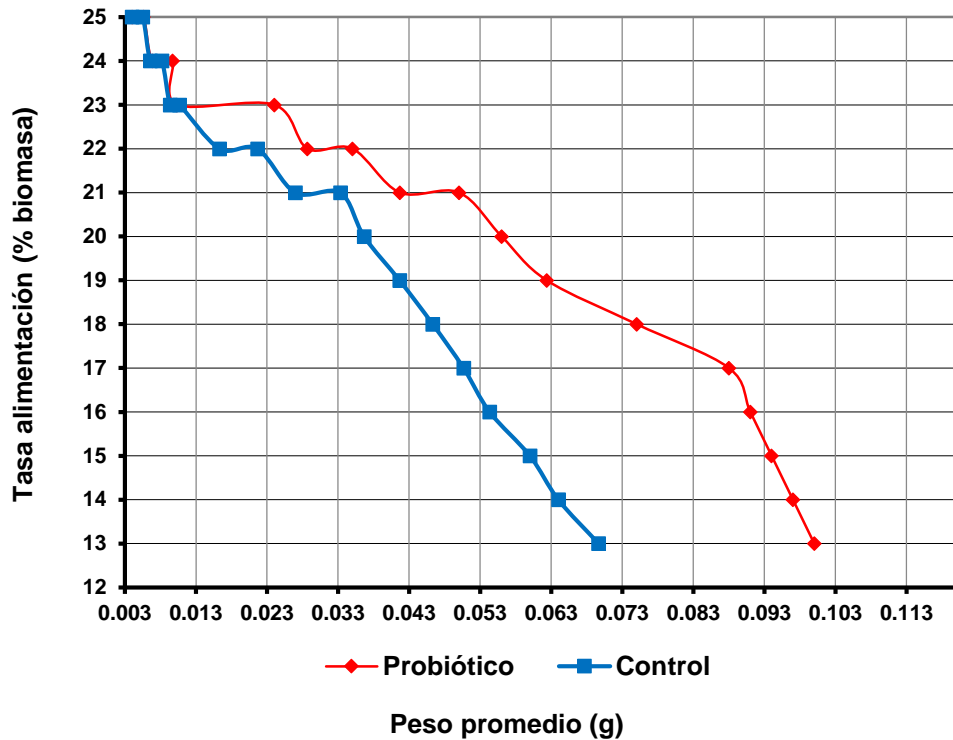


Figura 8. Tasa de alimentación (% de biomasa) diaria en relación al peso promedio de *L. vannamei* en etapa de precría.

#### 4.3. Supervivencia de *Litopenaeus vannamei*

La población inicial fue del 100 % equivalente a 6 000 post-larvas de *L. vannamei* por tanque de cultivo, sin embargo, al finalizar el experimento se logró una supervivencia para el tratamiento control del  $74 \pm 0,1$  %, mientras que el tratamiento que se nutrió con alimento balanceado más las bacterias probióticas como método preventivo de forma prebiótica logró una supervivencia del  $95 \pm 1,2$  % (tabla 2).

En la figura 9 también se visualiza las líneas de tendencia con respecto a la supervivencia de *L. vannamei*, con respecto a los tratamientos control y probiótico, logrando una mejor supervivencia para el tratamiento experimental que se utilizó bacterias probióticas con respecto al tratamiento control que es significativo ( $p < 0,05$ ).

Esta figura nos permite indicar que las bacterias probióticas influyeron como defensa ante agentes patógenos presentes en el agua que buscaron colonizar el tracto digestivo del langostino, debido a que las bacterias probióticas actúan como resistencia a las enfermedades tal como lo menciona (Kumar *et al.* 2016), debido a que activan el sistema inmune del camarón, puesto que estos microorganismos manipulan las comunidades microbianas en el agua, sedimento (Morales 2012).

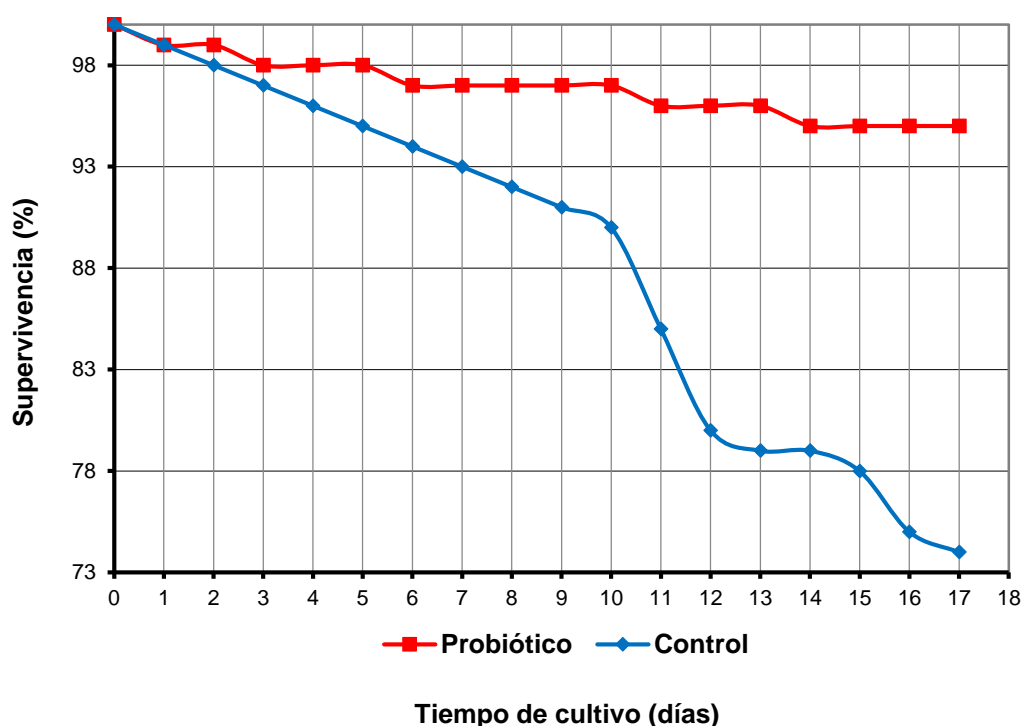


Figura 9. Supervivencia de *L. vannamei* en etapa de precría utilizando probiótico como alimentación suplementaria.

#### 4.4. Factor de Conversión Alimenticio (F.C.A.)

En el anexo 1 se logra apreciar el factor de conversión de alimentación en función a la biomasa existente de los tratamientos (control y probiótico) en relación el consumo de alimento acumulado en los tanques, donde se logra observar que se inició con un factor de alimentación de 0,25 para ambos tratamientos y se finalizó con un factor para el tratamiento control de 1,71, sin embargo, el tratamiento con bacterias probióticas fue de 1,25.

En la figura 10, se observa las líneas de tendencia bien señaladas entre los tratamientos, se logra apreciar que el tratamiento experimental que se utilizó las bacterias probióticas logro un mejor factor de conversión alimenticio, debido a que los probióticos actúan como alimento suplementario para el langostino, logrando un mejor crecimiento y reduciendo la tasa de alimentación diaria (Kumar *et al.* 2016).

En esta también señala que para el tratamiento control se relacionada que con 1,71 kg de alimento de logró obtener 1 kg de biomasa de langostino, sin embargo, para el tratamiento con bacterias probióticas con 1,25 kg de alimento balanceado se obtiene 1 kg de *L. vannamei*.

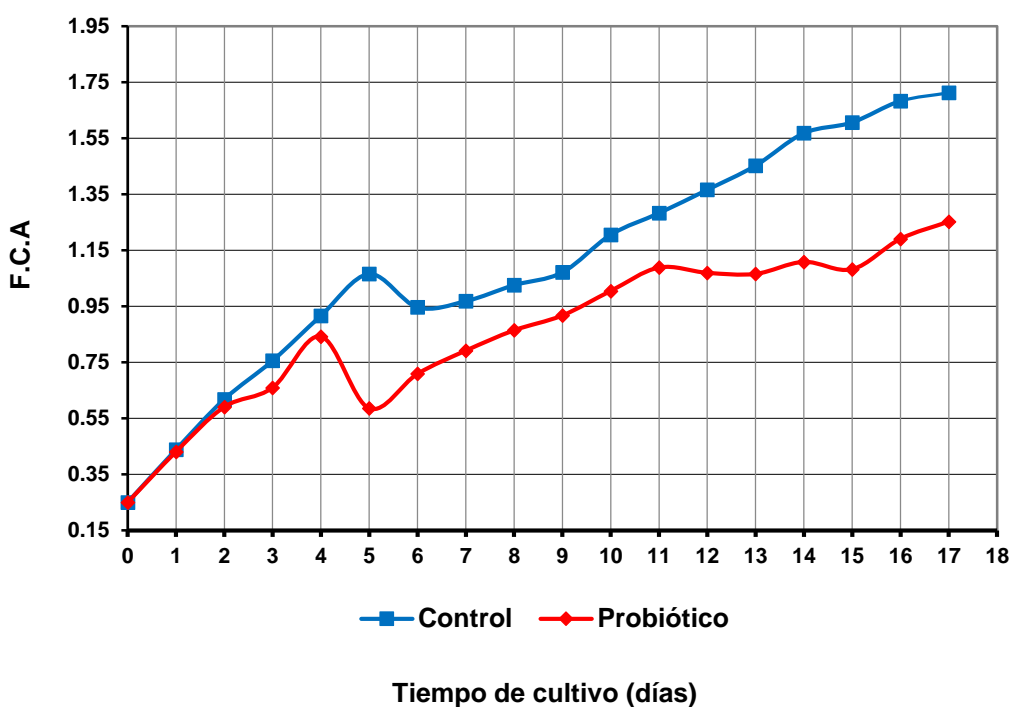


Figura 10. Factor de conversión alimenticio del *L. vannamei* con bacterias probióticas como alimento suplementario y con alimento propio del agua. g

#### 4.5. Estado sanitario de *L. vannamei*

En la tabla 3. Se logra observar el crecimiento de bacterias verdes en medio TCBS presentes en la post-larva de *L. vannamei*, para el

tratamiento control y el tratamiento con probiótico se inició sin la presencia de estas bacterias en *L. vannamei*, de acuerdo a lo reportado por el laboratorio certificado de análisis Novagestión, ubicado en Guayaquil -Ecuador, sin embargo, al finalizar el experimento se observa la presencia de bacterias verdes para tratamiento control de  $3,5 \times 10^3 \pm 0,14 \times 10^3$  UFC/g, para el tratamiento con probiótico no hubo presencia de estas bacterias.

En esta misma tabla también se observa la presencia de bacterias amarillas en las post-larvas de *L. vannamei* equivalente a  $32 \pm 0,4 \times 10^3$  UFC/g para ambos tratamientos de acuerdo al laboratorio de análisis Novagestión, sin embargo, al finalizar el trabajo de investigación de acuerdo al cultivo que se realizó en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa TCBS, el crecimiento de bacterias amarillas para el tratamiento control fue de  $132 \pm 0,14 \times 10^3$  UFC/g menor que el crecimiento de estas bacterias para el tratamiento con probiótico equivalente a  $500 \pm 10,1 \times 10^3$  UFC/g.

Tabla 3. Microbiología para bacterias verdes y amarillas de post-larvas de *L. vannamei*.

Días de Cultivo	Tratamiento control: $10^3$ (UFC/g)		Tratamiento con Probiótico: $10^3$ (UFC/g)	
	Verdes	Amarillas	Verdes	Amarillas
0	0	$32 \pm 0,4$	0	$32 \pm 0,4$
3	0	$41 \pm 4,1$	0	$45 \pm 2,6$
6	$0,4 \pm 0,10$	$56 \pm 2,8$	0	$70 \pm 5,1$
9	$1,3 \pm 0,32$	$64 \pm 3,6$	0	$115 \pm 12,2$
12	$1,4 \pm 0,50$	$78 \pm 1,3$	0	$170 \pm 7,9$
15	$2,0 \pm 0,24$	$93 \pm 0,9$	0	$200 \pm 18,4$
17	$3,5 \pm 0,14$	$132 \pm 0,2$	0	$500 \pm 10,1$

En la tabla 4 se observa los resultados del estado de salud de *L. vannamei*, para el tratamiento control fue: Túbulos deformes 0, Porcentaje de lípidos fue 85 %, sin presencia de gregarinas, ectoparásitos, necrosis ni detritos, sin embargo, finalizó 1/20 de túbulos

de grado 2, lípidos 75 %, gregarinas y necrosis fue de 0, ectoparásitos 1/20 y detritos 1/20.

También en esta tabla se observa que para el tratamiento con probiótico inicio con las variables de estado de salud de *L. vannamei* fue de no presencia de túbulos deformes, gregarinas, ectoparásitos, necrosis y detritos, sin embargo, la presencia de lípidos fue de 85 %, además es necesario mencionar que al finalizar el tratamiento se logró un porcentaje de lípidos equivalente a 89 %, y el valor para las variables en estudio mencionadas líneas arriba con respecto al estado de salud de langostino fue de grado 0.

Tabla 4. Observación en fresco de post-larvas de *L. vannamei*, en tratamiento control y con probiótico.

Variables	Control		Probiótico	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Túbulos deformes	0	1/20	0	0
Lípidos (%)	85	75	85	89
Gregarinas (G°/%)	0	0	0	0
Ectoparásitos	0	1/20	0	0
Necrosis (G°)	0	0	0	0
Detritos (G°)	0	1/20	0	0

#### 4.6. Registro de Parámetros físicos-químicos del agua.

Los parámetros promedio físicos-químicos registrados durante esta investigación fueron registrados para ambos tratamientos en el mismo horario que fue: 06:00, 12:00, 18:00 y 00.00 horas, sin embargo, la diferencia entre tratamientos en cuanto al oxígeno disuelto, temperatura, pH y salinidad no hubo demasiado rango de diferencia, sin embargo, en los parámetros como es el nitrito, amoníaco y porcentaje de saturación de oxígeno se observa que hay mayor diferencia tal como lo indica la tabla 5.

Tabla 5. Registro de los parámetros físico-químicos del agua de cultivo de *L. vannamei* en etapa de precría.

promedio de parámetros físico-químicos	Control	Probiótico
Oxígeno disuelto (mg/L)	5,76 ± 0,74	5,95 ±0,46
Saturación de oxígeno (%)	78,44 ±3,93	80,41 ±2,58
Temperatura (°C)	25,50± 0,16	25,58 ±0,24
Salinidad (mg/L)	33,63 ±0,44	33,52 ±0,39
Nitrito (mg/L)	0,49 ±0,38	0,24 ±0,12
Amoniaco (mg/L)	0,45 ±0,39	0,19± 0,10
pH	7,71 ±0,17	7,66± 0,16

#### 4.7. Enfoque ambiental del uso de probiótico en la acuicultura

Para el crecimiento bacteriano de bacterias verdes y amarillas se realizó en medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), con respecto al crecimiento de bacterias verdes se inició con  $0,10 \pm 0,00 \times 10^3$  U.F.C./mL, para ambos tratamientos, sin embargo, al finalizar el trabajo de investigación se encontró un crecimiento de  $2,84 \pm 0,07 \times 10^3$  U.F.C./mL mayor a las bacterias encontradas en el tratamiento que se utilizó probiótico como biorremediador que fue de  $0 \pm 0,00 \times 10^3$  U.F.C./mL. (Tabla 6).

En esta tabla también se puede observar el crecimiento de colonias amarillas presentes en el agua de cultivo de *L. vannamei* que empezó con  $1,8 \pm 0,00 \times 10^3$  UFC/mL, para ambos tratamientos, luego en la evaluación final se observó un crecimiento promedio para el control fue de  $6,4 \pm 0,55 \times 10^3$  UFC/mL, crecimiento menor al tratamiento con probiótico que fue de  $17,60 \pm 1,00 \times 10^3$  UFC/mL.



Tabla 6. Crecimiento de bacterias verdes y amarillas presentes en el agua de los tratamientos, sembradas en medio TCBS.

Días de Cultivo	Tratamiento control 10 <sup>3</sup> (UFC/mL)		Tratamiento con Probiótico 10 <sup>3</sup> (UFC/mL)	
	Verdes	Amarillas	Verdes	Amarillas
0	0,10±0,00	1,8±0,00	0,10±0,00	1,8±0,00
3	0,25±0,03	2,3±0,08	0,05±0,06	3,4±0,20
6	0,32±0,01	2,6±0,10	0±0,00	4,5±0,35
9	0,82±0,01	2,8±0,40	0±0,00	6,24±1,10
12	0,98±0,01	3,9±0,32	0±0,00	8,16±0,35
15	1,5±0,03	4,2±0,21	0±0,00	11,23±1,05
17	2,84±0,07	6,4±0,55	0±0,00	17,60±1,00

En la figura 11 se observa las líneas de tendencia relacionadas con el oxígeno disuelto de los tratamientos control y el biorremediador a base de bacterias probióticas, sin embargo, estas líneas están por encima del máximo límite permisible de acuerdo a los estándares de calidad del agua para recursos acuáticos que indica que debe estar por encima de 4 mg/L.

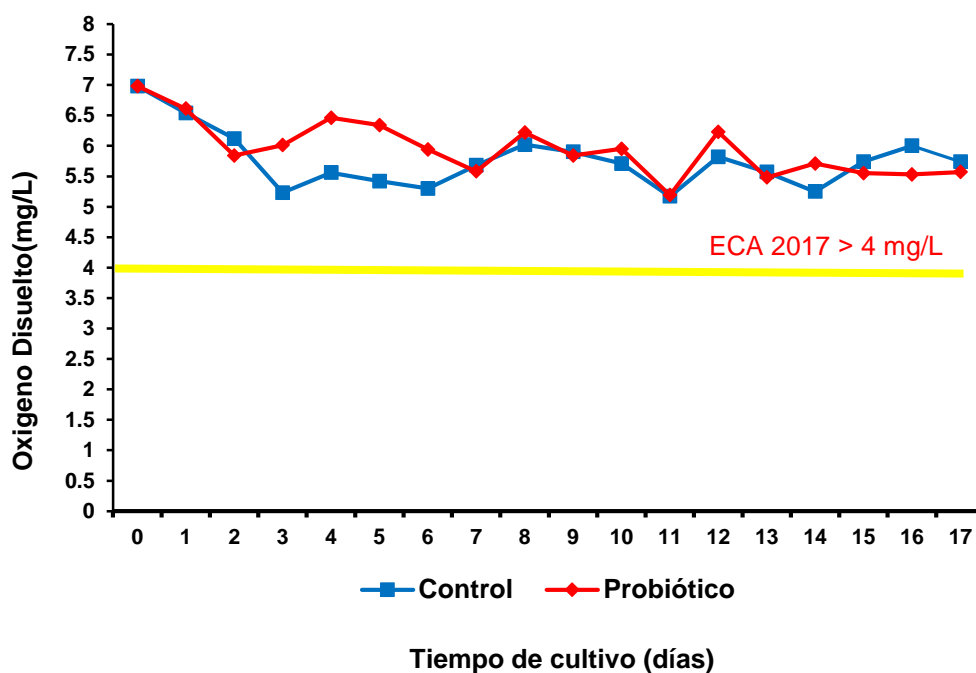


Figura 11. Nivel promedio del oxígeno disuelto del tratamiento control, tratamiento con probiótico y estándar de calidad ambiental.

En la figura 12 se observa la línea de tendencia de la variación de la temperatura para el tratamiento control, asimismo para el tratamiento que se trató con bacterias probióticas como biorremediador, sin embargo, están dentro de la línea base de acuerdo a lo que indica en ECA, que la variación de la temperatura no debe ser mayor a 2 °C, sin embargo la temperatura para ambos tratamientos iniciaron con 25,3 °C, sin embargo el tratamiento control termino con 25,65 °C, y el tratamiento ligeramente más arriba con 25,81 °C.

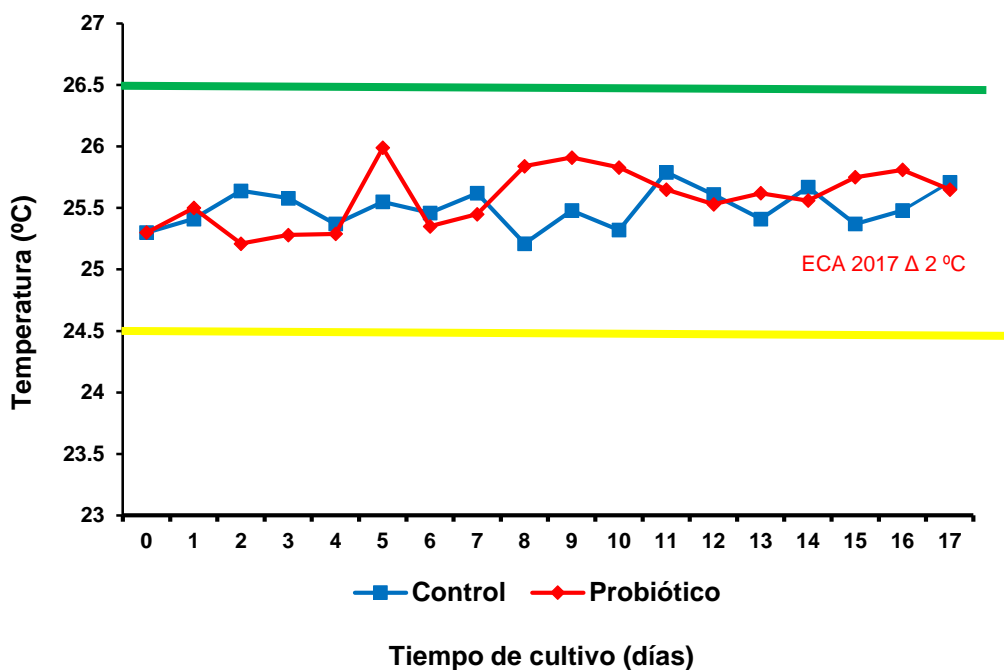


Figura 12. Nivel promedio de la temperatura en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.

En cuanto al pH, para el cultivo de post-larvas de *L. vannamei* durante el tiempo de cultivo y para la etapa de precría las líneas de tendencia para ambos tratamientos se encontraron dentro de los límites mínimos y máximos permisibles por el ECA que el rango está establecido entre 6,8 a 8,5 tal como se observa en la figura 13.

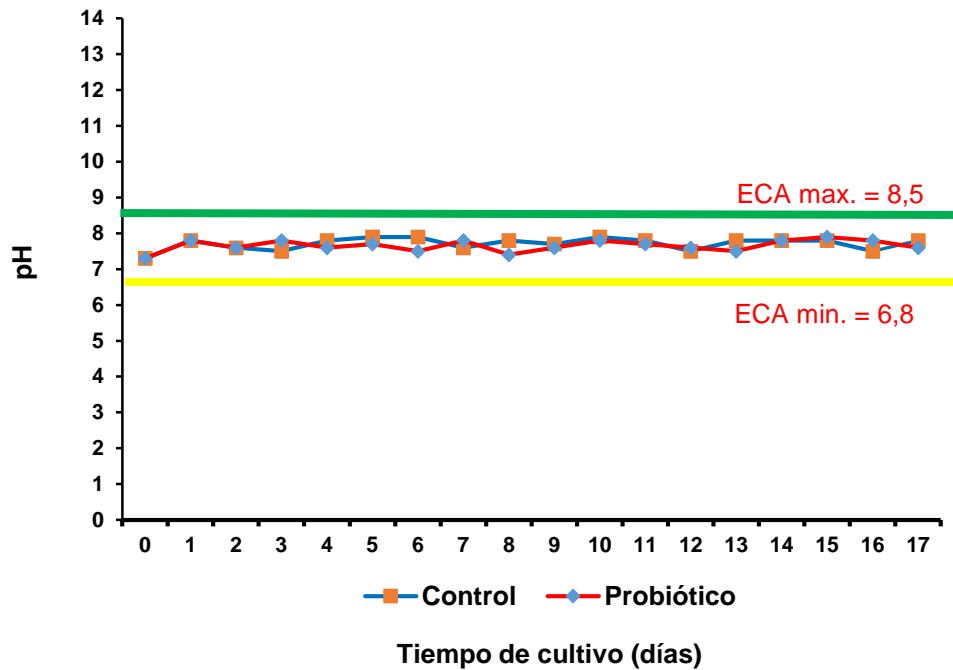


Figura 13. Nivel promedio del pH en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.

Para el nitrito, los niveles de concentración de este parámetro se mantuvieron por debajo del límite permitido por el estándar de calidad ambiental que es < 3 mg/L, durante toda la etapa de precría que duro el cultivo.

En la figura 14, se observa las líneas de tendencia de la variación del nitrito para el tratamiento control como para el tratamiento con bacterias probióticas utilizadas como biorremediador en el agua, además se observa que el tratamiento control su línea de tendencia se encuentra ligeramente por encima a partir del día cinco, terminando con resultados de para el control de 1,5 mg/L, por encima del tratamiento con probiótico que fue de 0,2 mg/L.

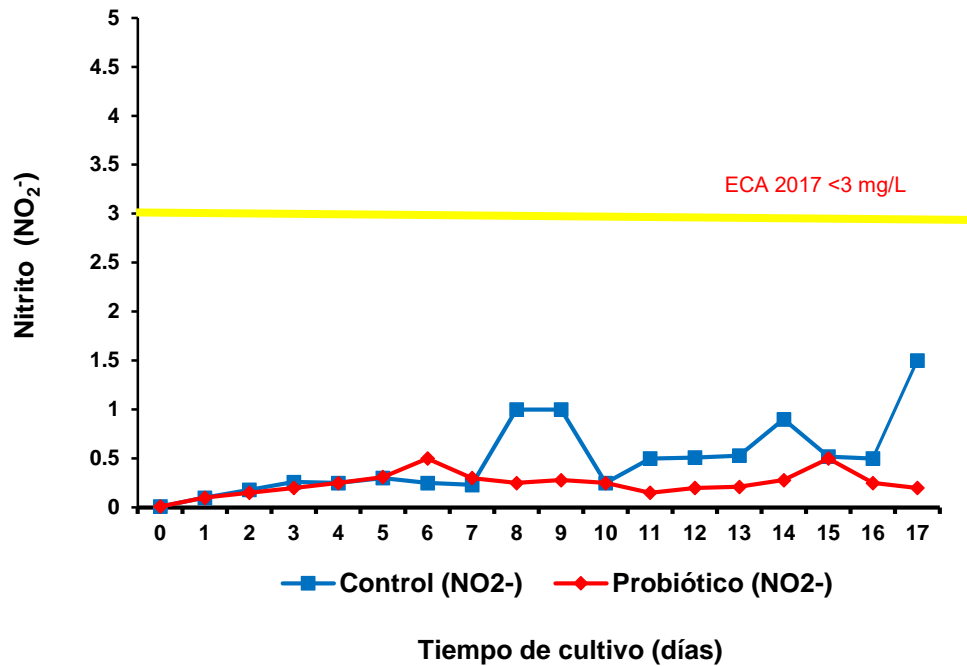


Figura 14. Nivel promedio del nitrito en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.

En la figura 15 se logra ver las líneas de tendencia tanto para el tratamiento control como para el tratamiento con bacterias probióticas en el agua como biorremediador, sin embargo, se logra ver notoriamente que el tratamiento control tuvo un incremento de amoníaco en el día diez que fue de 1 mg/L, y al finalizar el cultivo de *L. vannamei* fue de 1,5 mg/L.

En esta misma figura también se aprecia que la línea de tendencia con el tratamiento con bacterias probióticas, la cantidad de amoníaco fue mucho menor al control y finalizó con 0,25 mg/L.

Además, es necesario mencionar que para ambos tratamientos el nivel del amoníaco en el cultivo de *L. vannamei* en etapa de precría se mantuvo por debajo de los límites permitidos por el estándar de calidad ambiental para.

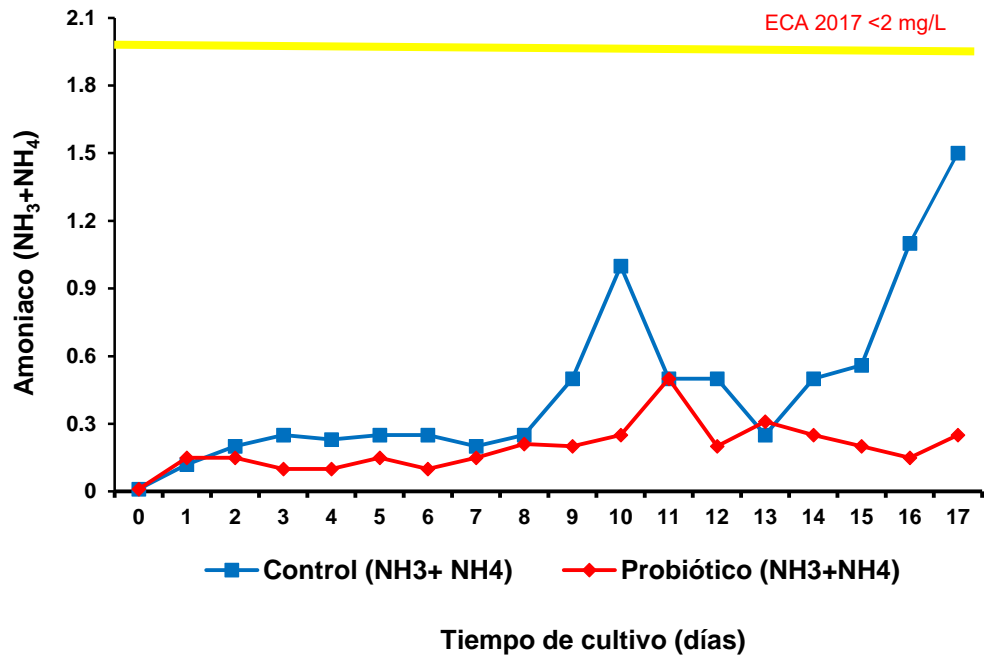


Figura 15. Nivel promedio del amoniaco en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador y estándar de calidad ambiental.

En la figura 16 se observa un diagrama de barras relacionando el amoniaco en función al pH, se aprecia el crecimiento de barras para ambos tratamientos, tanto como para el control, como para el tratamiento con bacterias probióticas utilizadas como biorremediador en el agua.

En esta figura se observa que el pH, en el agua para la etapa de precría de *L. vannamei* fue desde 7,3 hasta 7,9 iones de hidrógeno, es decir durante todo el tiempo del cultivo se mantuvo de forma básica con iones de hidróxido, sin embargo, el crecimiento del amoniaco para el tratamiento control a partir del día tres se mantuvo por encima del tratamiento con biorremediador, terminando con un pH de 7,6 y amoniaco de 1,5 mg/L y 0,25 mg/L.

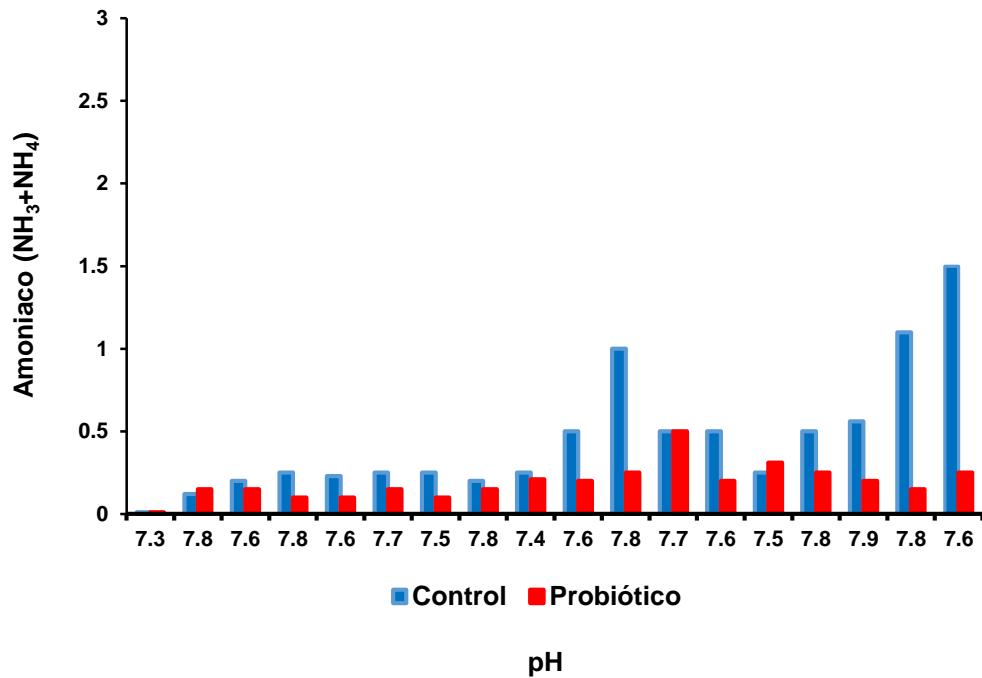


Figura 16. Nivel del amoniacos relacionado con el pH en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.

En la figura 17 se observa el crecimiento de barras para ambos tratamientos en relación con el pH del agua tanto como para el tratamiento control, como para el tratamiento con biorremediador a base de bacterias probióticas.

En esta figura también se deja ver que el pH en el agua para la etapa de precría de *L. vannamei* fue desde 7,3 hasta 7,9 iones de hidrógeno durante todo el tiempo del cultivo se conservó de forma básica, sin embargo, el nitrato para el tratamiento control al finalizar el trabajo de investigación fue de 1,5 mg/L y para el tratamiento con biorremediador fue de 0,20 mg/L.

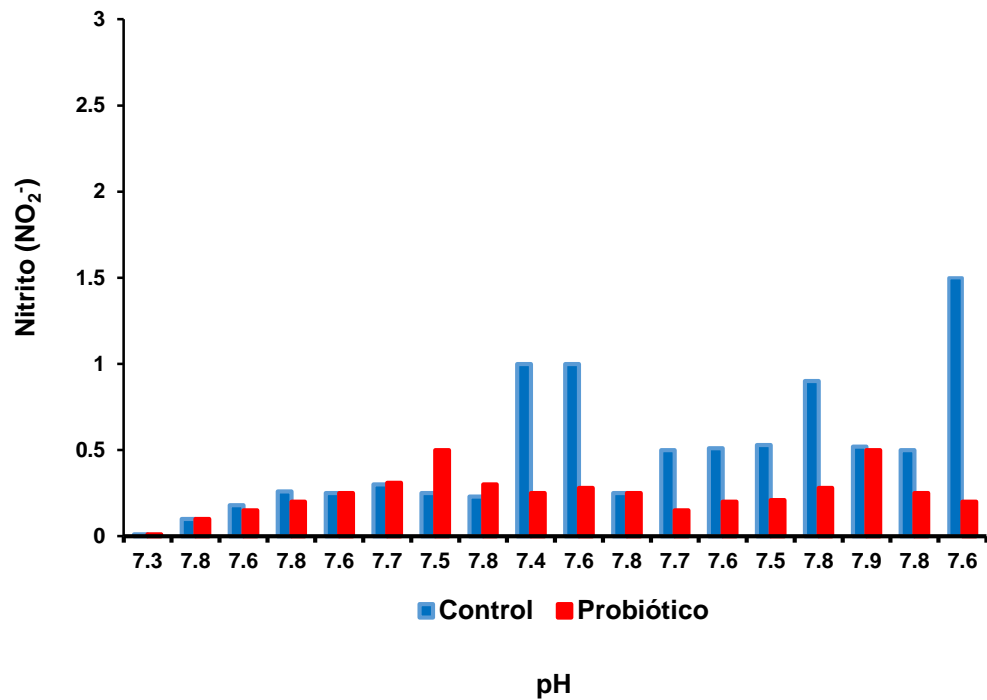


Figura 17. Nivel del nitrito relacionado con el pH en el agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.

En la figura 18 tenemos la relación existente entre la temperatura, amoníaco y pH del agua, y se observa que el tratamiento control en forma parcial el amoníaco estuvo por encima del límite máximo permitido por el estándar de calidad ambiental para que haya vida en el medio marino en cultivo que señala que debe de ser <0,5 mg/L, además termino siendo agua de baja calidad con sustancia toxicas que fue de 1,5 mg/L de amoníaco presente en el cultivo control.

Con respeto a diagrama de barras de esta misma figura se observa que utilizando probiótico como biorremediador del agua se logró controlar el amoníaco y se mantuvo por debajo del límite máximo permisible establecido por el estándar de calidad ambiental para que haya vida en el medio marino, además al finalizar el trabajo de investigación la cantidad de amoníaco presente en el agua fue de 0,25 mg/L.

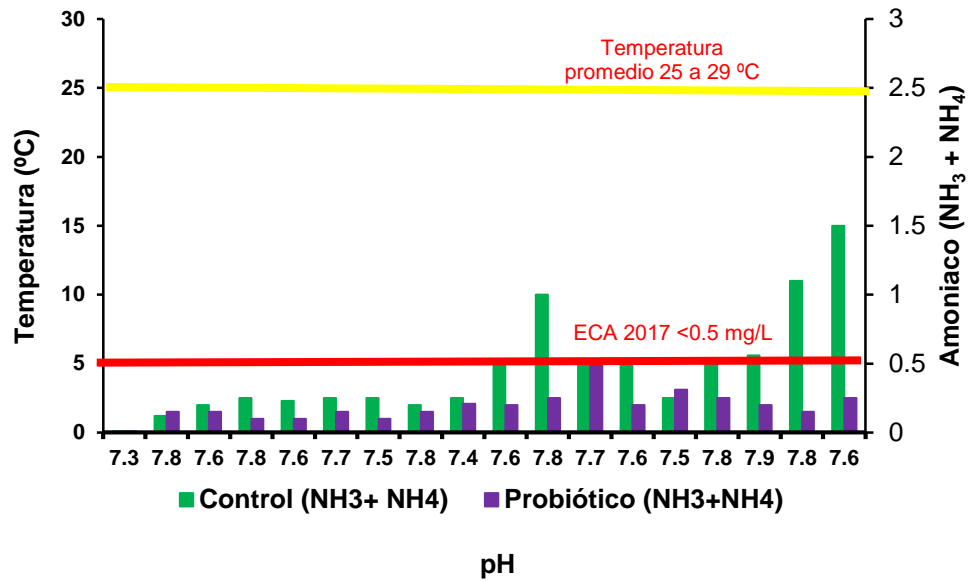


Figura 18. Nivel del amoniaco relacionado con el pH y la temperatura del agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.

En la figura 19 se observa la presencia del nitrito presente en el agua de cultivo de *L. vannamei* para los tratamientos control y con probiótico, en función a la temperatura y pH, el máximo nivel para el control fue de 1,5 mg/L y para el tratamiento con probiótico fue de 0,5 mg/L, con temperatura de 25 a 29 °C.

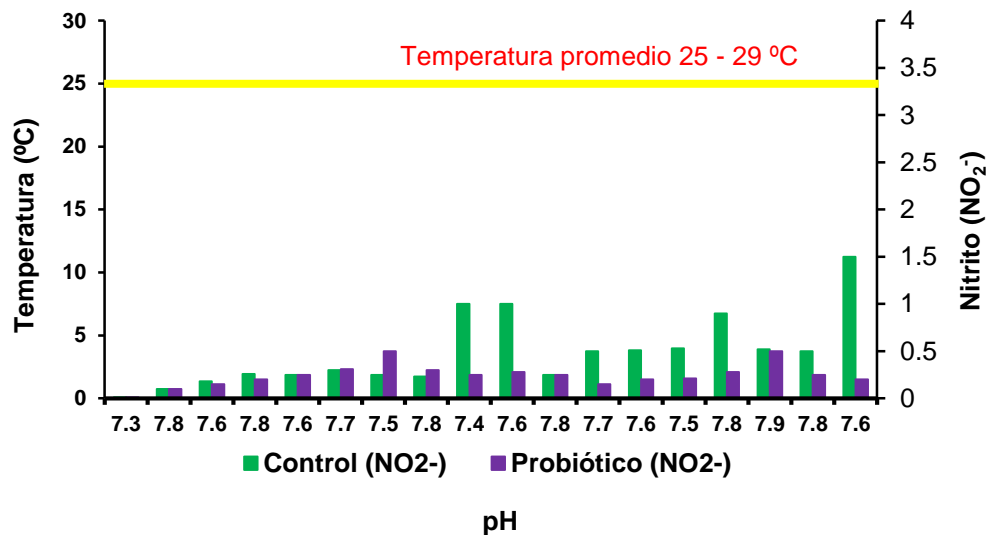


Figura 19. Nivel del nitrito relacionado con el pH y la temperatura del agua, tratamiento control, tratamiento utilizando bacterias probióticas como biorremediador.



## V. DISCUSIÓN

Esta investigación de utilizar bacterias probióticas como prebiótico y biorremediador para mejorar el crecimiento, supervivencia y el estado sanitario de post-larvas de *L. vannamei*, además de mejorar la calidad de agua del cultivo y prevenir la contaminación del medio ambiente producto de las descargas de agua con elevada carga de efluentes a los diferentes canales de marea, de la misma forma García (2015), menciona que el crecimiento anual de la población es del 8 %, esto conlleva a cultivar a mayores escalas de cultivo realizando los sistemas intensivos exponiendo a mayor densidad que conllevando a tener problemas de enfermedad y avería ambiental, dando como resultados pérdidas económicas y para combatir estos problemas comenzó a utilizar probiótico.

Históricamente el control de enfermedades siempre se dio utilizando antimicrobianos Cabello *et al.* (2013); sin embargo, esta práctica es criticada debido a que impacta en los residuos sólidos al ambiente y desarrolla la resistencia de los agentes patógenos (Kumar *et al.* 2016; Liu *et al.* 2014).

Con respecto a la etapa de precría, se utilizó para tener una mejor eficiencia de la población de langostino cuando se realiza el desdoble a los estanques de engorde, además para tener un mejor control del alimento balanceado, debido a que en un espacio más reducido el alimento suministrado se distribuye y es aprovechado por todos los langostinos a diferencia de cuando se siembra de forma directa a los estanques de engorde que el alimento balanceado no se distribuye por todo el estanque y en su mayoría no es aprovechado por los langostinos, además socola (2016) indica que el cultivo en sistemas de precría sirve para mejorar el crecimiento compensatorio, alimentación natural, práctica común en Perú y Ecuador.

Esto es corroborado con Saldarriaga (1995), quien indica que los sistemas de precría permiten calcular con mayor eficiencia la población existente, además (Ching 2014; Vanoni 2014; Arias 2010) indican que estos sistemas

ayudan a la reducción de los días de cultivo, mejor aprovechamiento del alimento suministrado, supervivencia y resistencia a enfermedades.

En cuanto al probiótico hasta el momento no se han reportado muchos trabajos que mencionen el accionar de las bacterias probióticas en nauplios y larvas de camarón, tal como lo expresan (Villamil y Martínez 2009).

El probiótico comercial que se utilizó a base de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas sp* y *Nitrobacter sp*, se utilizó 6 g/kg de alimento balanceado como prebiótico para colonizar el tracto digestivo y fortalecer el sistema inmune de *L. vannamei* y hacerlo resistente contra las enfermedades, también se utilizó como biorremediador para mejorar la calidad de agua, además Morales (2012) menciona que los probióticos es un alimento suplementario para los animales, estimulan el sistema inmune debido a que manipulan las comunidades microbianas en el agua y sedimento, además mejoran el crecimiento y supervivencia, por otro lado Partida (2009), menciona que las bacterias, protozoarios, virus y hongos limitan el crecimiento de *L. vannamei* y la alternativa viable para el control de estas enfermedades es utilizando microorganismos benéficos llamados probióticos.

El crecimiento de *L. vannamei* en etapa de precría, se sembró con un peso promedio de 0,004 g, es decir con pelegramo 250 postl/g, al finalizar el trabajo de investigación para el tratamiento control fue de 0,07 g con pelegramo de 14,49 potl/g, sin embargo, para el tratamiento control fue de 0,1 g con pelegramo equivalente a 9,8 postl/g respectivamente con diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), datos corroborados por (Dalmin *et al.* 2001) quien utilizo probiótico a base de *Bacillus spp.* En cultivo de *L. vannamei* encontrando mejor crecimiento, del mismo modo (Sánchez-Ortiz *et al.* 2015), estudiaron probióticos a base de (*Enterococcus casseliflavus*, *Citrobacter koseri*, *Bacillus subtilis subtilis* y *Staphylococcus sp*), presentando un mejor crecimiento en langostino, de la misma forma Camacho (2012) y Partida (2009), utilizaron probióticos y mejoraron el crecimiento del langostino.

Con respecto a la tasa de alimentación diaria se comenzó con el 25 % de su biomasa de *L. vannamei* y se comenzó a bajar 2 % por día de biomasa durante los primeros 12 días, después de bajo el 1 % por día, finalizando con el 13 % de su biomasa para ambos tratamientos y su alimentación fue distribuida en 12 frecuencias, estos datos son corroborados con Socola (2016), quien en su trabajo de investigación de cultivo de post-larvas de *L. vannamei* en sistema de precría comenzó con una biomasa del 25 % y disminuyó a razón de 1 % por día y distribuyó el alimento en 12 frecuencia por día.

Para la supervivencia se logró en el tratamiento control el 74 %, mientras que para el tratamiento con probiótico se logró el 95 %, sin duda alguna se logró mejores resultados con el tratamiento experimental durante la etapa de precría de post-larvas de *L. vannamei* con diferencia significativa ( $p < 0,05$ ), de la misma forma Camacho (2012), utilizó bacterias probióticas comerciales en las dietas de camarón y encontró mejores tasas de supervivencia, asimismo Sánchez-Ortiz *et al.* (2015), estudio bacterias probióticas como (*Enterococcus casseliflavus*, *Citrobacter koseri*, *Bacillus subtilis subtilis* y *Staphylococcus sp*), reportaron mejores tasas de crecimiento en cultivo de *L. vannamei*, debido a que la supervivencia se relaciona con el estado de salud del animal, de esta forma se demuestra la importancia de los microorganismos con potencial probióticos en el sistema inmunológico de *L. vannamei*.

El estado sanitario de *L. vannamei*, se evaluó el crecimiento de bacterias verdes y amarillas presentes en las post-larvas de langostino, se inició libres de bacterias verdes para ambos tratamientos y al finalizar la investigación se obtuvo un crecimiento de  $3,5 \pm 0,14 \times 10^3$  UFC/g para el tratamiento control, sin embargo, para el tratamiento con probiótico como método preventivo no se encontró presencia de estas bacterias verdes, además para el crecimiento de bacterias amarillas se inició con el  $32 \times 10^3$  UFC/g y se finalizó con  $132 \pm 0,2 \times 10^3$  UFC/g para el tratamiento control y con el probiótico se reportó  $500 \pm 10,1 \times 10^3$  UFC/g, estos datos son significativos entre tratamientos ( $p < 0,05$ ), además Dalmin *et al.* (2001), señalan que los probióticos aumenta

el estado de salud de los camarones estrés y brotes de enfermedades, por su parte Chandran *et al.* (2014), utilizaron probiótico a concentraciones de (0,1-0,4 %/100 g de alimento balanceado), demostrando que los camarones tratados con probiótico lograron estimular la inmunidad de la especie.

En la observación en fresco de las post-larvas *L. vannamei*, se inició con el 85 % de lípidos, y libre de gragarinas, ectoparásitos, detritos, necrosis y libres de túbulos deformes para ambos tratamientos, sin embargo al finalizar la investigación se reportó el 75 % de lípidos, presencia de ectoparásitos, detritos y deformidad de grado dos de túbulos, sin embargo en el tratamiento con probiótico se logró el 89 % de lípidos, y no se encontró presencia de deformidad de túbulos y libre del resto de parámetros biológicos que se evaluaron, asimismo Camacho (2012), menciona que los probióticos aumenta la resistencia a enfermedades, mejora el estado nutricional de los camarones y estos microorganismos son amigables con el medio ambiente.

Balcazar *et al.* (2007), menciona que los probióticos son utilizados como control biológico, en la prevención contra agentes patógenos, de la misma forma Espinoza (2017), utilizó bacterias probióticas (*Lactobacilos*, *Bifidobacterias*, *Streptococos*, *Levaduras*, *Microalgas*, *Pseudomonas*), suministrando a las dietas del alimento balanceado, directo al medio y al interior del organismo de *L. vannamei*.

Los niveles de oxígeno disuelto en el agua de cultivo de post-larvas de *L. vannamei*, fluctuaron entre 5,17 mg/L a 6,98 mg/L, para el tratamiento control, asimismo para el tratamiento con probiótico utilizado como biorremediador fluctuó entre 5,19 mg/L a 6,98 mg/L, este parámetro se encontraron dentro de los niveles reportados por Saldarriaga (2013), quien indica que la calidad de agua de los ecosistemas naturales que son sumideros de efluentes del cultivo intensivo de *L. vannamei* en la región Tumbes fue de 4,42 mg/L a 6,93 mg/L, este mismo autor también señala que el oxígeno disuelto en los efluentes en la región Tumbes en sistemas intensivos es de 0,00 mg/L, sin embargo, estos resultados están dentro del límite mínimo permuto >4 mg/L para que haya vida acuática en un medio

marino y estuarios tal como lo menciona el estándar de calidad ambiental (MINAM 2017).

Del mismo modo, el oxígeno disuelto es un parámetro que va de la mano con el pH del agua. Los niveles obtenidos fluctuaron para ambos tratamientos entre 7,3 a 7,9 mostrando las características de buena calidad de agua de cultivo para organismos acuáticos indicada por Saldarriaga (2013), quien reporto que la calidad del agua en los ecosistemas acuáticos en Tumbes el pH fue de 6,93 a 7,63, además se encuentran dentro del rango permitido en aguas marinas y estuarios para que haya vida de acuerdo al estándar de calidad ambiental (MINAM 2017).

Con respecto a la Temperatura fluctuó entre 25,3 °C a 25,79 °C para el tratamiento control y para el tratamiento con probiótico llego hasta 25,91 °C, estos datos muestran una buena calidad de agua para este parámetro debido a que en los ecosistemas naturales en Tumbes la temperatura fluctúa de 25,20 °C a 26,70 °C Saldarriaga (2013), de la misma forma se manifiesta que la temperatura en aguas marinas no debe fluctuar más de  $\Delta 2$  °C (MINAM 2017).

La salinidad promedio del agua de cultivo de post-larvas de *L. vannamei*, fue de  $33,63 \pm 0,44$  mg/L, para el tratamiento control y para el tratamiento con probiótico fue de  $33,52 \pm 0,39$  mg/L. Entre tratamientos no influyó significativamente en los procesos de descontaminación del efluente, dado que el periodo de experimentación fue relativamente de 17 días y con bajo volumen de agua y no hubo evaporación significativa del agua y se mantuvo constante. Se considera que este nivel de salinidad favoreció a la sedimentación del material particulado, porque según Ramos (2010) citado por Saldarriaga (2013) señalan que la tasa de sedimentación es mayor en agua salada que en agua dulce, debido a una fuerte asociación iónica de las sales disueltas (arcilla, ácido húmico, coloide, entre otros compuestos), lo que acelera la precipitación, al contrario, en agua dulce, habrá un rechazo de las cargas negativas, manteniendo las partículas en suspensión.

Estos resultados de amoníaco para el tratamiento control fluctuó entre 0,00 mg/L hasta 1,5 mg/L, sin embargo, con el tratamiento con probiótico fluctuó entre 0,00 mg/L a 0,5 mg/L, esta diferencia al finalizar el trabajo de investigación fue debido a que las bacterias probióticas ayudan a reducir los niveles de gases de amoníaco Tabbu *et al.* (2000), además el tratamiento con probiótico se mantuvo por debajo del límite máximo permitido en el estándar de calidad ambiental que el agua de cultivo para aguas marinas es < 0,5 mg/L cuando se encuentra en temperaturas entre 25 °C a 29 °C, sin embargo, el tratamiento control se encontró registros por encima del límite permitido (MINAM 2017).

Con respecto a la presencia de nitrito se comenzó con 0,01 mg/L para ambos tratamientos, sin embargo, al finalizar el experimento se encontró que para el tratamiento control llegó hasta 1,5 mg/L y el tratamiento probiótico llegó hasta 0,31 mg/L, esta diferencia es porque los probióticos ayudan a disminuir los gases de nitrito por la presencia de microorganismos Tabbu *et al.* (2000), asimismo Saldarriaga (2013), encontró en su investigación que los niveles de nitrito en los ecosistemas naturales en Tumbes fueron entre 0,03 mg/L a 0,28 mg/L, sin embargo los estándares de calidad ambiental no menciona este parámetro (MINAM 2017).

Asimismo el crecimiento de bacterias verdes y amarillas para ambos tratamientos fue de  $0,10 \pm 0,00 \times 10^3$  UFC/mL y  $1,8 \pm 0,00 \times 10^3$  UFC/mL, y al finalizar el cultivo fue de  $2,84 \pm 0,07 \times 10^3$  UFC/mL y  $6,4 \pm 0,55 \times 10^3$  UFC/mL, sin embargo, para el tratamiento con probiótico no se reportó crecimiento de bacterias verdes y se encontró  $17,60 \pm 1,00 \times 10^3$  UFC/mL, de bacterias amarillas, esta diferencia de crecimiento de bacterias verdes es debido a la presencia de los microorganismos que colonizaron el medio y no permitieron que estas colonias crezcan, asimismo para las colonias amarillas crecieron de forma exponencial debido a que los probióticos ayudaron a que colonicen el medio de cultivo para *L. vannamei*, asimismo Orellana y Ayala (2017), reportó que el agua en los estanques de cultivo de camarón encontró 100 UFC/mL, para colonias amarillas y 200 UFC/mL, para colonias verdes.

Los sumideros de los efluentes de las industrias langostineras son los ecosistemas acuáticos naturales en Tumbes, presentaron concentraciones de oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, pH y nitrito, para ambos tratamientos dentro de los límites mínimos y máximos permitidos por el estándar de calidad ambiental, sin embargo, para el amoniaco el tratamiento control estuvo por encima de lo permitido y el tratamiento con probiótico como biorremediador estuvo dentro de rango, debido a que los microorganismos ayudaron a disminuir los gases de amoniaco.

El producto de las actividades antrópicas llega como efluente a los ecosistemas naturales de Tumbes, es necesario mencionar que aún son capaces de reducir la contaminación generada en estos ambientes, además la mayoría de los parámetros evaluados se encontraron dentro de los niveles requeridos para la vida acuática de acuerdo el estándar de calidad ambiental.

## VI. CONCLUSIONES

1. El crecimiento de *L. vannamei* en etapa de precría, para el tratamiento control que se alimentó con alimento balanceado logro un incremento de peso de 0,065 g en diecisiete días, es decir se sembró con un peso promedio de 0,0040 g y al final la investigación obtuvo un peso promedio de 0,07 g.
2. Para el tratamiento con probiótico comercial, se utilizó adherido al alimento balanceado con una dosis de 6 g/kg de alimento de alimento y se inició con un peso promedio de 0,0040 g y se finalizó con 0,1 g, logrando un incremento de 0,099 g en diecisiete días de cultivo logrando una diferencia significativa entre ambos tratamientos ( $p < 0,05$ ).
3. La tasa de alimentación fue la misma para ambos tratamientos, que se comenzó con el 25 % de su biomasa y finalizó con el 13 % de su biomasa, sin embargo, se logró mejor crecimiento en peso promedio de *L. vannamei* con el tratamiento con probiótico.
4. La supervivencia de las post-larvas de *L. vannamei* en etapa de precría fue para el tratamiento control de 74 % y para el tratamiento con probiótico fue del 95 % logrando una diferencia significativa entre tratamiento ( $p < 0,05$ ).
5. El factor de conversión alimenticio fue para el tratamiento control de 1,71 y para el tratamiento con bacterias probióticas de 1,25 logrando una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).
6. El estado sanitario de post-larvas de *L. vannamei* se dio con crecimiento de bacterias verdes y amarillas, encontrando para esta investigación el tratamiento control se inició sin presencia de bacterias verdes y con  $32 \pm 0,4 \times 10^3$  UFC/g, de bacterias amarillas y al finalizar se encontró un crecimiento para bacterias verdes de  $3,5 \pm 0,14 \times 10^3$  UFC/g y  $132 \pm 0,14 \times 10^3$  UFC/g de bacterias amarillas.



7. Para el tratamiento con probiótico como método preventivo no se encontró crecimiento de bacterias verdes, sin embargo, para bacterias amarillas se inició con  $32 \pm 0,4 \times 10^3$  UFC/g y al finalizar la investigación se obtuvo un crecimiento de  $500 \pm 10,1 \times 10^3$  UFC/g de bacterias amarillas.
8. En la observación en fresco de las post-larvas de *L. vannamei*, en estado de precría se inició con el 85 % de lípidos y sin presencia de gregarinas, ectoparásitos, necrosis, detritos y deformación de túbulos, sin embargo, al finalizar el cultivo se reportó que para el tratamiento control un 75 % de lípidos y presencia de 1/20 de túbulos deformes ,ectoparásitos y detritos, y para el tratamiento con probiótico se obtuvo el 89 % de lípidos y no se reportó presencia de gregarinas, ectoparásitos, necrosis, detritos y deformidad de túbulos.
9. Los parámetros promedios físicos-químicos durante el experimento control fueron para:

El oxígeno disuelto:  $5,76 \pm 0,74$  mg/L, Saturación de oxígeno  $78,44 \pm 3,93$  %, Temperatura:  $25,50 \pm 0,16$  °C, Salinidad:  $33,63 \pm 0,44$  mg/L, nitrito:  $0,49 \pm 0,38$  mg/L, amoniac:  $0,45 \pm 0,39$  mg/L y pH:  $7,71 \pm 0,17$ , y para el tratamiento con probiótico fue para oxígeno disuelto:  $5,95 \pm 0,46$  mg/L, Saturación de oxígeno  $80,41 \pm 2,58$  %, Temperatura:  $25,58 \pm 0,24$  °C, Salinidad:  $33,52 \pm 0,39$  mg/L, nitrito:  $0,24 \pm 0,12$  mg/L, amoniac:  $0,19 \pm 0,10$  mg/L y pH:  $7,66 \pm 0,16$ .

10. Los parámetros físicos, químicos y biológicos del agua de cultivo de cultivo en el sistema precría de *L. vannamei* fueron:

Con respecto a las bacterias verdes:  $2,84 \pm 0,07 \times 10^3$  UFC/g; bacterias amarillas:  $6,4 \pm 0,55 \times 10^3$  UFC/mL, el oxígeno disuelto fluctuó entre 5,17 mg/L a 6,98 mg/L, pH fluctuó entre 7,3 a 7,9, la temperatura: 25,3 °C a 25,79 °C, la salinidad fue de:  $33,63 \pm 0,44$  mg/L, amoniac: 0,00 mg/L a 1,5 mg/L y para nitrito fue de 0,01 mg/L a 1,5 mg/L, solo el amoniac estuvo fuera del rango permitido por el estándar de calidad ambiental, es

necesario mencionar que el nitrito no está considerado dentro de los parámetros dentro de los ECAs.

11. Los parámetros físicos, químicos y biológicos del agua de cultivo de cultivo en el sistema precría de *L. vannamei* con probiótico como biorremediador del agua fueron:

Con respecto a las bacterias verdes:  $0,00 \pm 0,00 \times 10^3$  UFC/g; bacterias amarillas:  $17,60 \pm 1,00 \times 10^3$  UFC/mL, el oxígeno disuelto fluctuó entre 5,17 mg/L a 6,98 mg/L, pH fluctuó entre 7,3 a 7,9, la temperatura: 25,3 °C a 25,99 °C, la salinidad fue de:  $33,52 \pm 0,39$  mg/L., amoníaco: 0,00 mg/L a 0,5 mg/L y para nitrito fue de 0,01 mg/L a 0,31 mg/L, todos los parámetros se encontraron dentro de los rangos permitidos por el estándar de calidad ambiental, es necesario mencionar que el nitrito no se encuentra dentro de los parámetros es los ECAs.

## VII. RECOMENDACIONES.

1. Realizar estudios de crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *L. vannamei* con cepas de bacterias probióticas, en etapa de precría y engorde.
2. Caracterizar e identificar bacterias probióticas del tracto digestivo de *L. vannamei*, y otros crustáceos, para obtener cepas probióticas.
3. Estudiar el efecto de los probióticos como biorremediador del agua en los estanques de engorde de *L. vannamei* con fines de combatir los agentes patógenos presentes y disminuir de los efluentes antes de que sean descargados a los canales de marea.
4. Utilizar bacterias probióticas con diferentes densidades de siembra de post-larvas de *L. vannamei* en etapa de precría.
5. Realizar estudios de investigación sobre el efecto de la aplicación de bacterias probióticas en larvicultura de *L. vannamei*.
6. Estudiar e identificar bacterias probióticas que puedan ayudar a la degradación de materia orgánica presente en los estanques de cultivo de *L. vannamei*.
7. Realizar un sistema de tratamiento de efluentes a base de bacterias probióticas.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, G., M. Lara., J. Sánchez., A. Campa, y A. Luna. 2012. *The use of probiotics in aquatic organisms: A review*. African Journal of Microbiology Research, 6(23), 48454857. DOI:10.5897/AJMR11.1038
- Arias, S. 2010. Experiencias de manejo de raceways en cultivo de camarón marino *Litopenaeus vannamei* en Ecuador. Boletín Nicovita, 1-6.
- Balcazar, J., L. Rojas, P. Cunningham. 2007. Effect of the addition of four potential strain on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahemolyticus*. J Invertebr Pathol 96, 147-150.
- Berger, C. 2004. *Aportes de la biotecnología en la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones*". Avances en Nutrición Acuícola, V. Mem, Simp. Internac. de Nutrición Acuícola, nov. 1999. Asociación Langostina peruana (ALPE). 102-110. [https://www.uanl.mx/utillerias/nutricion\\_acuicola/V/archivosberger.pdf](https://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/V/archivosberger.pdf)
- Cabello, F., H. Gotfrey., A. Tomova., L. Ivanova., H. Dolz., A Millanao y A. Buschmann. 2013. Reexamen del uso de antimicrobianos en la acuicultura: su relevancia para la resistencia a los antimicrobianos y para la salud humana y animal. Instituto de farmacia. Facultad de ciencias. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile.
- Camacho, M. 2012. Efecto de la aplicación de prebióticos en las dietas para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, mediante indicadores de crecimiento y respuesta inmune. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias Naturales, Instituto Tecnológico de Sonora. México.
- Calzada, J. 1982. Capítulo V. *Diseño completamente randomizado*. En Métodos estadísticos para la investigación, 10-125 y 156-178. Lima: Jurídica S.A. 3ra ed.

- Chandran, M., P. Ivapparaj, S. Moovendhan, R. Ramasubburayam, S. Prakash, G. Immanuel and A. Palavesam. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. Fish shellfish immunol. 36(1):38-4.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24516873>
- Ching, C. 2014. Manejo de raceways y/o pre-crías en el cultivo del camarón marino. (Presentation en Power Point). Nicovita-VITAPRO. Tumbes, Perú.
- Cuéllar-Ánjel, Jorge, Cornelio Lara, Vielka Morales, Abelardo De Gracia y Oscar García. 2010. Glosario. En Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*, 124-125. Panamá: Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano (OSPESCA) y Sistema de la Integración Centroamericana (SICA) Accedido el 10 de junio de 2011.<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/ManualBuenasPracticasCamaronCultivo2010.pdf>
- Dalmin, G., K. Kathiresan and A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian. Journal. Exp. Biol. 39: 939\_942. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/24034>.
- Decamp, O., D. Moriarty y P. Lavens. 2006. Desempeño y seguridad de probióticos de acuicultura. Industria acuícola. 2(6):42
- Espinoza, I. 2017. Uso y aplicación de probióticos en el cultivo de camarón y sus mecanismos en acción. Universidad Técnica de Machala, Machala. Ecuador.
- Fuller R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Cambridge, Great Britain: Chapman and Hall. 398p.

- Gisbert, M. Castillo, A. Skalli, K. Andree and L. Badiola. 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *J. Anim. Sci.* 91 (6): 2766-78.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508031>.
- Gomez\_Gil, B., A. Roque and J. Turnbull. 2000. Probiotic the use and selection of culture. Of larval. Aquatic organisms. *Acuicultura* ,191: 259-270.
- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmune estimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias, Especialidad Acuicultura Marina, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Hidalgo, A. 2007. Impacto ambiental de la actividad langostinera, extractiva y agrícola sobre el ecosistema de manglar en el litoral de la región Tumbes. Tesis para optar el Grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Universidad Nacional de Trujillo, Escuela de Postgrado, Programa Doctoral de Ciencias Ambientales.
- Liu, H., Li, Z., Tan, B., Lao, Y., Duan, Z., Sun, W., & Dong, X. 2014. Isolation of aputative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specificimmunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 300307. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464814003131>.
- López, E., G. Aguirre & M. Vázquez (2013). Probióticos, una herramienta en la producción pecuaria y acuícola. *Scientia Agropecuaria*, 4(2), 129137. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=35763705006>
- Kumar, V., Roy, S., Kumar, D., & Kumar, U. 2016. *Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and*

*Methods of Administration*. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 24(4), 342-368. DOI: 10.1080/23308249.2016.1193841

Massaut, Laurence, Wilfrido Arguello y Jorge Córdova. 2005. *Producción intensiva y medio ambiente. Alternativas para mejorar la calidad de los efluentes*. Revista de resúmenes VIII Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 83.

Melgar, C., C. Álvarez., C. Tovilla & A. Sánchez. 2012. Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. *Revista biológica tropical*, 61(3), 12151228. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003477442013000400018](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003477442013000400018).

Morales, Y. 2012. Evaluación del crecimiento y del contenido de hemocitos circulantes totales en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuestos a dietas experimentales con diferentes niveles de proteína y probióticos. Universidad autónoma de baja California sur.

Naranjo, J y M. Salvador. 2016. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y sobrevivencia de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*, perez-farfante y kensley, 1997. Trabajo de titulación especial para optar el grado de Magíster en manejo de biorrecursos y medio ambiente, Facultad de Ciencias Naturales, Guayaquil. Ecuador.

Orellana y Ayala. 2017. incidencias de paracitos y bacterias del género *Vibrio* en el cultivo de camarón marino desarrollados en camaroneras del municipio de Jiquillisco. Escuela especializada en ingeniería ITCA-FEP ADE, revista tecnológica, Jillisco, Usulután - El Salvador. <http://201.131.110.78/jspui/bitstream/10972/3020/1/Articulo4.pdf>

- Partida, B. 2009. Efecto de prebióticos y microorganismos con potencial probiótico en el crecimiento, supervivencia y sistema inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, cultivado en condiciones experimentales. Tesis para optar el título de maestro en recursos naturales y medio ambiente. Instituto politécnico Nacional, Sinaloa. México.
- Priyadarshini, P., Deivasigamani, B., Rajasekar, T., Edward, G., Kumaran, S., Sakthivel, M., & Balamurugan S. 2013. *Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today*, 5(1), 55-59.
- Ramos, Roberto, Luis Vinatea, Julia Santos y Rejane Da Costa. 2010. Tratamiento de efluentes del cultivo de *Litopenaeus vannamei* mediante procesos de sedimentación, filtración y absorción. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38(2): 188-200.
- Sagarpa. 2011. Comunicado De Prese “Impulsaran la pesca y la acuicultura en sonora” °N 106/11. México, 5 de marzo del 2011 <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2011/marzo/documentos2011B106.pdf>.
- Saldarriaga, D. 2013. Tratamiento del cultivo semi-intensivo del cultivo de *penaeus vannamei* por sedimentación y biofiltración. Tesis para optar el grado de doctor en ciencias ambientales. Universidad Nacional de Tumbes. Puerto Pizarro, Tumbes, Perú.
- Saldarriaga, D. 1995. Acondicionamiento y manejo de estanques de langostino. Departamento Académico de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Pesquera. Universidad Nacional de Tumbes. Tumbes – Perú. Pág. 46.
- Sánchez-Ortiz, A., Luna-González, A., Campa-Córdova, A., Escamilla-Montes, R., Flores-Miranda, M., & Mazón-Suástegui, J. (2015). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustules ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Latin*



American Journal of Aquatic Research, 43(1), 123-136. DOI: 10.3856/vol43-issue1-fulltext-11.

Socola, M. 2016. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia de post-larvas de *Litopenaeus vannamei* en raceways camaronera la Bocana S.A. Tesis para optar el grado de maestro en Acuicultura. Universidad Técnica de Machala, Machala. Ecuador.

Tabbu, M.; R. Gacutan, y R. Dal. 2000. Los efectos de probiótico sobre químicos seleccionados y parámetros de crecimiento en aguas de estanque de *Penaeus monodon*. Boletín Nicovita, Vol. 5. Ejemplar 11. Tumbes.

Tresierra, A. (2000). *Metodología de la investigación científica*. Trujillo, Perú:Editorial Biociencia, Primera Edición.

Vanoni, F. (2014). *Alternativas de sistemas de primeras fases en acuicultura 2014*. (Presentation en Power Point). Epicore Bio Networks Inc. Latin America Technical Sales Manager. [http://fenacam.com.br/pdf/fenacam2014/carcinicultura/16-cultivo-do-camarao-l.-vannamei-em-raceways-com-utilizacao-de-probioticos\\_-fabrizzio-vanoni.pdf](http://fenacam.com.br/pdf/fenacam2014/carcinicultura/16-cultivo-do-camarao-l.-vannamei-em-raceways-com-utilizacao-de-probioticos_-fabrizzio-vanoni.pdf).

Villamil, L. y M, Martínez. (2009). Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. Invemar, Boletín Vol. 38 (2). Santa Marta. Colombia.165- 187.

Yan, W. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 269: 259261. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848607004700>

## **ANEXOS**

Anexo 1. Crecimiento, supervivencia, biomasa, alimento acumulado y factor de conversión en etapa de precría de *L. vannamei*

Tiempo de cultivo (Días)	TRATAMIENTO CONTROL					TRATAMIENTO CON PROBIÓTICO				
	Peso promedio (g)	Supervivencia (%)	Biomasa. (g)	Alimento (g)	F.C.A.	Peso promedio (g)	Supervivencia (%)	Biomasa (g)	Alimento (g)	F.C.A.
0	0.0040	100	24	6.0	0.25	0.0040	100	24	6.00	0.25
1	0.0055	98	32	14.2	0.44	0.0056	99	33	14.32	0.43
2	0.0066	96	38	23.5	0.62	0.0068	99	41	23.96	0.59
3	0.0082	94	46	34.9	0.76	0.0097	98	57	37.46	0.66
4	0.0094	92	52	47.3	0.92	0.0103	98	61	51.15	0.84
5	0.0107	90	58	61.3	1.06	0.024	98	141	82.62	0.59
6	0.0163	88	86	81.6	0.95	0.029	97	167	118.18	0.71
7	0.0217	86	112	108.2	0.97	0.035	97	204	161.15	0.79
8	0.0270	84	136	139.5	1.03	0.042	97	243	209.45	0.86
9	0.0333	83	166	177.7	1.07	0.050	97	291	266.78	0.92
10	0.0367	82	180	217.3	1.20	0.056	97	326	327.26	1.00
11	0.0417	81	203	259.6	1.28	0.062	96	359	390.50	1.09
12	0.0463	80	222	303.6	1.37	0.075	96	432	461.78	1.07
13	0.0507	79	240	348.6	1.45	0.088	96	507	539.88	1.07
15	0.0543	77	251	393.4	1.57	0.091	95	519	621.06	1.11
16	0.0600	76	274	439.3	1.61	0.094	95	536	709.03	1.08
17	0.0640	75	288	484.5	1.68	0.097	95	553	791.35	1.19
18	0.0697	74	309	529.6	1.71	0.103	95	587	870.34	1.25

Anexo 2. Peso promedio de post-larvas de *L. vannamei* en etapa de precría.

Tiempo de Cultivo (Días)	Tratamiento control	Tratamiento experimental
	Peso Promedio (g)	Peso Promedio (g)
0	0,0040	0,0040
1	0,0055	0,0056
2	0,0066	0,0068
3	0,0082	0,0097
4	0,0094	0,0103
5	0,0107	0,024
6	0,0163	0,029
7	0,0217	0,035
8	0,0270	0,042
9	0,0333	0,050
10	0,0367	0,056
11	0,0417	0,062
12	0,0463	0,075
13	0,0507	0,088
15	0,0543	0,091
16	0,06	0,094
17	0,06	0,097
18	0,07	0,10

Anexo 3. Supervivencia de post-larvas de *L. vannamei* en etapa de precría.

Tiempo de cultivo (Días)	Tratamiento control		tratamiento experimental	
	Supervivencia (%)		Supervivencia (%)	
0	100		100	
1	99		99	
2	98		99	
3	97		98	
4	96		98	
5	95		98	
6	94		97	
7	93		97	
8	92		97	
9	91		97	
10	90		97	
11	85		96	
12	80		96	
13	79		96	
15	79		95	
16	78		95	
17	75		95	
18	74		95	

Anexo 4. Observación en fresco de post-larvas de *L. vannamei*, en diferentes días del cultivo.

Parámetros de patología en fresco	Días de cultivo													
	0		3		6		9		13		15		17	
	EC	EE	EC	EE	EC	EE	EC	EE	EC	EE	EC	EE	EC	EE
Túbulos deformes	0	0	0	0	0	0	0	0	1/40	2/60	0	1/20	0	
Lípidos (%)	85	85	85	87	84	87	83	88	83	88	80	89	75	89
Gregarinas (G°/%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ectoparásitos	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
Necrosis (G°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Detritos (G°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Anexo 5. Registro del oxígeno disuelto (mg/L) y la desviación estándar diaria del agua en etapa de precría de *L. vannamei*

Días de cultivo	Oxígeno Disuelto (mg/L)	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	6,98±0,16	6,98±0,21
1	6,54±0,34	6,61±0,28
2	6,12±0,23	5,84±0,24
3	5,23±0,41	6,01±0,25
4	5,56±0,48	6,46±0,28
5	5,42±0,22	6,34±0,27
6	5,30±0,32	5,94±0,31
7	5,68±0,24	5,58±0,25
8	6,02±0,35	6,22±0,21
9	5,90±0,23	5,84±0,24
10	5,71±0,35	5,95±0,26
11	5,17±0,41	5,19±0,26
12	5,82±0,31	6,23±0,15
13	5,57±0,55	5,48±0,28
14	5,25±0,36	5,71±0,32
15	5,74±0,32	5,55±0,35
16	6,00±0,30	5,53±0,32
17	5,74±0,43	5,57±0,25

Anexo 6. Registro de la Temperatura (°C) y la desviación estándar diaria del agua en etapa de precría de *L. vannamei*

Días de cultivo	Temperatura (°C)	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	25,3±0,18	25,3±0,18
1	25,1±0,25	25,5±0,20
2	25,64±0,33	25,21±0,23
3	25,58±0,28	25,28±0,30
4	25,37±0,32	25,29±0,26
5	25,55±0,30	25,99±0,14
6	25,46±0,28	25,35±0,23
7	25,62±0,34	25,45±0,28
8	25,21±0,38	25,84±0,19
9	25,48±0,19	25,91±0,36
10	25,32±0,27	25,83±0,29
11	25,79±0,34	25,65±0,28
12	25,61±0,34	25,53±0,24
13	25,41±0,25	25,62±0,32
14	25,67±0,33	25,56±0,24
15	25,37±0,26	25,75±0,32
16	25,48±0,24	25,81±0,30
17	25,71±0,38	25,65±0,23

Anexo 7. Registro del pH y la desviación estándar diaria del agua en etapa de precría de *L. vannamei*

Días de cultivo	pH	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	7,3	7,3
1	7,8	7,8
2	7,6	7,6
3	7,5	7,8
4	7,8	7,6
5	7,9	7,7
6	7,9	7,5
7	7,6	7,8
8	7,8	7,4
9	7,7	7,6
10	7,9	7,8
11	7,8	7,7
12	7,5	7,6
13	7,8	7,5
14	7,8	7,8
15	7,8	7,9
16	7,5	7,8
17	7,8	7,6



Anexo 8. Registro diario del nitrito NO<sub>2</sub><sup>-</sup> presente en el agua de cultivo de *L. vannamei* en etapa de precría

Días de cultivo	Nitrito NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	0,01	0,01
1	0,10	0,10
2	0,18	0,15
3	0,26	0,20
4	0,25	0,25
5	0,3	0,31
6	0,25	0,50
7	0,23	0,30
8	1,00	0,25
9	1,00	0,28
10	0,25	0,25
11	0,50	0,15
12	0,51	0,20
13	0,53	0,21
14	0,90	0,28
15	0,52	0,50
16	0,50	0,25
17	1,50	0,20

Anexo 9. Registro diario de amoniaco ( $\text{NH}_2+\text{NH}_4^+$ ) presente en el agua de cultivo de *L. vannamei* en etapa de precría

Días de cultivo	Amoniaco $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (mg/L)	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	0,01	0,01
1	0,12	0,15
2	0,20	0,15
3	0,25	0,10
4	0,23	0,10
5	0,25	0,15
6	0,25	0,10
7	0,20	0,15
8	0,25	0,21
9	0,50	0,20
10	1,00	0,25
11	0,50	0,50
12	0,50	0,20
13	0,25	0,31
14	0,50	0,25
15	0,56	0,20
16	1,10	0,15
17	1,50	0,25

Anexo 10. Registro diario de la salinidad (mg/L) en etapa de precría de *L. vannamei*

Días de cultivo	Salinidad (mg/L)	
	Tratamiento control	tratamiento con probiótico
0	32.8	32.8
1	32.85	32.82
2	33.24	33.1
3	33.42	33.56
4	33.46	33.57
5	33.48	33.41
6	33.8	33.24
7	34.1	33.36
8	33	33.3
9	33.5	33.38
10	33.74	33.53
11	34.3	33.78
12	33.87	34.1
13	34.12	33.6
14	34.05	33.87
15	33.86	33.82
16	33.75	34.2
17	33.98	33.85

## 1. Análisis estadístico en el software spss.23.

### 1.1. Peso y supervivencia.

**Estadísticas de muestra única**

	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Peso	6	0,08550	0,020216	0,008253
Supervivencia	6	84,33333	11,360751	4,638007

**Prueba de muestra única**

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
Peso	10,360	5	0,000	0,085500	0,06428	0,10672
Supervivencia	18,183	5	0,000	84,333333	72,41096	96,25571

### 1.2. Crecimiento de bacterias verdes y amarillas en el agua

**Estadísticas de muestra única**

	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
B. verdes	6	1750,00000	1918,071949	783,049594
B. amarillas	6	313833,33333	198879,276614	81192,124687

**Prueba de muestra única**

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
B. verdes	2,235	5	0,076	1750,000000	-262,89306	3762,89306
B. amarilla	3,865	5	0,012	313833,333333	105122,33242	522544,33425

**1.3. Crecimiento de bacterias verdes y amarillas en la larva de *L. vannamei***

**Estadísticas de muestra única**

	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
B. verdes	6	1750,00000	1918,071949	783,049594
B. amarillas	6	12016,66667	6158,706574	2514,281430

**Prueba de muestra única**

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
B. verdes	2,235	5	,076	1750,000000	-262,89306	3762,89306
B. amarillas	4,779	5	,005	12016,666667	5553,50049	18479,83284

**1.4. Factor de conversión alimenticio**

**Estadísticas de muestra única**

	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
FCA	6	1,4783	0,25530	0,10422

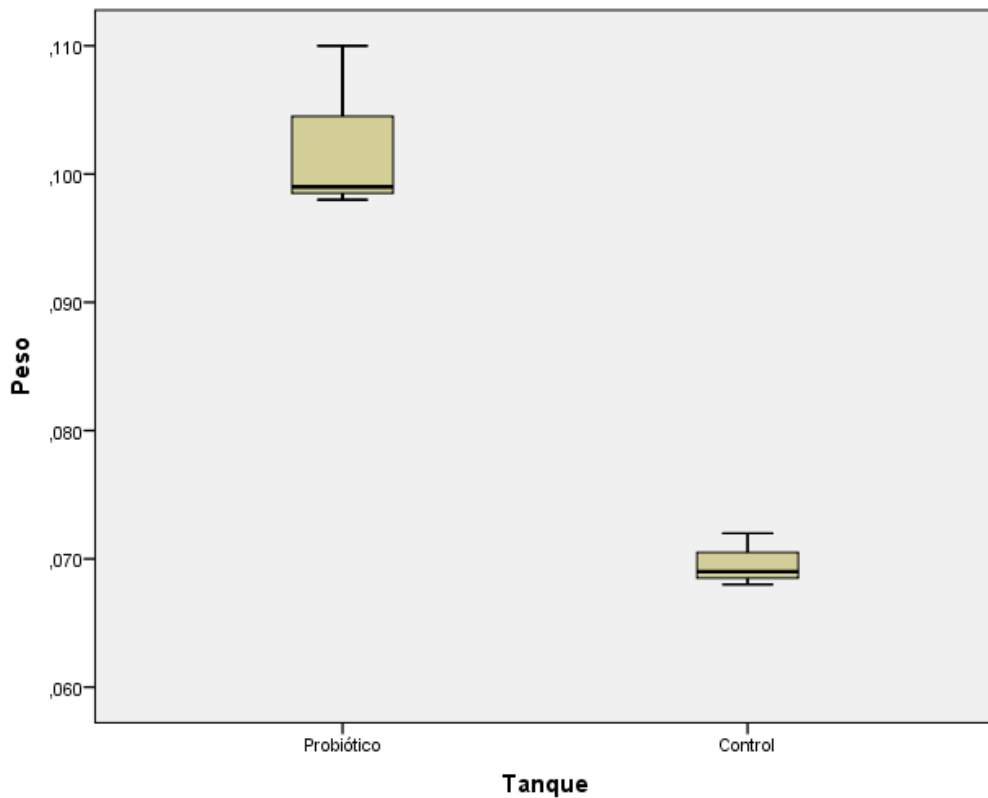
**Prueba de muestra única**

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
FCA	14,184	5	0,000	1,47833	1,2104	1,7463

**1.5. Diagrama estadístico del peso de *L. vannamei*.**

**Resumen de procesamiento de casos**

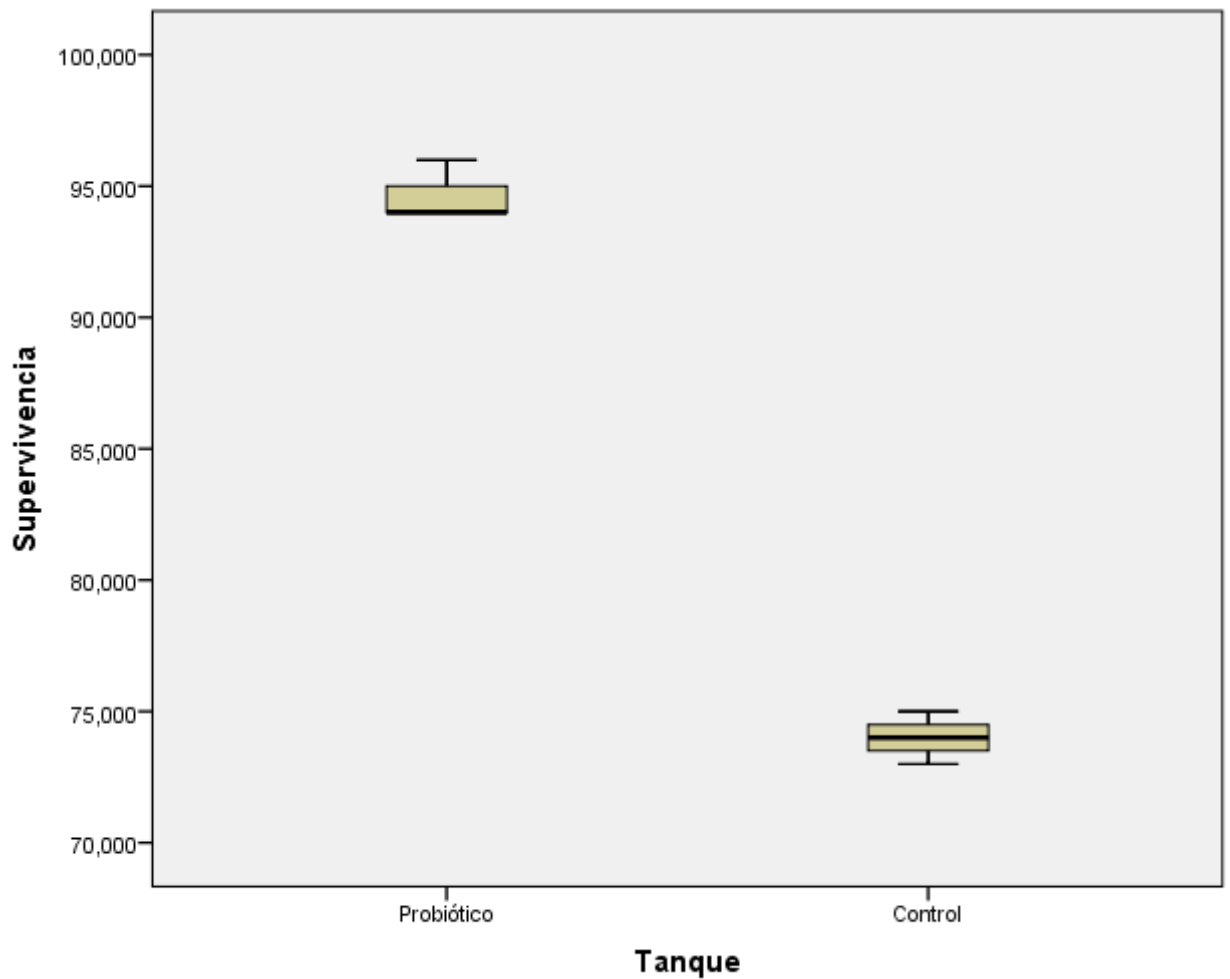
		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Peso	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



1.6. Diagrama estadístico de la supervivencia de *L. vannamei*.

Resumen de procesamiento de casos

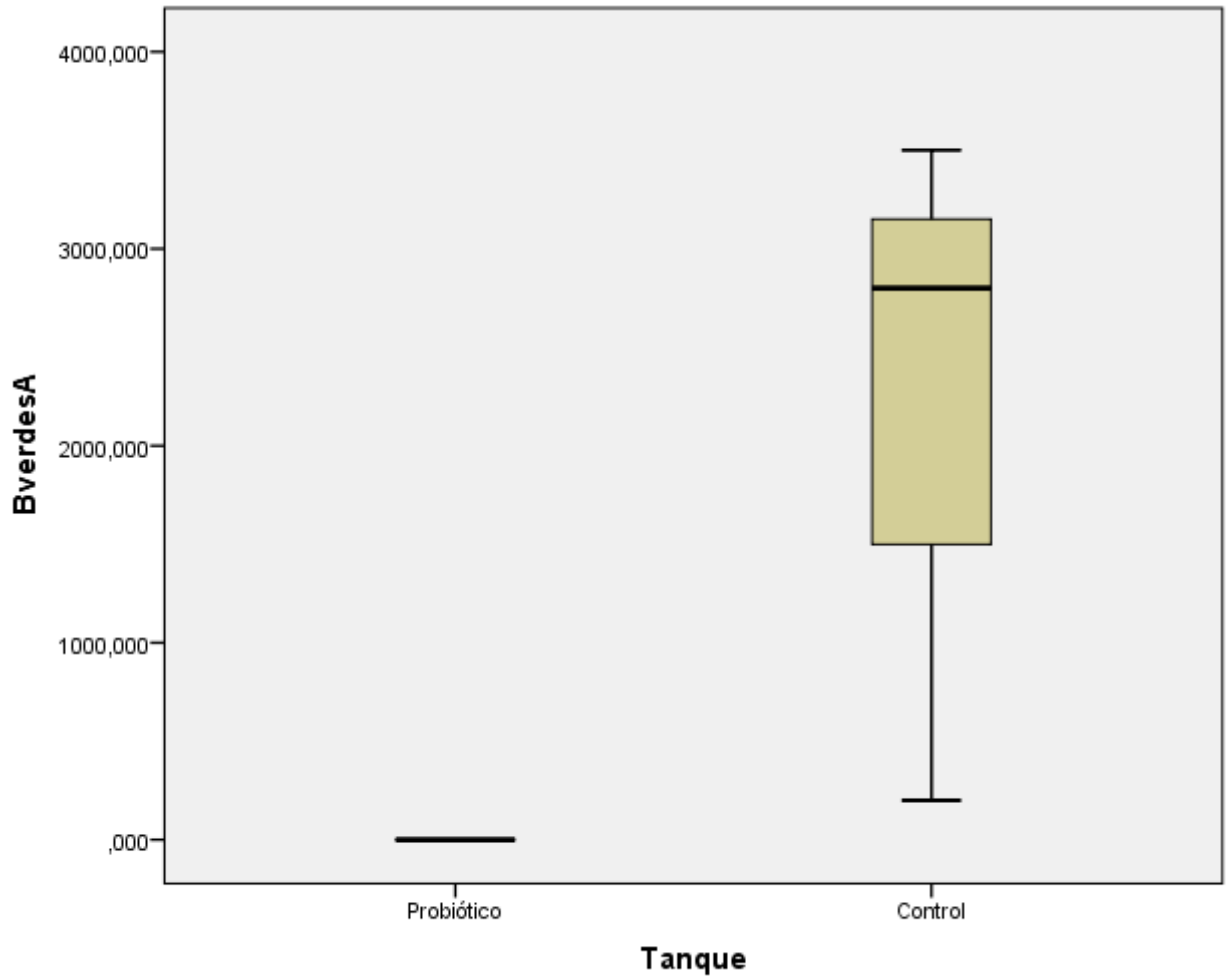
	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Supervivencia	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



**1.7. Diagrama estadístico bacterias verdes del agua.**

**Resumen de procesamiento de casos**

	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
B. verdes	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%

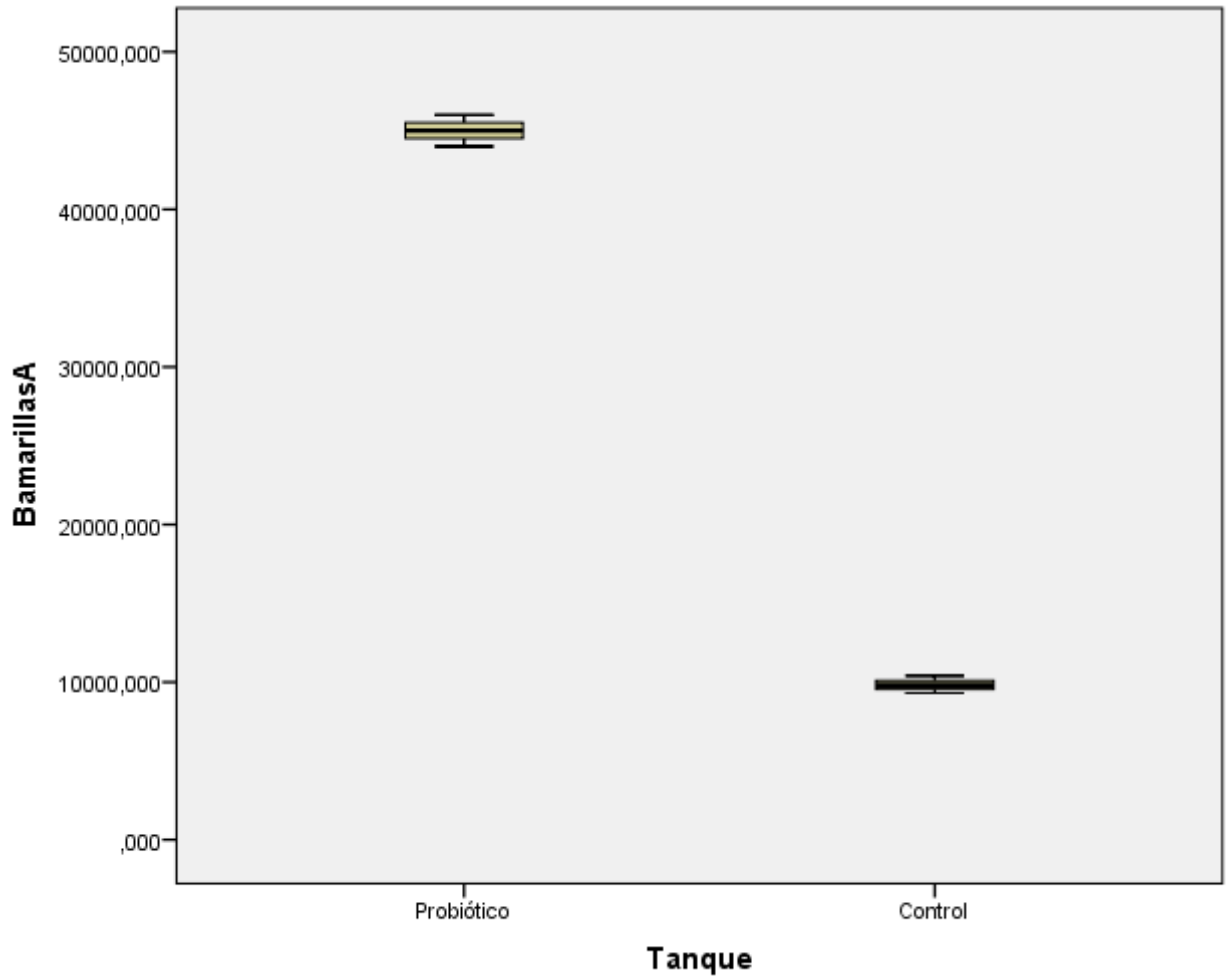




**1.8. Diagrama estadístico de bacterias amarillas del agua.**

**Resumen de procesamiento de casos**

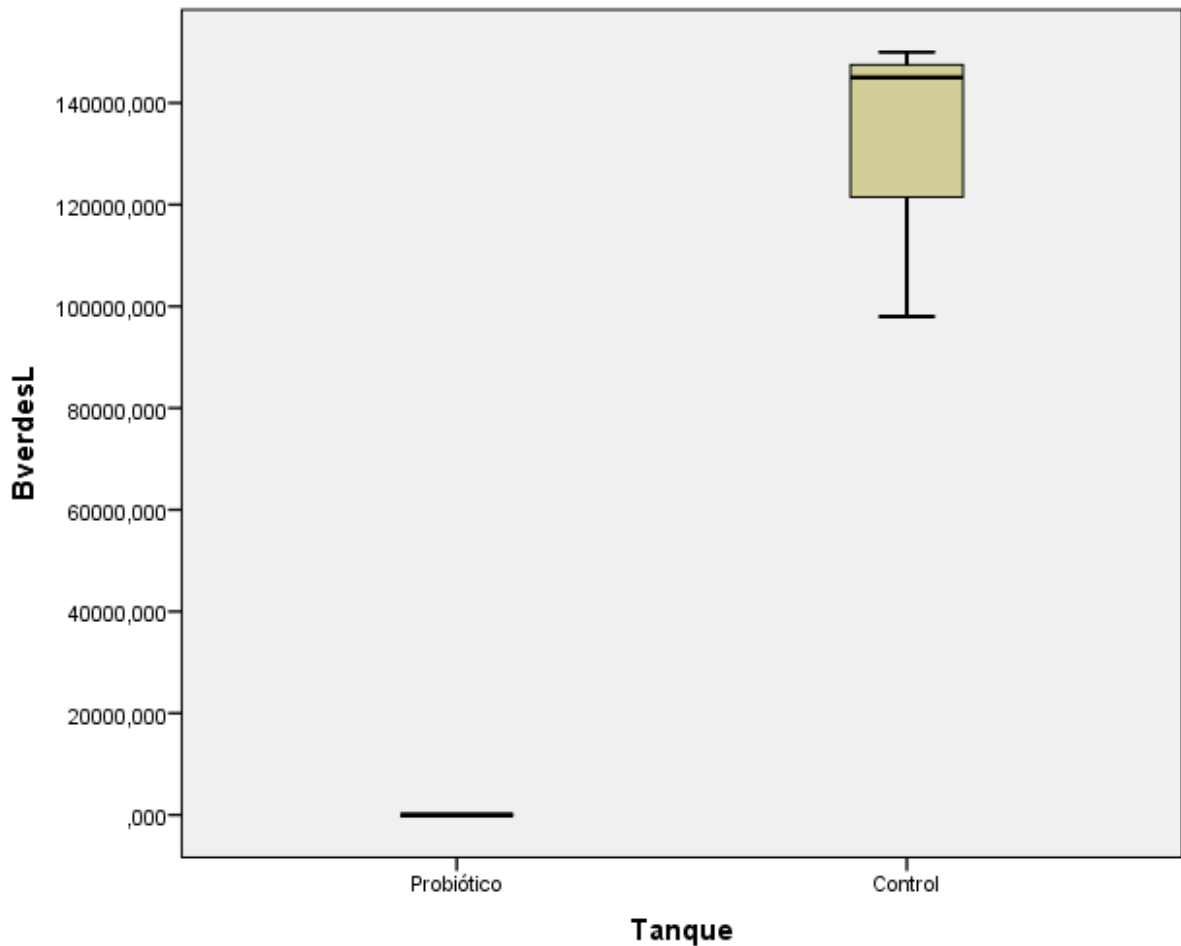
	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
B. amarillas	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



**1.9. Diagrama estadístico de bacterias verdes en post-larva de *L. vannamei***

**Resumen de procesamiento de casos**

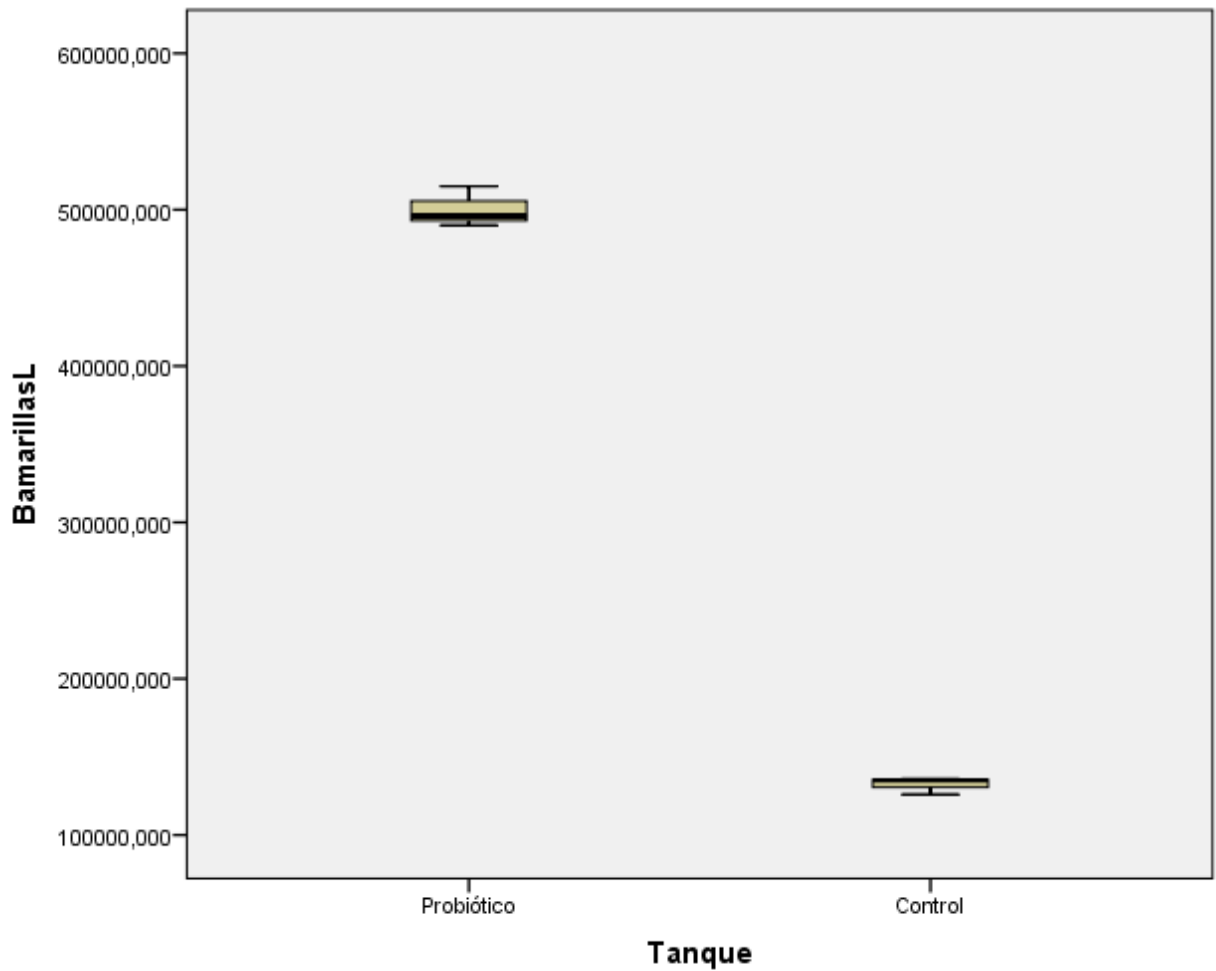
	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
B. verdes	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



**1.10. Diagrama estadístico de bacterias verdes en post-larva de *L. vannamei***

**Resumen de procesamiento de casos**

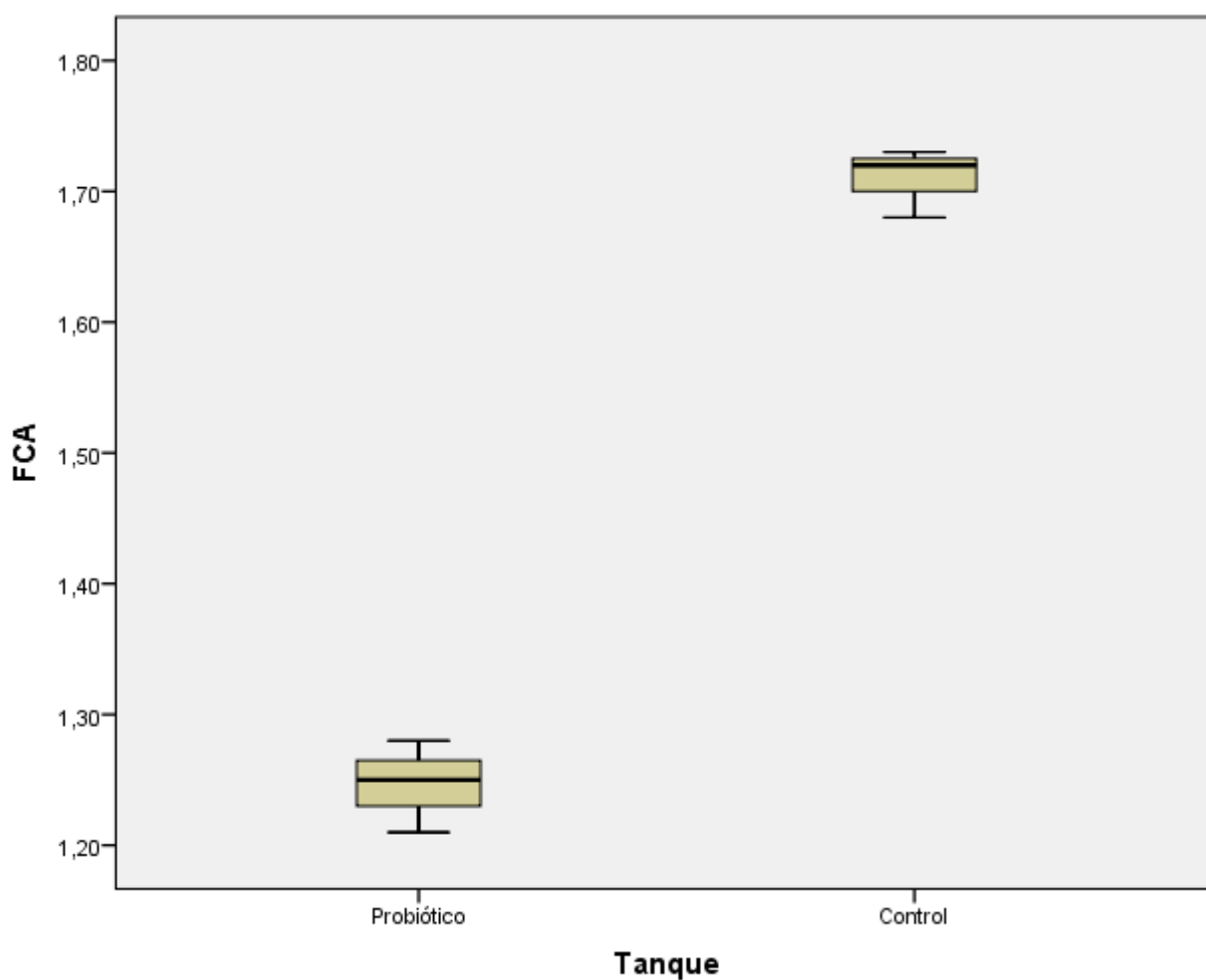
	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
B. amarillas	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



**1.11. Diagrama estadístico del factor de conversión alimenticio de post-larva de *L. vannamei* en etapa de precría.**

**Resumen de procesamiento de casos**

	Tanque	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
FCA	Probiótico	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Control	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%



# Efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *Litopenaeus vannamei* en etapa de precría

*por* Ronald García Camizán

---

**Fecha de entrega:** 13-dic-2019 11:42a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1233957988

**Nombre del archivo:** Tesis\_sustentada.docx (3.85M)

**Total de palabras:** 14788

**Total de caracteres:** 78566



## Efecto de la aplicación del probiótico en el crecimiento, supervivencia y estado sanitario de *Litopenaeus vannamei* en etapa de precría

### INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Nacional de Tumbes

Trabajo del estudiante

1%

2

[www.ensayostube.com](http://www.ensayostube.com)

Fuente de Internet

1%

3

[biblioteca.itson.mx](http://biblioteca.itson.mx)

Fuente de Internet

1%

4

Submitted to Pontificia Universidad Católica del Perú

Trabajo del estudiante

1%

5

[www.academia.edu](http://www.academia.edu)

Fuente de Internet

<1%

6

[repositorio.ucsg.edu.ec](http://repositorio.ucsg.edu.ec)

Fuente de Internet

<1%

7

[www.redalyc.org](http://www.redalyc.org)

Fuente de Internet

<1%

8

[www.scielo.sa.cr](http://www.scielo.sa.cr)



	Fuente de Internet	<1%
9	<a href="https://dspace.unitru.edu.pe">dspace.unitru.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
10	<a href="https://tesis.uson.mx">tesis.uson.mx</a> Fuente de Internet	<1%
11	<a href="https://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> Fuente de Internet	<1%
12	Stefano Casini, Salvatore Martino, Marco Petitta, Alberto Prestininzi. "A physical analogue model to analyse interactions between tensile stresses and dissolution in carbonate slopes", Hydrogeology Journal, 2006 Publicación	<1%
13	<a href="https://biblioteca.uns.edu.pe">biblioteca.uns.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
14	<a href="https://repositorio.untumbes.edu.pe">repositorio.untumbes.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
15	<a href="http://www.dspace.espol.edu.ec">www.dspace.espol.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
16	<a href="http://www.ciidirsenaloa.ipn.mx">www.ciidirsenaloa.ipn.mx</a> Fuente de Internet	<1%
17	<a href="https://tesis.bnct.ipn.mx">tesis.bnct.ipn.mx</a> Fuente de Internet	<1%

*E. Casini*

18	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%
19	Submitted to Georgia College & State University Trabajo del estudiante	<1%
20	pct.capes.gov.br Fuente de Internet	<1%
21	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	<1%
22	sociales.redalyc.org Fuente de Internet	<1%
23	repositorio.udl.edu.pe Fuente de Internet	<1%
24	Pinxian Yang, Weining Yang, Ming He, Xiaoqin Li, Xiang-Jun Leng. " Dietary synbiotics improved the growth, feed utilization and intestinal structure of largemouth bass ( ) juvenile ", Aquaculture Nutrition, 2019 Publicación	<1%
25	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1%
26	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
27	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	<1%



28	<a href="http://www.cibnor.gob.mx">www.cibnor.gob.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
29	Submitted to International Baccalaureate Trabajo del estudiante	<1 %
30	<a href="http://cesasin.mx">cesasin.mx</a> Fuente de Internet	<1 %
31	<a href="http://dspace.ups.edu.ec">dspace.ups.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
32	Submitted to Consorcio CIXUG Trabajo del estudiante	<1 %
33	<a href="http://www.dlh.lahora.com.ec">www.dlh.lahora.com.ec</a> Fuente de Internet	<1 %
34	Submitted to UNILIBRE Trabajo del estudiante	<1 %
35	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a> Fuente de Internet	<1 %
36	<a href="http://www.nicovita.com.pe">www.nicovita.com.pe</a> Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo