

UNIVERSIDAD DE MACHALA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE ACUACULTURA

**“EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS EN
JUVENILES *Litopenaeus vannamei*”**

TESIS DE GRADO

JOSÉ LUIS BALCÁZAR ROJAS
INGENIERO ACUACULTOR

DIRECTOR
Dr. WILSON TORRES RÍOS

CO-DIRECTORA
Ac. MARÍA AUXILIADORA SOTOMAYOR (CENAIM)

MACHALA

EL ORO

ECUADOR

2002

TRIBUNAL DE GRADO

DIRECTOR

Dr. WILSON TORRES

VISTO BUENO

MIEMBRO

M. Sc. EUDALDO JADAN

VISTO BUENO

MIEMBRO

Dr. WALTER PAREDES

VISTO BUENO

La responsabilidad por la investigación,
resultados y discusiones del presente
trabajo, pertenecen exclusivamente al
autor.

José Luis Balcázar Rojas

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres y a la memoria de mi abuelito Miguel, les dedico este trabajo y les doy infinitas gracias por todo su amor y apoyo brindado. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida y fortaleza para poder desarrollar esta tesis de grado.

A nuestra Santísima Virgen María por ser mi guía y refugio de mis penas y alegrías.

A mis padres Luis y Esperanza y a mi hermano Miguel por todo su apoyo incondicional.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas y a su director Ph. D. Jorge Calderón, por darme la oportunidad de realizar esta tesis.

De manera especial mi reconocimiento y agradecimiento a Ac. María Auxiliadora Sotomayor, a Rosa Malavé y Ac. Ricardo Cedeño, por la amistad, apoyo, confianza brindada y quienes en forma desinteresada colaboraron en este trabajo de investigación.

De igual manera al Dr. Wilson Torres R., director de la tesis, al Ing. Eudaldo Jadán y al Dr. Walter Paredes, colaboradores de la misma.

A mis amigos: Geovanny, Luis, Wilfrido, Miguel Angel, María, Jaqueline, Jodie, María Fernanda, Mervin, Danny, Miguel, Ivan y José, quienes hicieron mi estancia agradable en CENAIM.

A todo el personal del CENAIM porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A todas las personas que han colaborado de una u otra forma en la realización de esta tesis.

GRACIAS

RESUMEN

Las enfermedades constituyen un factor limitante en el desarrollo de la producción, es por eso que se buscan herramientas de control para el tratamiento de patologías infecciosas. La rutina para el manejo de los microorganismos patógenos ha implicado el suministro de antibióticos, sin embargo, por su uso indiscriminado se han presentado inconvenientes como la presencia de resistencia bacteriana. En la búsqueda de alternativas para el control y prevención de enfermedades se destaca el uso de probióticos, que actúan mediante mecanismos de exclusión competitiva de bacterias patógenas e incremento de la respuesta inmune en el hospedero.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar mezclas de cepas probióticas observando colonización, supervivencia, incremento de peso, inhibición de bacterias patógenas, inmunoestimulación y respuesta a la presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSV) en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Se evaluaron la interacción de cuatro cepas (*Vibrio* P62, *Vibrio* P63, *Vibrio alginolyticus* y *Bacillus* P64) *in vitro* para obtener mezclas que presenten proporciones similares. Las mezclas escogidas fueron sometidas a una prueba de inhibición *in vitro* con vibrios patógenos (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 y *V. parahaemolyticus* PA2) para demostrar su efecto antagónico. Las mezclas P63-III, P62-P64 y P62-P63-III presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50 %.

Las mezclas seleccionadas fueron sometidas a evaluaciones *in vivo* en los animales con un peso promedio de 1.38 ± 0.1 g a una concentración de 3.6×10^7 UFC/ml de las mezclas probióticas por gramo de alimento durante 45 días, logrando incrementar el peso de los animales y porcentajes superiores al 70% de colonización en los tratamientos. El análisis histológico, después de los bioensayos de colonización, demuestran la inocuidad de las mezclas P62-P63-Ili y P63-Ili.

Al final del bioensayo los animales fueron sometidos a una prueba de desafío, logrando inhibir el crecimiento de *Vibrio harveyi*. Se observó un 23%, 32% y 48%, de ingreso de la cepa patógena en los tratamientos P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili respectivamente.

El efecto inmunoestimulante, fue evaluado *in vivo* mediante pruebas inmunitarias en los animales mantenidos con las mezclas probióticas. El número total de hemocitos no se vió incrementado por la exposición de bacterias durante 45 días, la mezcla P63-Ili presentó menor actividad fenoloxidasa y la actividad antibacteriana aumentó por la presencia de mezclas probióticas en los tratamientos.

En los tratamientos con mezclas probióticas se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control en la supervivencia de los animales, cuando fueron sometidos a una prueba de desafío con el Virus de la Mancha Blanca (WSV), en cuatro días de infección.

I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola a nivel mundial enfrenta problemas relacionados con el desequilibrio ambiental y enfermedades infecciosas como producto de su desarrollo. De acuerdo con Peeters y Rodríguez (1999), estos inconvenientes están estrechamente relacionados con las prácticas de manejo en los ciclos de producción.

Hasta hace unos años, la rutina de manejo de las poblaciones bacterianas, era el uso de antibióticos y quimioterapéuticos, esto ha conducido a que actualmente se presenten dificultades derivadas de su utilización, tales como resistencia bacteriana y acumulación de residuos que afectan la exportación. Así, se emprendió la búsqueda de nuevas herramientas para el control de las enfermedades, surgiendo como una alternativa el uso de probióticos. La utilización de bacterias probióticas, bajo el principio de exclusión competitiva de patógenos, incremento de la nutrición y estimulación de la respuesta inmune, constituye en una herramienta viable para incrementar la producción.

El habitat microbiano está sometido a constantes alteraciones, que permiten cambios en la composición estructural y funcional de las comunidades microbianas y es improbable que una sola cepa empleada como probiótico pueda mantenerse predominando la población en los continuos cambios. Sin embargo, la probabilidad para que un probiótico pueda dominar, es mayor, cuando varias cepas bacterianas son administradas en el sistema de cultivo (Verschuere *et al.*, 2000).

Considerando el criterio del uso de mezclas de cepas probióticas, el presente estudio tuvo el objetivo de evaluarlas en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei* con el propósito de obtener una alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades bacterianas.

Los objetivos planteados para la realización de la presente investigación fueron:

- Estudiar las características enzimáticas de las cepas probióticas *in vitro*.

- Evaluar *in vitro* la interacción de mezclas de cepas probióticas.
- Evaluar *in vitro* el efecto inhibitor de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de vibrios patógenos.
- Evaluar *in vivo* las mezclas probióticas en juveniles *L. vannamei*.
- Evaluar *in vivo* las mezclas probióticas en juveniles *L. vannamei* desafiados con vibrios patógenos.
- Evaluar *in vivo* las mezclas probióticas en juveniles *L. vannamei* desafiados con el Virus de la Mancha Blanca (WSV).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR BACTERIAS EN EL CULTIVO DE CAMARÓN

2.1.1 GENERALIDADES

La producción de camarón a nivel mundial presenta progresos tecnológicos en su desarrollo. Sin embargo, durante este proceso no han existido iguales avances en el diagnóstico y prevención de patologías, situaciones, que han desencadenado grandes pérdidas económicas debido a la presencia de enfermedades.

Las patologías de origen infeccioso en el cultivo de peneidos son ocasionados por microorganismos clasificados como patógenos oportunistas. Normalmente estos microorganismos se encuentran en el agua, sedimento y formando parte de la microflora intestinal de muchas especies acuáticas (Moriarty, 1999). Es importante señalar que los patógenos oportunistas asumen su perfil patológico en determinadas condiciones ambientales o fisiológicas en que el hospedero se encuentra.

El establecimiento de patologías infecciosas y no infecciosas pueden ser de orden físico, químico o biológico y el contacto con estos agentes invariablemente resultará en una reducción de la capacidad inmunitaria de los animales provocando así la incidencia de una variedad de enfermedades (Johnson, 1989).

Las enfermedades que afectan los cultivos de camarón son atribuidas a una variedad de agentes biológicos y no biológicos tales como bacterias, hongos, protozoarios, virus, factores nutricionales y ambientales (Lightner, 1992). Siendo las bacterias del género *Vibrio sp.*, causantes de la mayoría de patologías en *L. vannamei* (Brown, 1989), *P. monodon* (Moriarty, 1998) y *P. chinensis* (Vandenberghe *et al.*, 1998), especies de importancia comercial.

Entre las especies de vibrios, reportados como patógenos en el cultivo de camarón se menciona al *Vibrio alginolyticus* (Lightner, 1992), *Vibrio parahaemolyticus* (Mohney *et al.*, 1994), *Vibrio splendidus* (Baticados *et al.*, 1990), *Vibrio harveyi* (Morales, 1992), *Vibrio damsela* (Song *et al.*, 1993) y *Vibrio campbellii* (Hammed, 1995). Estos agentes patógenos han sido responsables de grandes pérdidas económicas en la producción de camarón.

2.1.2. ENFERMEDADES EN EL ECUADOR

En la actualidad, la industria acuícola ecuatoriana presenta su mayor depresión como consecuencia del virus de la mancha blanca (WSV) (Intriago, 2001). Al igual que otros países productores, Ecuador, ha reducido sus volúmenes exportables a causa de diversos fenómenos patológicos. En el año 2000, se presentó una disminución del 60% en volumen de exportación y 52% en dólares con respecto a la producción del año 1999 (CNA, 2001), generando un impacto económico y social.

Al igual que el virus de la mancha blanca, agentes patógenos de origen bacteriano han estado implicados en la desestabilización del sector acuícola en el país. Entre las enfermedades bacterianas, que han afectado al sector camaronero en el Ecuador podemos mencionar:

El Síndrome de la Gaviota; apareció a finales de 1989 en camaroneras aledañas al Estero Salado, se lo denominó así por la observación de bandadas de aves marinas que se alimentaban de animales muertos y moribundos de los estanques afectados. Perdiéndose el total de las poblaciones por causa de este síndrome (Mohney *et al.*, 1994). Por estudios realizados, se estableció que las mortalidades se debían a bacterias, principalmente del género *Vibrio sp.* Anderson *et al.* (1988), en muestras de hemolinfa de los camarones afectados, lograron aislar especies de vibrios como *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

Hepatopancreatitis necrotizante (NHP); asociada a bacterias intracelulares, en cultivos de *Litopenaeus vannamei* en el país, ocasionó grandes mortalidades en piscinas de cultivo durante los primeros meses de 1995 en todo el Golfo de Guayaquil (Jiménez *et al.*, 1996).

Síndrome de Bolitas; las primeras mortalidades atribuidas a esta enfermedad fueron observadas a finales del año 1987, causando pérdidas en los laboratorios. Morales (1992) aisló una cepa de *V. harveyi* E22 de larvas enfermas, cepa que demostró ser causante de esta patología (San Miguel, 1996).

Síndrome de Zoea; ha afectado en los últimos años a los laboratorios de larvas, provocando altas mortalidades, principalmente en los estadios de Zoea II (Intriago, 1999). El agente causal de este síndrome se le atribuyó a *V. harveyi* mediante pruebas de ADN (Vandenberghé *et al.*, 1999).

2.2. TÉCNICAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES

En los últimos años, muchas investigaciones se han encaminado al desarrollo de técnicas preventivas y terapéuticas, para reducir o impedir la incidencia de enfermedades en los cultivos. Peeters y Rodríguez (1999) señalan que los problemas de enfermedades muchas veces son ocasionados por el manejo inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de ataques bacterianos.

La tendencia actual es de restringir y/o reducir el uso de antibióticos debido a la aparición de resistencia bacteriana, problemas ecológicos, restricción de las exportaciones por presencia de residuos en los tejidos de camarones y su incidencia en la salud humana.

Las estrategias de control han sido encaminadas hacia el uso de técnicas mejoradas en larvicultura (Alday, 1999), programas de selección genética (Pérez y Gómez, 2001), vacunas a partir del uso de virus inactivo (Melena, 2000) y aplicación de β -glucanos (Otero *et al.*, 2000; Newman, 2000) para incrementar el rendimiento y resistencia a enfermedades de origen viral o bacteriano.

Una estrategia de control bacteriológico muy interesante y con resultados prometedores, se enfoca al empleo de probióticos, como alternativa al uso de antibióticos y quimioterapéuticos, bajo el principio de exclusión competitiva. Es una herramienta viable, ya que las bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como directamente del tracto digestivo de los camarones, reduciendo las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos ó puedan convertirse en nocivos (Berger, 2000; Newman, 2000 ; Moriarty, 2001; Benetti, 2001; Chamberlain, 2001).

Varios estudios han demostrado que el uso de mezclas probióticas son más efectivas que las cepas independientes en el control de patógenos, ya que la posibilidad de establecer poblaciones probióticas a pesar de las variaciones medio ambientales es mayor. Además, se han observado procesos sinérgicos entre cepas, que han incrementado los resultados deseados (Douillet, 2000).

2.3. PROBIÓTICOS

El concepto de *Probiótico* nace a principios del siglo pasado con los trabajos de Metchnikoff en humanos, quien sostenía que la ingestión de microorganismos benéficos hacía posible controlar los microorganismos patógenos (Aguirre, 1993). Fuller (1989) modifica la definición, señalando que los probióticos son un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al huésped animal con una mejoría del balance microbiano intestinal. Posteriormente, se ha relacionado el término probiótico respecto al hospedero y al hábitat de la microflora, mencionándolo como un cultivo simple o mixto viable de microorganismos, los cuales aplicados a un animal o al hombre lo afectan beneficiosamente, mejorando las propiedades de su microflora endógena (Havenaar y Huis in't Veld, 1992 *vide* Mulder *et al.*, 1997).

Desde entonces, la utilización de bacterias benéficas como herramienta de control biológico se ha aplicado en la alimentación, salud humana (Gibson *et al.*, 1997) y en la industria ganadera (Mulder *et al.*, 1997), con excelentes resultados. Así, mediante estas experiencias, en la última década varios países involucrados en la industria acuícola están utilizando probióticos dentro de sus protocolos de cultivo.

En acuicultura, se define al término probiótico como suplemento microbiano que permanece vivo dentro del hospedero con el propósito de mejorar la salud (Gatesoupe, 1999) tener la capacidad de mejorar la calidad del agua y sedimento (Douillet, 1998; Gomez, 1998).

Sin embargo, al mencionar el uso de microorganismos con potencial para mejorar la descomposición de la materia orgánica y controlar los niveles de amonio y nitrito, se ha creado una confusión con la definición original que engloba la colonización en el hospedero, en este caso el término adecuado sería bioremediadores (Moriarty, 1997) para referirnos a los microorganismos que mejoran la calidad del agua y sedimento.

2.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos compiten con microorganismos nocivos por sitios de adhesión, nutrientes y energía disponible. Los mecanismos de acción de las bacterias, constituyen un factor determinante de la composición de la microflora intestinal y medioambiental de las especies acuáticas de cultivo.

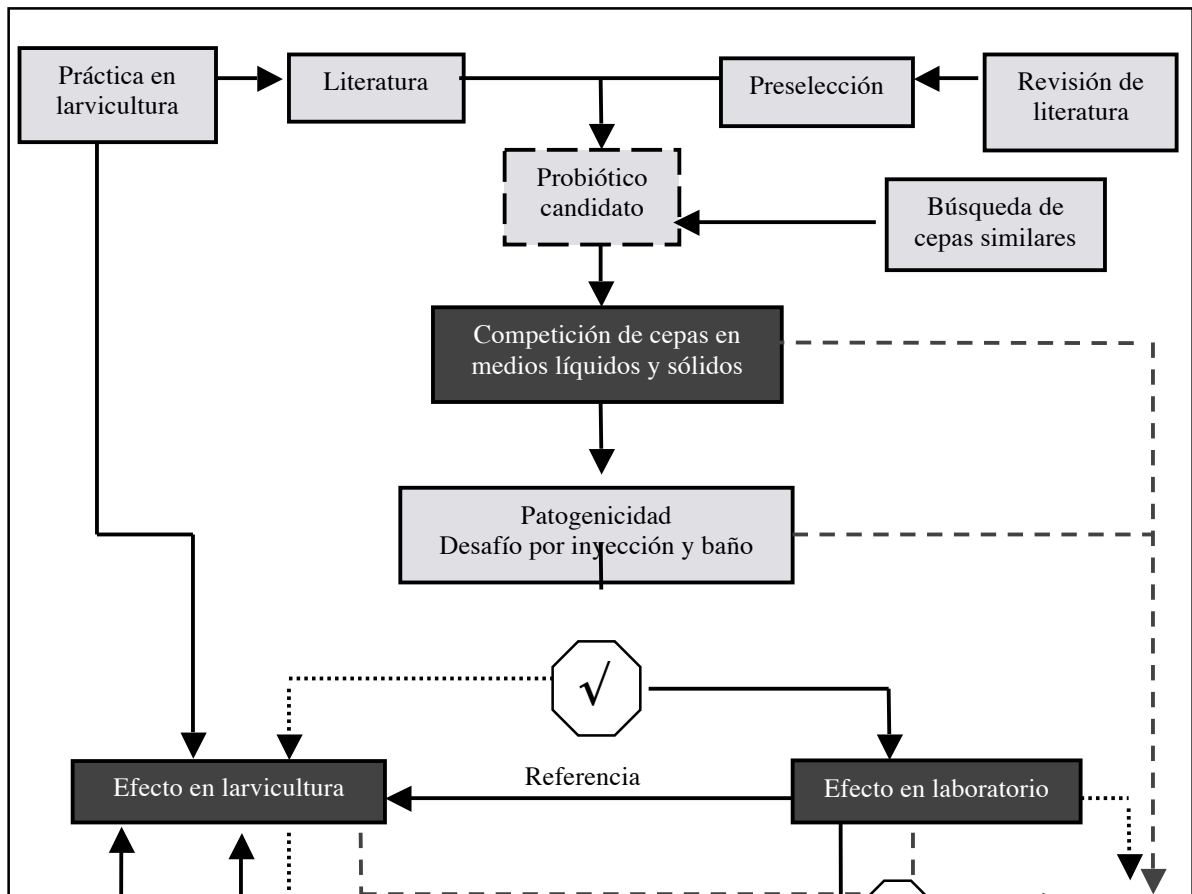
Entre los criterios que caracterizan los probióticos en los cultivos acuícolas se menciona la exclusión competitiva de bacterias patógenas; producción de sustancias que inhiben el crecimiento de patógenos oportunistas; mejoramiento en la nutrición del hospedero por el suministro de nutrientes y enzimas esenciales; degradación de la materia orgánica (Garriques y Arévalo, 1995) y estimulación de la respuesta inmune del hospedero (Rengpipat *et al.*, 2000, Gullian, 2001).

2.3.2. SELECCIÓN DE CEPAS PROBIÓTICAS

Usualmente los probióticos empleados en el cultivo del camarón son aplicados sin estudios que demuestren su beneficio en los sistemas de cultivo, pues su selección es normalmente empírica debido a la limitada evidencia científica (Gomez *et al.*, 2000) o por basarse en investigaciones realizadas en otras especies. Para definir la selección es necesario entender sus mecanismos de acción, métodos de producción y administración.

Las cepas candidatas deben someterse a pruebas experimentales con las especies acuáticas en cultivo con el propósito de valorar los parámetros de crecimiento y supervivencia (Figura 1). Naturalmente, además de mejorar la supervivencia, es importante que el incremento de peso no sea afectado. Finalmente es necesario realizar una evaluación económica para la producción y uso a escala comercial del probiótico (Gomez, 1998).

Sin embargo, la selección de cepas candidatas es un tema controversial, ya que existen géneros probióticos que se encuentran dentro de las especies patógenas (Monhey *et al.*, 1994). Vandenberghe *et al.* (1999) identificaron *Vibrios sp.* asociados al cultivo de *L. vannamei*, encontrando la especie de *V. alginolyticus* en larvas y juveniles en estado sano y enfermo. Sin embargo, Serrano (1996) utilizó *V. alginolyticus* cepa Ili a nivel experimental como herramienta de control biológico para la prevención de patologías por la incidencia de *V. harveyi* cepa E22 en larvas de *L. vannamei*.



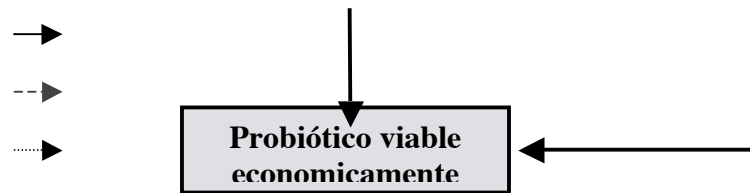


Figura 1. Esquema de selección de probióticos para larvas de organismos acuáticos. Tomado de Gomez (1998).

2.3.3. CAPACIDAD DE COLONIZACIÓN DEL PROBIÓTICO

Se define la capacidad de colonización como el suministro de microorganismos vivos, los cuales ingresan al hospedero y continúan multiplicándose (Aguirre, 1993). Sin embargo, la permanencia del probiótico dentro del hospedero, está sujeto a factores fisiológicos, antagónicos y medioambientales (Mulder *et al.*, 1997).

Para establecer la capacidad de colonización es necesario detectar la cepa por largo tiempo y cuando esta forma parte de la flora bacteriana del tracto intestinal. Así, Gatesoupe (1999) considera que es esencial evaluar la persistencia del probiótico para establecer la frecuencia de administración en los sistemas de cultivo.

Al colonizar el tracto digestivo de la especie bajo cultivo, logran impedir y/o disminuir el establecimiento de microorganismos nocivos. Gullian (2001) demostró que el suministro de cepas probióticas de *Vibrios sp.* y *Bacillus sp.* lograron disminuir la proliferación de *V. harveyi* cepa S2 en el hepatopáncreas de *L. vannamei*.

Además, le transmiten beneficios al hospedero, mediante una mejora substancial del proceso digestivo. Intriago y Jones (1993) reportaron la presencia de una cepa de *Flexibacter* (Inp3), en la dieta de *Artemia sp.* que le asiste en el proceso digestivo.

2.3.4. INTERACCIÓN Y ANTAGONISMO BACTERIANO

El uso de probióticos ha sido ampliamente estudiado en vertebrados, siendo demostradas las relaciones simbióticas de mezclas bacterianas, y la metodología de administración por Huber (1997); Mulder *et al.* (1997) y Dehority (1998). En acuicultura, esta práctica es reciente, por lo que muchas inquietudes necesitan ser investigadas y verificadas.

La microflora bacteriana desempeña un rol importante en la prevención de enfermedades, al impedir la incursión de nuevos microorganismos, que ocasionalmente son patógenos (Gibson *et al.*, 1997). Así, la interacción microbiana contribuye a la homeostasis de la microflora endógena del animal, por lo cual, cuando existen problemas en la microflora se asocia con frecuencia a la desestabilización del ecosistema (Gomez, 1998).

El antagonismo entre bacterias marinas es un mecanismo natural. Esta capacidad se debe a que algunas bacterias pueden inhibir el crecimiento de otras por poseer ciertas características como; producción de sustancias químicas que tienen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras, producción de bacteriocinas, sideróforos, lisozimas, peróxido de hidrógeno y formación de amonio (Sugita *et al.*, 1996; Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000).

Dopazo *et al.* (1988) reportaron, que bacterias marinas (*Pseudomonas sp.* y *Alteromonas sp.*) producen antibióticos que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias del género *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella* y *Yersinia*, asociadas a problemas patológicos en cultivos de peces.

Estas propiedades antagónicas han sido aprovechadas por varios investigadores, para realizar pruebas de desafío con patógenos, con el fin de demostrar la capacidad probiótica de la bacterias en estudio. De esta forma se han realizado pruebas *in vivo* para la selección de cepas probióticas, utilizando bacterias extraídas de ambientes acuáticos (Garriques y Arévalo, 1995 y Gomez *et al.*, 2002), del intestino (Wang *et al.*, 1996) y hepatopáncreas (Gullian, 2001) del camarón.

2.4. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

Los probióticos mas utilizados en acuicultura son del género *Lactobacillus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Vibrios sp.*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* (Verschuere *et al.*, 2000). Ver tabla1.

2.4.1. PECES

En el cultivo de peces, existen varios trabajos, Austin *et al.* (1995) utilizaron cepas de *V. alginolyticus* para realizar pruebas de desafío con *Aeromona salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *V. ordalii*, reportando que la aplicación de este probiótico redujo las mortalidades en salmones.

Sakai *et al.* (1995) reportaron incremento de la resistencia a vibriosis en truchas arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, por administración oral de la bacterina *Clostridium butyricum* durante 3 días consecutivos.

Ali (2000), utilizó una mezcla probiótica Add-B, compuesta por *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum viridis*, *Rhodospirillum palustris* y *Rhodospirillum vannielii* para realizar pruebas frente al patógeno *A. salmonicida*, encontrando mayor supervivencia de los peces *Oncorhynchus mykiss* con respecto al control.

Robertson *et al.* (2000) aislaron cepas de *Carnobacterium sp.* del intestino de *Salmo salar L.*, para evaluar su uso como probiótico en el cultivo de salmones, observando que después de 14 días de administración se redujo la incidencia de bacterias patógenas como *A. salmonicida*, *V. ordalii* y *Yersinia ruckeri*.

Además se ha reportado en pruebas *in vitro* el efecto antagónico de la bacteria probiótica *Pseudomonas fluorescens*, cepa AH2 contra *V. anguillarum* (Gram *et al.*, 1999) y *A. salmonicida* (Gram *et al.*, 2001) en el cultivo salmón.

2.4.2. MOLUSCOS BIVALVOS

Riquelme *et al.* (1997) en el cultivo de scallop *Argopecten purpuratus*, observaron que la bacteria *Alteromona haloplanktis* y un *Vibrio* cepa 11, produjeron inhibición del *V. anguillarum*, bacteria patógena asociada a infecciones en larvas de scallop. Además, se ha reportado el uso de *Arthrobacter sp.*, cepa 77, como método de control y prevención de infecciones provocadas por *V. splendidus*, *V. alginolyticus* y *A. hydrophyla*, en el cultivo de scallop *A. purpuratus* (Riquelme *et al.*, 2000).

Gibson *et al.* (1998) aislaron una cepa A199 del género *Aeromonas media*, con la capacidad de producir inhibición del crecimiento de varias cepas de *Aeromonas sp.* y *Vibrio sp.*, asociadas a enfermedades en el cultivo de larvas de ostras *Crassostrea gigas*, además, la cepa A199 demostró su efecto probiótico cuando las larvas de ostras fueron sometidas a pruebas de desafío con *V. tubiashii*.

2.4.3. CRUSTÁCEOS

En las diferentes especies de peneidos, las cepas probióticas corresponde al género *Vibrio*, reportándose el uso de las siguientes especies: *V. alginolyticus* (Garriques y Arévalo, 1995; Griffith, 1995; San Miguel, 1996; Serrano, 1996; Zherdmant, 1996), *V. fluvialis* y *V. campbellii* (Wang *et al.*, 1996). Además, se ha utilizado especies del género *Bacillus* *sp.* (Moriarty, 1998; Rengpipat *et al.*, 1998 y Rengpipat *et al.*, 2000).

Una cepa de *V. alginolyticus*, aislada del mar, se aplicó en postlarvas de *L. vannamei*, obteniéndose mayor crecimiento y supervivencia en comparación con el tratamiento que utilizaron antibióticos. Además, observaron que la bacteria constituía una alternativa en la profilaxis de los sistemas intensivos de cultivo de larvas (Garriques y Arevalo, 1995).

Los beneficios del uso de probióticos han sido observados por Rengpipat *et al.* (1998) en pruebas con *P. monodon*, utilizando la cepa *Bacillus* S11. Se reportó 100% de supervivencia en los tanques con probiótico con respecto al control que presentó 26% de supervivencia, luego de 10 días de exposición en pruebas de desafío con *V. harveyi*.

De igual forma Moriarty (1998) en estanques de engorde de camarón *P. monodon* en Indonesia, demostró que la incorporación de *Bacillus* *sp.* durante 160 días de cultivo en el agua, cambió la composición de las especies bacterianas, decreciendo la proporción de *Vibrio* *sp.* luminiscente y mejorando la producción del cultivo.

Es importante señalar que el uso de probióticos, puede tener un efecto estimulante sobre el sistema inmune de los camarones. Rengpipat *et al.* (2000) reportaron en cultivos de camarón *P. monodon* en Tailandia, mayor supervivencia en camarones tratados con probióticos por 90 días con *Bacillus* S11, que el control. Wang *et al.* (1996) utilizando cepas de *V. fluvialis* y *V. campbellii* aisladas del intestino de *Penaeus chinensis*,

reportaron mayor tasa de supervivencia y peso que el control, atribuyéndose los resultados al aumento de la inmunidad del animal y a mecanismos de exclusión competitiva frente a patógenos.

Además, se han realizado estudios, involucrando el uso de bacterias probióticas para incrementar la eficiencia en la producción de especies acuáticas al utilizarlas con algas (Gomez *et al.*, 2002), rotíferos (Makridis *et al.*, 2000; Douillet, 2000) o artemia (Verschuere *et al.*, 1999).

Verschuere *et al.* (1999) demostraron que el suministro de las cepas bacterianas LVS4 y LVS5 brindaron mayor crecimiento y supervivencia en el cultivo de *Artemia*. Igual resultado observó Douillet (2000) al suministrar una de cepa de *Alteromonas* y una mezcla de cepas M2 en el cultivo de rotíferos *Brachionus plicatilis* con respecto al control.

2.4.6. USO DE PROBIÓTICOS EN EL ECUADOR

Desde 1992, en el Ecuador, se ha empleado *V. alginolyticus* como probiótico en la larvicultura de *L.vannamei* (Griffith, 1995). Los primeros trabajos corresponden a Garriques y Arévalo (1995), quienes utilizaron una cepa *V. alginolyticus* en larvicultura comercial de *L. vannamei*, reportando mayor supervivencia y crecimiento con respecto al control.

Desde 1995, en el CENAIM se han realizado investigaciones encaminadas al uso de probióticos en larvicultura. Así, San Miguel (1996) realizó un modelo experimental *in vivo* con *V. alginolyticus* cepa Ili como probiótico y *V. harveyi* cepa E22 como patógeno en larvas de *L. vannamei*, señalando que es posible controlar la flora bacteriana en larvas, con exposiciones del probiótico en el estadio Zoea I.

En pruebas *in vitro*, Zherdmant (1996) estudió la actividad del *V. alginolyticus* y su capacidad de resistencia al ser expuesta a productos profilácticos utilizados en larvicultura de *L. vannamei*.

Serrano (1996) demostró, que es posible controlar los procesos de monoclonización en larvas utilizando *V. alginolyticus* cepa Ili. Además, Tapia (1997) en pruebas de evaluación inmunitaria encontró una respuesta estimulante a nivel hemocitario.

Gulliam (2001) estudió el efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *P. vannamei*, encontrando un índice inmunitario mayor en camarones inoculados con *Bacillus* cepa P64 y *V. alginolyticus* cepa Ili, respecto del control.

2.5. LA RESPUESTA INMUNE EN LOS CRUSTÁCEOS

Como en todos los invertebrados, el sistema inmunitario de los crustáceos se diferencia de los vertebrados por la falta de producción de anticuerpos. Sin embargo, son capaces de reaccionar contra patógenos a través de mecanismos inmunitarios, celulares y humorales (Bachère, 2000).

En los crustáceos la respuesta inmune se presenta en dos fases, una inmediata no inducible asociada a los efectores celulares, quienes son responsables de los procesos de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y síntesis del pigmento melanina por la enzima fenoloxidasa (Söderhäll y Cerenius, 1992). La segunda fase inducida humoral, se caracteriza por la participación de proteínas y péptidos con propiedades microbicidas (Destoumieux *et al.*, 1997).

2.5.1 ESTIMULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La estimulación del sistema inmune en organismos acuáticos por el uso de cepas probióticas (Gatesoupe, 1999, Rengpipat *et al.*, 2000 y Gullian, 2001), constituye una alternativa para mantener el sistema de defensa activo, aumentando la resistencia al ataque de diversos microorganismos de naturaleza patógena.

En la actualidad, se conoce que el sistema inmunitario del camarón puede ser estimulado por moléculas microbiales, como lipopolisacáridos, peptidoglucanos, β -glucanos (Newman, 2000) y por lo general, estas sustancias son extraídas de las paredes de las bacterias y hongos.

Los β -glucanos provienen de las paredes de diversos hongos y levaduras. Los peptidoglucanos son una mezcla de aminoácidos y azúcares presentes en la pared celular de bacterias Gram (+) y se ha experimentado su uso frente a virus y bacterias con resultados positivos.

Los lipopolisacáridos son los componentes estructurales de la pared celular de bacterias Gram (-) y a este grupo corresponden especies del género *Vibrio*. Han sido objeto de estudios y son conocidos por ejercer efectos específicos y no específicos sobre el sistema inmune de muchos animales y potentes efectos no específicos en crustáceos (Newman, 2000).

2.5.2. TÉCNICAS INMUNITARIAS

2.5.2.1 Hemograma

Los hemocitos son responsables del proceso de fagocitosis, eventos de nodulación y encapsulación. Ellos catalizan procesos de coagulación y almacenan las enzimas responsables de la melanización que involucra la actividad fenoloxidasa (PO) presente en los sitios de inflamación de los crustáceos (Johansson *et al.*, 2000).

Söderhäll y Cerenius (1992) señalan que los hemocitos tienen la capacidad de reconocer, reaccionar y remover cualquier partícula extraña que penetran en la cavidad corporal.

Los crustáceos presentan tres tipos de hemocitos clasificados de acuerdo a su morfología: hialinos (H) vinculados en el proceso de coagulación y fagocitosis; semigranulosos (SG) involucrados en el proceso de encapsulación, nodulación, fagocitosis (limitado) y activación del sistema profenoloxidasa (proPO); y granulosos (G) intervienen en el mecanismo de encapsulación y contienen las enzimas del sistema proPO (Johansson *et al.*, 2000).

El hemograma consiste en el conteo hemocitario total (THC) y el conteo hemocitario diferencial (DHC), de acuerdo a los 3 tipos de hemocitos. Los hemocitos G son fácilmente diferenciables por la presencia de gránulos. Sin embargo, los otros hemocitos presentan una compleja identificación que se basa en su refringencia en un microscopio de contraste de fases con filtro azul. Los H presentan poca refringencia que se traduce en una coloración azul marino, los SG más refringentes presentan un color celeste y los G presentan una coloración amarillo brillante por su elevada refringencia. Esta técnica presenta las ventajas de ser rápida, sencilla y de no requerir de ningún tratamiento especial para las células (Muñoz, 1996).

2.5.2.2. Sistema fenoloxidasa (PO)

La enzima clave en la síntesis de la melanina es la fenoloxidasa, la cual es activada al liberarse la proPO por estimulación de componentes de la paredes celulares microbiales y acompaña en la respuesta inflamatoria de todos los crustáceos (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

La PO cataliza la oxidación de los fenoles a quinones, los cuales a su vez, se polimerizan de forma no enzimática para formar la melanina (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Estudios indican una relación directa entre la desencadenación de la actividad PO por los polisacáridos microbianos. Así, Sotomayor (2000) señala que la estimulación provocada por los vibrios, activan con fuerza el sistema proPO, factor favorable en la detección de procesos de vibriosis en formación.

2.5.2.3. Actividad Antibacteriana

Estudios en invertebrados han registrado numerosas moléculas que matan células extrañas como microorganismos. Destoumieux *et al.* (1997) reportó una nueva familia de péptidos antimicrobiales aislado de *P. vannamei*, denominadas peneidinas, las cuales contribuirían en la eliminación de hongos y bacterias en especial Gram positivas.

Para la cuantificación de la actividad antibacteriana de la hemolinfa de *Penaeus monodon*, se han utilizado ensayos cuantitativos basados en la inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar (Adams, 1991; Rengpipat *et al.*, 2000). Otros han utilizado en *Penaeus vannamei* un método turbidométrico cuyo principio se basa en la medición de la turbidez de suspensiones bacterianas en un espectrofotómetro, en presencia o ausencia del plasma de camarón (Tapia, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en San Pedro de Manglaralto, en la Península de Santa Elena, Provincia del Guayas.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. CEPAS PROBIÓTICAS

Se utilizaron 4 cepas probióticas proporcionadas por CENAIM para realizar las evaluaciones experimentales,:

La cepa Ili (*Vibrio alginolyticus*) aislada por (Morales *vide* San Miguel 1996) y caracterizada por San Miguel (1996). Serrano (1996) demostró su efecto probiótico en larvas de camarón.

Las cepas P62 y P63 (*Vibrios sp.*) y P64 (*Bacillus sp.*) fueron aisladas del hepatopáncreas de animales silvestres sanos de *L. vannamei* y estudiados sus efectos probióticos en camarones juveniles por Gullian (2001).

3.2.2. CEPAS PATÓGENAS

Se utilizaron 3 cepas patógenas para realizar las evaluaciones experimentales:

La cepa bacteriana E22 fue aislada por Aráuz en 1994 de larvas de camarón que presentaron el síndrome de “bolitas” y fue identificada bioquímicamente como *Vibrio harveyi* (Serrano, 1996).

La cepa S2 (*V. vulnificus*), aislada de larvas que presentaron el Síndrome de “Bolitas”. Sotomayor (2000), demostró la naturaleza patógena de la cepa en camarones juveniles.

La cepa PA2 (*V. parahaemolyticus*), aislada de camarones enfermos por el Centro de Servicios para la Acuicultura (Guayaquil, Ecuador).

3.2.3. MANEJO DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las cepas puras mantenidas a -80 °C en medio *Lennox L Broth Base* (LB) modificado al 2% NaCl con 15% de glicerol, fueron aisladas en placas de agar *Tryptic Soy Agar* (TSA) al 2% NaCl, utilizando la técnica de rayado. Se incubó a 30 °C por 12 horas.

3.3. ESTUDIO *in vitro* DE LAS CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

En la determinación de la producción de enzimas, las cuatro cepas probióticas fueron sometidas a pruebas hidrólisis de gelatina, almidón, lipasa y caseinasa. Se utilizó 3 réplicas con una adaptación de la metodología descrita por Wang *et al.* (1996).

3.3.1 PROTOCOLO PARA DETERMINAR PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

Prueba de gelatina, se utilizó Agar Marino (MA) con 1.5% de gelatina, se inoculó la bacteria a 1×10^3 Unidades Formadoras de Colonia/mililitro (UFC/ml) y se la mantuvo por 24 h. a 28°C. Se utilizó como agente precipitante una solución 15% HgCl₂

(w/v) con 20% de HCl (v/v) concentrado. El halo claro alrededor de la colonia indicó la hidrólisis de la gelatina.

Prueba hidrólisis de almidón, se utilizó MA con 0.1% de almidón soluble, se inoculó la bacteria a 1×10^3 UFC/ml y se la mantuvo por 24 h. a 28°C. Se utilizó 2 ml Lugol (0.33% I₂ y 0.66% KI en agua destilada) como indicador. El halo de color púrpura alrededor de la colonia indicó la reacción positiva.

Prueba de lipasa, se utilizó MA con 1% de Tween 80, se inoculó la bacteria a 1×10^3 UFC/ml y se la mantuvo por 48 h. a 28°C. La presencia de actividad fue indicada por el ácido oléico insoluble, formando halos blancos alrededor de las colonias.

Prueba de caseinasa, se utilizó Agar marino con 1% de caseína, se inoculó la bacteria a 1×10^3 UFC/ml y se la mantuvo por 24 h. a 28°C. El halo claro alrededor de la colonia indicó la reacción positiva.

En todas las pruebas se midió la distancia expresada en mm entre el borde de la colonia y el límite del halo hidrolizado.

3.4. EVALUACIÓN *in vitro* DE LA INTERACCIÓN DE MEZCLAS DE CEPAS PROBIOTICAS

Para determinar la interacción de las cepas, se evaluaron en total seis combinaciones de dos cepas, cuatro combinaciones de tres cepas y una combinación de cuatro cepas, para observar inhibición ó tolerancia entre ellas.

La preparación consistió en sembrar las cepas individualmente considerando su fase exponencial en LB 2% NaCl para obtener una concentración base de 10^5 UFC/ml de cada

cepa. Para medir la concentración bacteriana requerida, se utilizó un espectrofotómetro JENWAY 6400[®] a una longitud de onda de 550 nm. La cantidad de UFC/ml se registró multiplicando el valor obtenido por espectrofotometría con el número de colonias de cada cepa, establecido por Gullian (2001).

Una vez obtenida la concentración deseada para cada cepa, se procedió a realizar las mezclas para observar interacción entre ellas, agregando 1 ml de cada cepa en tubos de 10 ml con Caldo LB 2% NaCl, manteniéndolas por 5 horas y media, a 28 °C en constante movimiento.

Para realizar la siembra y el posterior conteo de las UFC se utilizó Agar Mueller Hinton (AMH) (DIFCO[®]) al 2% CNa, ya que este agar permitió establecer diferencias morfológicas entre las cepas. En cada mezcla se realizaron diluciones con solución salina al 2% CNa. Se sembró 100 ul de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} . Luego, las cajas fueron incubadas durante 8 horas a 30 °C, antes de iniciar el conteo de las colonias. Cada mezcla se realizó por duplicado.

Se escogieron las mezclas en que las cepas utilizadas no produjeron inhibición entre ellas o aquellas en que la inhibición fue hasta el 25% como máximo.

Cuando se presentó una inhibición mayor al 25% en las mezclas, se procedió a probar concentraciones de 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC/ml de la cepa inhibida con una concentración de 1×10^5 UFC/ml de la cepa dominante.

En base a los resultados obtenidos en la mezcla de dos cepas, se procedió a realizar la mezcla de tres y cuatro cepas, manteniéndose el mismo criterio de selección.

3.5. EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO INHIBIDOR DE MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIBRIOS PATÓGENOS.

Se utilizó las mezclas probióticas que presentaron iguales proporciones en la mezcla y las cepas E22, S2 y PA2 como agentes patógenos. La concentración final de las mezclas utilizadas fue de 1×10^5 UFC/ml.

Para la preparación de las cepas patógenas (E22, S2 y PA2), se partió de una siembra en agar TSA, incubada por 8 horas a 30 °C. Una colonia de cada cepa patógena fue replicada en 10 ml de Caldo LB al 2% CINA, incubándose por 6 horas a 28 °C, en baño maría y agitación continua. La concentración de E22, S2 y PA2 utilizada fue de 1×10^6 UFC/ml.

Con el fin de determinar el efecto probiótico de las mezclas, se empleo una adaptación de la técnica descrita por Gomez (1998).

La técnica consistió en sembrar 1 ml de cada mezcla con 1 ml del patógeno correspondiente en tubos con 10 ml de Caldo LB 2% CINA, manteniéndolas por 5 horas y media a 28 °C en constante movimiento.

Para realizar el conteo de las UFC se utilizó AMH al 2% CINA. Se sembró 100 µl de cada mezclas utilizando diluciones 10^{-3} a 10^{-5} UFC/ml en las cajas, que posteriormente fueron mantenidas en una incubadora a 30 °C. La lectura se realizó después de 8 horas.

3.6. EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS EN JUVENILES *L. vannamei*.

El objetivo del bioensayo fue determinar el efecto de las mezclas sobre el crecimiento y supervivencia de los juveniles *L. vannamei*, inoculando las mezclas probióticas mediante el suministro del alimento. Las mezclas seleccionadas, fueron aquellas que presentaron mayor inhibición del crecimiento de las cepas patógenas E22, S2 y PA2 en las pruebas *in vitro*. El estado de salud de los camarones se determinó por histología luego de la colonización.

3.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS

Se realizó un cultivo de 8 horas en agar TSA 2% NaCl, utilizando el método de rayado. Se repicó una colonia en 10 ml de caldo de cultivo LB 2% NaCl, incubándose durante el tiempo requerido en la fase de crecimiento exponencial de cada bacteria, establecidas por Gullian (2001). Se determinó la concentración y proporción, basándose en los datos por espectrofotometría e interacción (ítem 3.4) respectivamente. Se ajustó la dosis de inóculo en el alimento a una concentración final de 1×10^8 UFC/ml.

3.6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental utilizado en éste trabajo fue completamente aleatorio, ya que los tratamientos fueron asignados al azar de tal forma que cada unidad experimental tuvo la misma oportunidad de recibir cualquiera de los tratamientos.

El número de tratamientos fue 4 (P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili y control sin bacterias) con 5 réplicas. Cada tratamiento presentó una densidad de 50 animales con un peso promedio de 1.38 ± 0.1 g en tanques de 250 l de capacidad. Se alimentó al 6% de la biomasa con un recambio del 50% del agua (08:00 AM) diariamente.

La aplicación de las mezclas fue a través del alimento $360 \mu\text{l/g}$, utilizando una concentración 1×10^8 UFC/ml, reportándose 3.6×10^7 UFC/ml en cada gramo de alimento. La frecuencia de aplicación fue de 2 veces al día (02:00 PM y 08:00 PM) durante 45 días.

Para determinar el estado de salud de los animales y porcentaje de colonización del probiótico, se realizaron análisis microbiológicos, histológicos e inmunitarios, al final del ensayo.

3.6.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se sembró macerados de hepatopáncreas en AMH 2% CINA, las diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se analizó una mezcla de 5 animales por réplica de cada tratamiento.

3.6.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Se analizaron 5 animales por réplica de cada tratamiento. Se utilizó la metodología descrita por Lightner (1998).

3.6.5. TÉCNICAS INMUNITARIAS

Las pruebas inmunitarias utilizadas para evaluar el efecto estimulante de las mezclas probióticas fueron: determinación de hemogramas, cuantificación de la actividad PO y estimación de la actividad antimicrobiana del plasma.

3.6.5.1. Hemograma

Con el propósito de facilitar el conteo en caso de que existan muchos hemocitos en la muestra, mantenerlos con un buen aspecto morfológico y evitar la agregación celular, se diluyó 10 μ l de hemolinfa total en 10 μ l de formaldehído al 10%.

Protocolo descrito por Muñoz (1996):

Se colocaron 10 μ l de la muestra tratada con formaldehído en el hemocitómetro (Cámara de Neubauer, Erma), y se determinó el número y los tipos hemocitarios en un microscopio óptico, provisto de un dispositivo de contraste de fases (Olympus BH2, objetivo A20 PL). Se estimaron los conteos de acuerdo al número de hemocitos/ml que existían en la muestra de hemolinfa.

3.6.5.2. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)

Para la realización de esta prueba se empleó el protocolo modificado por Echeverría (1998).

1. La muestra de hemolinfa fue centrifugada a 3000 rpm. durante 12 min., obteniéndose un precipitado de hemocitos. Los hemocitos se resuspendieron cuidadosamente en Acido cacodílico 10 mM (tampón Cac), utilizando un volumen equivalente al inicial de hemolinfa.
2. Los hemocitos fueron centrifugados a 13.000 rpm. por 3 min. Se recuperó el sobrenadante y se descartó el precipitado conteniendo los restos celulares.
3. Se llenó la placa con 50 µl de muestra correspondiente a una concentración de 500.000 hemocitos/hoyo diluidos en Cac 10 mM.
4. Se colocó el estimulante en dos pozos: laminarina (2 mg/ml). Con solución tampón Cac 10 mM conteniendo 20 mM de calcio.
5. Se incubó por 70 minutos en oscuridad., luego se añadió 50 µl de L-Dopa (L - 3.4 - Dihydroxyphenyl - Alanine ,3mg/ ml) disuelto en Cac 10 mM como sustrato. Se incubó en oscuridad por 10 minutos más.
6. Se realizó la lectura en el lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

3.6.5.3. Actividad antibacteriana

La prueba se basó en detectar y cuantificar por medio del método turbidométrico (Tapia, 1996) el crecimiento de suspensiones bacterianas en presencia o ausencia de plasma de camarón. Los resultados fueron expresados en porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano, relacionando el valor de DO obtenido en presencia del plasma frente al control negativo constituido por las mezclas probióticas mantenidas en solución salina.

Procedimiento:

4. Se cultivó la bacteria *Escherichia coli* en medio líquido LB toda la noche a 37 °C.
5. Se repicó 200µl de la bacteria cultivada en 20 ml de medio líquido LB. Se mantuvo en agitación constante y temperatura ambiente por 4 horas a 37°C.
6. Se llenó la placa microelisa con 10 µl de muestra de plasma por pozo.

7. Se colocó las bacterias a una concentración de 4×10^7 UFC/ml para *Escherichia coli*.
8. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se efectuó la primera lectura.
9. Se realizó la lectura en las 8 horas posteriores a la incubación a 37°C para *E. coli* en el lector de microplacas a una D.O. 540 nm.

3.7. EVALUACIÓN *in vivo* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE LAS MEZCLAS ENFRENTANDO LOS JUVENILES *L. vannamei* A UNA PRUEBA DE DESAFÍO CON *V. harveyi*.

Posterior a la fase de evaluación *in vivo* de las mezclas probióticas, los juveniles *L. vannamei* fueron sometidos a una prueba de desafío con *V. harveyi*. El tiempo de exposición fue de 96 horas, utilizando una concentración de 1×10^8 UFC/ml e inoculando la bacteria por inmersión a las 08:00 PM de cada día.

Los tratamientos P63- Ili, P62-P64, P63-P62-Ili y control sin bacterias tuvieron cinco réplicas. Cada tratamiento presentó una densidad de 20 animales en acuarios con 20 l de agua. Se alimentó al 6% de la biomasa con un recambio del 50% del agua (08:00 AM) diariamente.

3.7.1. ESTADO DE SALUD DE LOS ANIMALES

Para determinar el estado de salud de los animales, se realizó análisis microbiológico, luego de 24 horas de la última inoculación de las cepas patógenas.

3.7.1.1. Análisis microbiológico

Se sembró macerados de hepatopáncreas en AMH 2% C1Na, las diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se analizó una mezcla de 5 animales por réplica de cada tratamiento.

3.8. EVALUACIÓN *in vivo* DEL EFECTO PROBIÓTICO DE LAS MEZCLAS ENFRENTANDO LOS JUVENILES *L. vannamei* A UNA PRUEBA DE DESAFÍO CON EL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSV)

Los juveniles *L. vannamei* mantenidos con probióticos (57 días) fueron sometidos a una prueba de desafío con WSV. La aplicación del virus fue mediante el suministro de papilla infectada proporcionada por el Departamento de Virología (CENAIM), suministrando el alimento al 6% de la biomasa por acuario.

Los tratamientos Ili-P63, P64-P62, Ili-P63-P62 y control sin bacterias tuvieron siete réplicas. Cada tratamiento presentó una densidad de 13 animales en acuarios con 20 l de agua. Se consideró una sola aplicación del virus para observar el efecto de las mezclas probióticas en infecciones de menor grado.

El tiempo de duración del ensayo fue de cuatro días posterior a la infección. Se evaluó supervivencia de los tratamientos al final del tiempo de exposición.

Al inicio y al final del ensayo los animales fueron analizados por PCR, Kit de Kimura, *et al.* (1996) utilizándose las branquias de los animales para el diagnóstico.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos durante la realización de los biensayos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% bajo principios de normalidad y homogeneidad de varianza. Una vez que se verificaron diferencias significativas ($P < 0.05$) los datos fueron analizados por la prueba de Fisher (Least Significant Difference, LSD) para contrastes entre tratamientos. Se utilizó los paquetes estadísticos Data Desk® (6.1, Ithaca EU, 1997) y Statistica (StatSoft, EU, 1994).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

En la selección de cepas probióticas se debe considerar la capacidad de mejorar la nutrición del hospedero a través del suministro de enzimas esenciales, las cuales ayudarán a incrementar la eficiencia digestiva de los animales (algas, rotíferos, artemia, etc). Por esta razón se realizaron estudios *in vitro*, para evaluar la producción de enzimas que hidrolicen ciertos nutrientes por parte de las cepas probióticas. La técnica descrita por Wang *et al.* (1996) permitió medir la distancia de los halos hidrolizados, por la actividad enzimática de las cepas en estudio.

Enzimas	P62	P63	P64	Ili
Lipasa	4.0	7.0	4.0	6.0
Amilasa	5.0	14.0	10.0	
	9.0			
Proteasa	9.0	21.0	14.0	10.0
Caseinasa	3.0	19.0	5.0	
	7.0			

Tabla 2. Distancia (mm) del borde de la colonia hasta el límite del halo hidrolizado.

En la tabla 2, se observa la producción enzimática de cepas probióticas, donde la cepa P63 presentó mayor producción a nivel de proteasas y amilasas. Mientras que los otros vibrios P62 e Ili mantuvieron menor producción de las mismas enzimas con respecto al *Vibrio* P63. Estos resultados evidenciaron que cada cepa posee una característica individual de producción de enzimas a pesar de pertenecer al mismo género. Wang *et al.* (1996) reportaron resultados semejantes al analizar la cepa X4B-1 que posteriormente fue identificada como *Vibrio fluvialis*.

Se debe considerar que los probióticos al colonizar el tracto digestivo de la especie en cultivo, transmiten beneficios al hospedero, mediante un incremento sustancial del proceso digestivo gracias al suministro de ciertas enzimas. Intriago y Jones (1992) reportaron la presencia de una cepa de *Flexibacter* Inp3 en la dieta de *Artemia* que le sirve de alimento y además le asiste en el proceso digestivo.

Riquelme *et al.* (2000), en el cultivo de larvas *Argopecten purpuratus*, encontraron una rápida ingestión y establecimiento de las cepas *Pseudomonas sp.* y *Arthrobacter sp.* en el sistema digestivo de las larvas, sugiriendo que estas bacterias participarían en procesos de digestión de los bivalvos a través la producción de enzimas extracelulares tales como proteasas y lipasas.

Las bacterias benéficas pueden servir directamente como nutrientes al hospedero, por su composición de niveles protéicos y vitamínicos altos. Gorospe *et al.* (1996) observaron que en una cepa *Pseudomona sp.* constituía un buen suplemento alimenticio para el crecimiento y supervivencia de *Artemia*, por la presencia de altos niveles de aminoácidos esenciales.

4.2 INTERACCIÓN *in vitro* DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS

Para la selección de mezclas probióticas es necesario estudiar el comportamiento de las cepas candidatas, con el fin de observar inhibición o tolerancia entre ellas.

El presente estudio tuvo la finalidad de obtener mezclas que permiten a las cepas probióticas crecer en iguales proporciones. La evaluación se la realizó utilizando medios líquidos. A continuación se presentan los resultados obtenidos en la mezcla de dos (Tabla 3), tres (Tabla 4) y cuatro (Tabla 5) cepas.

Concentración	Total UFC/ml	% UFC±SD	% UFC±SD
1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ Ili ^a	4.50x10 ⁷	41.94±2.30 P64	58.06±2.30 Ili
1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ P64 ^a	8.25x10 ⁷	55.15±5.93 P63	44.85±5.93 P64
1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili ^a	1.34x10 ⁸	40.20±1.10 P63	59.80±1.10 Ili
1x10 ⁶ P63 - 1x10 ⁵ Ili	1.10x10 ⁸	89.62±2.34 P63	10.38±2.34 Ili
2.5x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili	8.33x10 ⁷	61.24±2.30 P63	38.76±2.30 Ili
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P64	2.71x10 ⁷	19.80±3.37 P62	80.20±3.37 P64
5x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P64 ^a	5.24x10 ⁷	44.60±5.23 P62	55.40±5.23 P64
1x10 ⁶ P62 - 1x10 ⁵ P64	8.00x10 ⁷	78.80±1.62 P62	21.20±1.62 P64
1x10 ⁷ P62 - 1x10 ⁵ P64	2.79x10 ⁷	91.92±3.76 P62	8.08±3.76 P64
1x10 ⁸ P62 - 1x10 ⁵ P64	4.50x10 ⁷	98.80±0.35 P62	1.20±0.35 P64
1x10 ⁸ P62- 1x10 ⁵ P64	5.72x10 ⁷	99.92±0.05 P62	0.08±0.05 P64
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ Ili	5.45x10 ⁷	10.32±2.15 P62	89.68±2.15 Ili
1x10 ⁶ P62 - 1x10 ⁵ Ili	5.83x10 ⁷	63.46±2.69 P62	36.54±2.69 Ili
1x10 ⁷ P62 - 1x10 ⁵ Ili	6.57x10 ⁷	91.32±1.31 P62	8.68±1.31 Ili
1x10 ⁸ P62 - 1x10 ⁵ Ili	7.68x10 ⁷	97.38±0.28 P62	2.62±0.28 Ili
7x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ Ili ^a	5.72x10 ⁷	40.80±4.86 P62	59.20±4.86 Ili
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63	6.92x10 ⁷	16.94±1.45 P62	83.06±1.45 P63
1x10 ⁶ P62 - 1x10 ⁵ P63	1.35x10 ⁸	78.81±1.47 P62	21.19±1.47 P63
5x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63	8.26x10 ⁷	45.72±1.73 P62	54.28±1.73 P63
7x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 ^a	6.81x10 ⁷	64.66±4.89 P62	35.34±4.89 P63

^a Mezclas seleccionadas.

Tabla 3. UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezclas de dos cepas.

Concentración	Total UFC/ml	%UFC±SD	% UFC±SD	% UFC±SD
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili	4.80x10 ⁷	33.47±3.05 P62	26.07±0.81 P63	40.46±3.84 Ili
4x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 - 6x10 ⁵ Ili	1.18x10 ⁸	19.06±1.41 P62	7.06±0.79 P63	73.87±1.41 Ili
4x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 - 5x10 ⁵ Ili	7.91x10 ⁷	32.86±2.03 P62	6.32±0.68 P63	58.20±2.70 Ili
1x10 ⁵ P62 - 1.5x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili ^a	4.11x10 ⁷	27.58±0.23 P62	40.47±0.29 P63	31.95±0.49 Ili
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ Ili	3.13x10 ⁷	28.70±2.17 P62	5.20±0.36 P64	66.11±2.27 Ili
1x10 ⁵ P62 - 7x10 ⁵ P64 - 2x10 ⁵ Ili	1.27x10 ⁷	19.69±0.07 P62	36.61±0.94 P64	43.70±0.87 Ili
1x10 ⁵ P62 - 5x10 ⁵ P64 - 2x10 ⁵ Ili	3.80x10 ⁷	14.35±1.78 P62	35.22±1.95 P64	50.43±3.08 Ili
1x10 ⁵ P62 - 7x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ Ili ^a	4.45x10 ⁷	21.86±0.34 P62	37.87±0.31 P64	40.27±0.30 Ili
1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ P62	7.80x10 ⁷	12.76±1.39 P64	59.36±3.17 P63	27.88±2.30 P62
1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 2x10 ⁵ P62	8.18x10 ⁷	13.82±1.42 P64	53.33±2.50 P63	32.84±3.21 P62
2x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 2x10 ⁵ P62 ^a	6.81x10 ⁷	30.57±3.92 P64	45.44±3.56 P63	23.99±1.44 P62
1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili	1.47x10 ⁸	15.42±1.24 P64	34.47±1.20 P63	50.11±0.24 Ili
2x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili	2.18x10 ⁸	18.21±1.06 P64	45.82±0.87 P63	35.97±1.87 Ili
3x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ Ili ^a	8.68x10 ⁷	22.77±3.71 P64	48.13±4.95 P63	29.11±3.33 Ili

^a Mezclas seleccionadas.

Tabla 4. UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezcla de tres cepas.

Concentración	Total UFC/ml	% UFC P62±SD	% UFC P63±SD	% UFC P64±SD	% UFC Ili±SD
1x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 - 1x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ Ili	6.47x10 ⁷	17.32±1.44	53.11±1.32	3.48±0.57	26.09±1.88
1.5x10 ⁵ P62 - 1x10 ⁵ P63 - 6x10 ⁵ P64 - 1x10 ⁵ Ili	7.25x10 ⁷	32.59±2.17	23.17±1.11	16.03±1.61	28.21±1.69

2×10^5 P62 - 1×10^5 P63 - 8×10^5 P64 - 1×10^5 Ili ^a	8.02×10^7	24.64±1.77	20.34±2.88	29.07±1.58	25.95±2.22
--	--------------------	------------	------------	------------	------------

^a Mezcla seleccionada.

Tabla 5. UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezcla de cuatro cepas.

Los resultados de las mezclas de dos cepas, presentaron porcentajes dentro de los rangos establecidos para cada mezcla, al presentarse en iguales concentraciones las cepas P64-Ili, P63-P64 y P63-Ili.

Los datos obtenidos demostraron que la cepa P62 es inhibida por la cepa P63, P64 e Ili al formar una mezcla de dos cepas. Siendo necesario establecer la participación de estas 3 cepas en las mezclas con P62 a una concentración de 7×10^5 , 7×10^5 , 5×10^5 respectivamente, para mantener las proporciones.

En mezclas de tres cepas, la cepa Ili influyó sobre el crecimiento de las cepa P62, P63 y P64, estableciéndose que las cepas P63 y P64 son mas sensibles por la concentración presente de Ili.

Mientras al combinarse la cepa P63 con P64 y P62, se observó mayor crecimiento de P63 en la mezcla de iguales proporciones.

En mezclas de cuatro cepas, la cepa Ili y P63 mantuvieron su capacidad de inhibición sobre las otras dos cepas, observándose que al aumentar la concentración de la cepas P62 y P64, la cepa P63 fue la que presentó variación en la mezcla de cuatro cepas.

Es importante mencionar que el suministro de proporciones adecuadas en las mezclas probióticas en los tanques de cultivo permiten mejorar la producción. Douillet (2000), estudió el comportamiento individual de cepas probióticas para desarrollar mezclas que permitieron incrementar la producción de rotíferos.

4.3. EFECTO INHIBIDOR *in vitro* DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIBRIOS PATÓGENOS

Las mezclas que presentaron proporciones adecuadas, fueron sometidas a una prueba de inhibición *in vitro* con *Vibrios sp.* patógenos. La adaptación de la técnica descrita por Gomez (1998) permitió conocer el porcentaje de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de cepas patógenas E22, S2 y PA2.

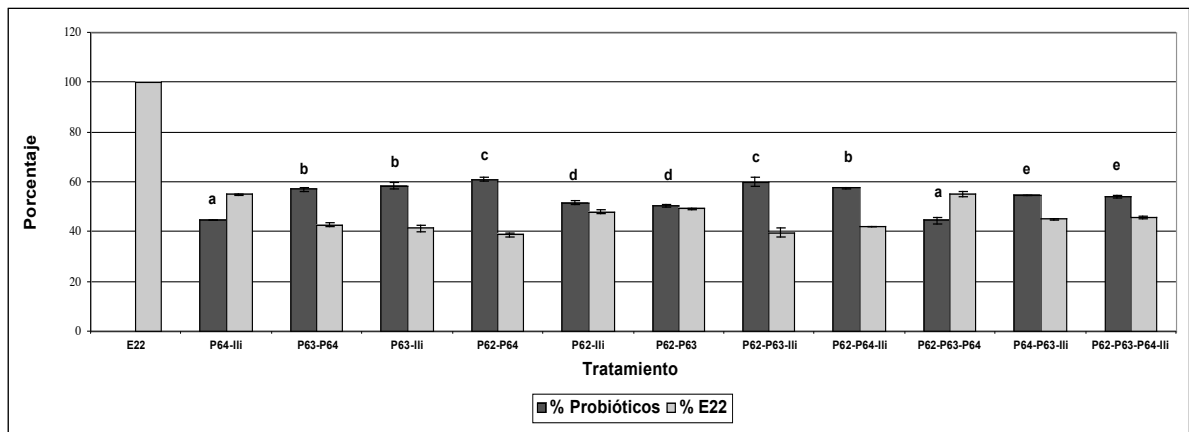


Figura 2. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de E22.

Esta evaluación *in vitro* permitió determinar el efecto antagónico de las mezclas sobre el crecimiento de E22 (Figura 2). Las mezclas bacterianas, reportaron porcentajes de inhibición mayores al 50%, a excepción de P64-III y P62-P63-P64 que presentaron un efecto menor, reduciendo el crecimiento de E22 en un 44%. Las mezclas P62-P64 y P62-P63-III presentaron porcentajes de inhibición significativamente mayores ($p < 0.05$) entre las mezclas que lograron inhibir a la cepa patógena.

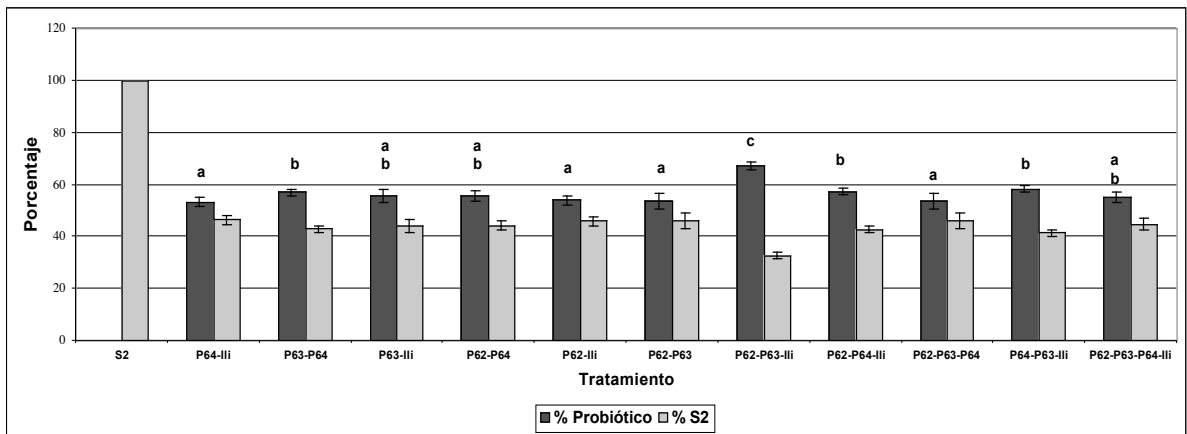


Figura 3. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de S₂.

Todas las mezclas bacterianas lograron inhibir a la cepa S₂ en porcentajes mayores al 50% (Figura 3). Las mezclas P63-P64, P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili, P62-P64-Ili y P64-P63-Ili presentaron superiores porcentajes de inhibición, sin embargo la mezcla P62-P63-Ili registró diferencias significativamente mayores ($p < 0.05$) entre las mezclas.

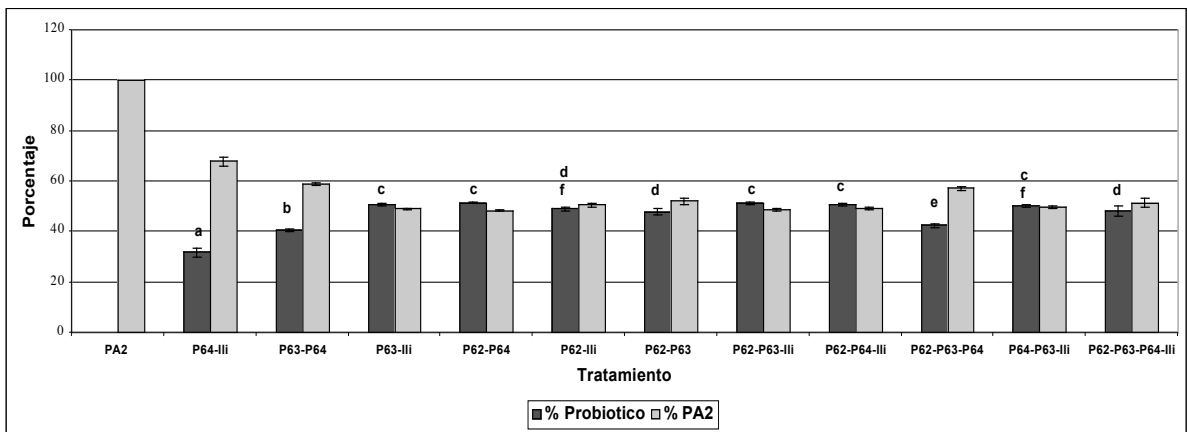


Figura 4. Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de PA₂.

En la evaluación con PA₂, para observar la capacidad de inhibición de las mezclas, los resultados demostraron un efecto de inhibición mayor al 50% en las mezclas P63-Ili, P62-

P64, P62-P63-Ili, P62-P64-Ili y P64-P63-Ili (Figura 4). No se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las mezclas que lograron inhibir al patógeno PA2.

Las mezclas P64-Ili, P63-P64, P62-Ili, P62-P63, P62-P63-P64 y P62-P63-P64-Ili presentaron un efecto menor al 50% de inhibición sobre el crecimiento de PA2, por lo cual fueron descartadas para pruebas posteriores.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones *in vitro* con E22, S2 y PA2, las mezclas P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili, presentaron mayor capacidad de inhibición sobre el crecimiento de *Vibrios sp.* patógenos.

Las bacterias por naturaleza presentan mecanismos antagónicos que les permite subsistir en determinados ecosistemas. Así, varios investigadores en pruebas *in vitro* han utilizado la propiedad antagónica para la selección de cepas candidatas. Dopazo *et al.* (1988) utilizando medios líquidos, observó que una bacteria marina cepa FP6 inhibió el crecimiento de cepas patógenas *A. hydrophila* B-32, *A. salmonicida* ATCC 14174 y *V. anguillarum* R-82 por la producción de una sustancia antibiótica.

Chythanya *et al.* (2002) encontraron una bacteria marina *Pseudomonas* I-2, que produce una sustancia de bajo peso molecular, estable al calor, soluble al cloroformo y resistente a enzimas proteolíticas que inhibe el crecimiento de vibrios (*V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *V. vulnificus*) patógenos en camarones .

La inhibición encontrada en las mezclas con el patógeno, puede ser producto de sustancias antibióticas de las cepas probióticas o por competencia de nutrientes en el medio.

4.4. EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS EN JUVENILES *L. vannamei*

La permanencia del probiótico en el hospedero es un mecanismo complejo que involucra diversos factores como capacidad de adhesión de las bacterias, producción de sustancias que antagonicen con la flora endógena para fomentar su proliferación y resistencia a mecanismos fisiológicos del animal. Además, Skjermo y Vadstein (1999) señalan que las bacterias tienen especificidad de lugares para su establecimiento.

En esta evaluación se utilizó las mezclas probióticas que presentaron mayor capacidad de inhibición de cepas patógenas *in vitro*. Se utilizó un control negativo sin probióticos. En el número total de UFC/g de hepatopáncreas (HP) no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los animales inoculados con las mezclas con respecto al control. Además los animales inoculados con la mezcla P62-P64 tuvieron un porcentaje de colonización significativamente mayor ($p < 0.05$) que los inoculados con P62-P63-Ili y P63-Ili. Los porcentajes de colonización y los valores medios de concentración bacteriana alcanzados por cada mezcla, están representados en la figura 5.

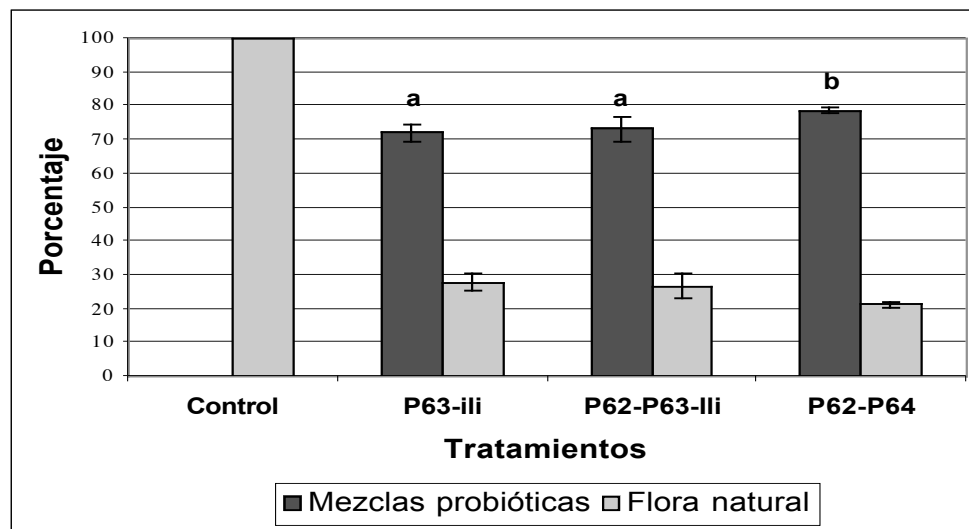


Figura 5. Porcentajes de colonización de las mezclas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili.

Las mezclas probióticas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili obtuvieron porcentajes de colonización por encima del 70%. Por su alta capacidad colonizadora éstas mezclas fueron sometidas a una prueba de desafío con *Vibrio* sp. patógenos.

En pruebas experimentales en juveniles *L. vannamei*, Gullian (2001) observó que las cepas *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64 individualmente, presentaron porcentajes de colonización por encima del 50%. Sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo indicaron que las mezclas presentan una mayor capacidad de colonización que cuando se administran individualmente con respecto a los porcentajes obtenidos por Gullian (2001). Posiblemente este incremento está relacionado con la forma de aplicación del probiótico (mediante el alimento) o de acuerdo con Douillet (2000) las mezclas probióticas presentaron una mayor eficiencia por procesos sinérgicos en el hospedero.

4.4.1 SUPERVIVENCIA

En la prueba *in vivo* los valores de supervivencia fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en los animales que se les suministro alimento con las mezclas P62-P63-Ili y P63-Ili con respecto a la mezcla P62-P64 y control. Los porcentajes de supervivencia están representados en la figura 6.

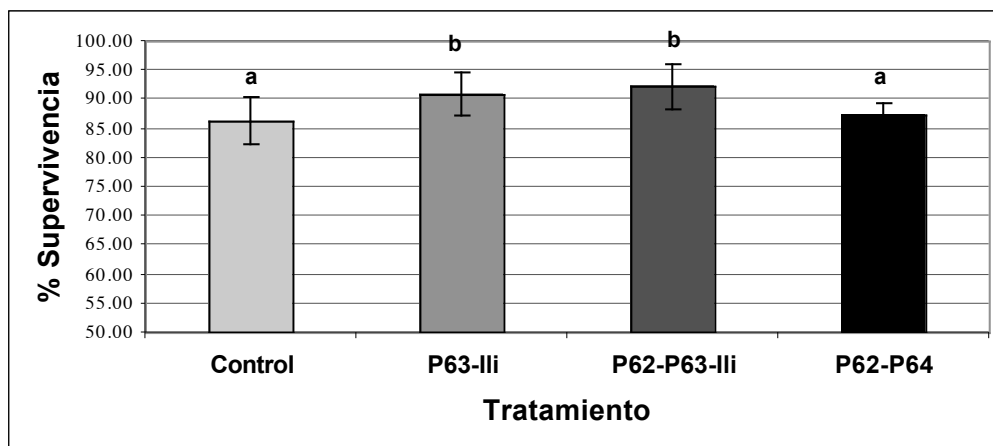


Figura 6. Porcentaje de animales supervivientes, después de 45 días de aplicación con mezclas probióticas mediante alimento.

Los porcentajes de supervivencia en el tratamiento P62-P64, no registró diferencias significativas ($p>0.05$) con respecto al control.

Estos resultados fueron encontrados por Moriarty (1998), Rengpipat *et al.* (1998), Gatesoupe (1999) y Phianphak (1999), quienes concluyeron que los probióticos ejercen mecanismos de protección a los animales, influenciados por la producción de sustancias microbicidas o incremento de la respuesta inmune que permiten mejorar la supervivencia y el crecimiento.

El análisis histológico demostró que las mezclas P62-P63-Ili y P63-Ili no afectan el estado de salud de los camarones, sin embargo los animales inoculados con la mezcla P62-P64 presentaron necrosis intestinal, al parecer por la presencia de P64.

4.4.2 INCREMENTO DE PESO

Se registró el peso de los camarones al inicio y final del período experimental, determinándose que el peso promedio de los animales con mezclas probióticas fue significativamente mayor con respecto al control no tratado. Los resultados de incremento de peso, no registraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos con probióticos (Figura 7).

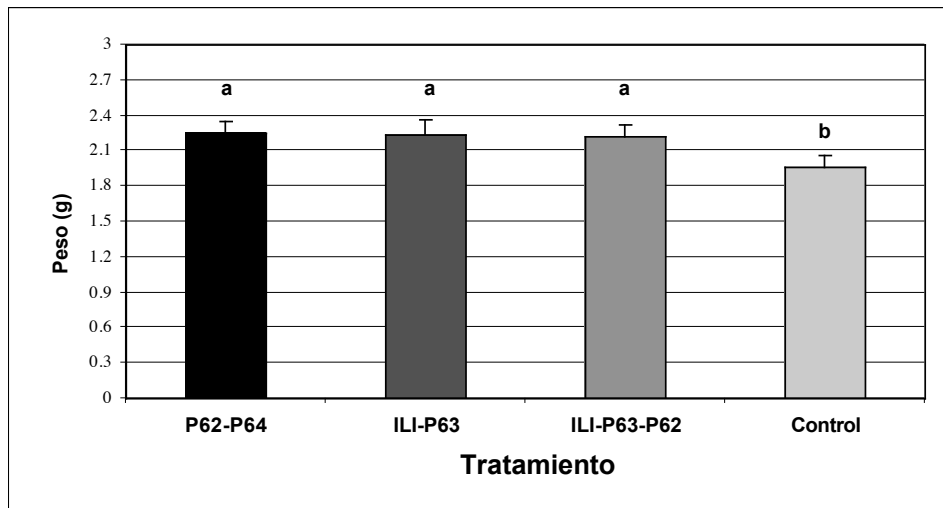


Figura 7. Peso promedio alcanzado por los juveniles *L. vannamei*, luego de 45 días de aplicación de las mezclas mediante el alimento.

Gullian (2001) reportó resultados similares en juveniles *L. vannamei* con la utilización de las cepas *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (cepa Ili) como probióticos, encontrando diferencias significativas en crecimiento ($p < 0.05$) respecto al control después de 20 días de ensayo.

Garriques y Arévalo (1995) en larvicultura de *P. vannamei*, reportaron mayor peso promedio en los animales tratados con probióticos (7.8 mg) con respecto al control (7.1 mg).

En Tailandia, Rengpipat *et al.* (1998) en un cultivo de *P. monodon* utilizaron cepas de *Bacillus* (S11) durante 100 días, administrándolas independientemente como células frescas, células en solución salina normal y liofilizadas como probiótico en el alimento, no encontrando diferencias significativas en crecimiento ($p > 0.05$) entre los tratamiento con probióticos, pero sí encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos tratamiento y el control. Además, la supervivencia después de 100 días fue

significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo tratamiento comparado con el grupo control. Rengpipat *et al.* (2000) reportaron resultados similares en cultivos de camarón *P. monodon*, encontrando mayor supervivencia en camarones tratados con probióticos por 90 días con *Bacillus* (S11), que el control.

El incremento de peso observado en los animales cuando se les ha suministrado probióticos puede estar influenciado de manera directa si son utilizados como fuente de alimento o indirectamente como productores de enzimas o vitaminas. Hood (1974) señala que la microflora endógena en los camarones está involucrada en la absorción de partículas alimenticias que ayudan al crecimiento. Sin embargo, Fuller (1989) señala que varios factores influyen en los resultados obtenidos con los probióticos, por que se desconoce el mecanismo exacto por el cual operan y además los resultados están sujetos a variabilidad bajo diferentes condiciones.

4.4.3. EVALUACIÓN INMUNITARIA

4.4.3.1. Hemograma

Los resultados de los hemogramas se muestran en la figura 8. No se registraron diferencias significativas para el conteo total de hemocitos entre los tratamientos. El valor medio alcanzado fue 1.95×10^7 hemocitos/ml de plasma. El porcentaje de células H, G y SG no registró diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 9).

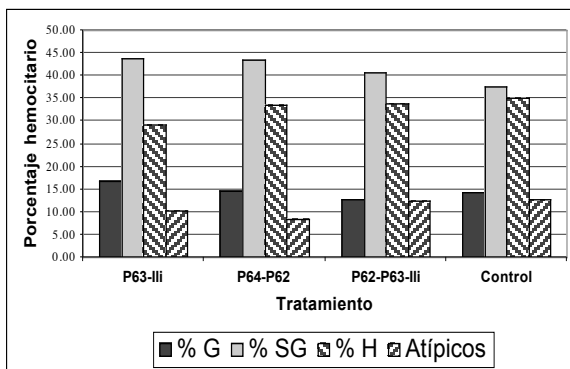
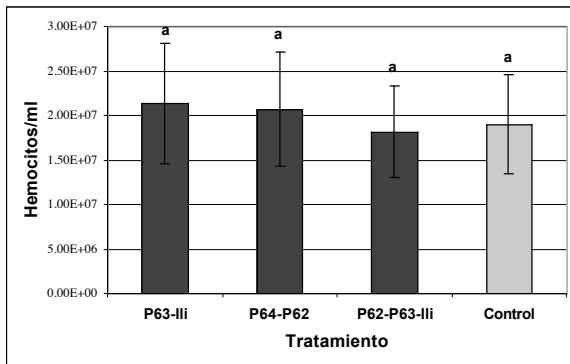


Figura 8. Conteo total de células plasmáticas en los, tratamientos y control, expresados en H/ml

Figura 9. Porcentaje de hemocitos. Donde: G (granulosos), SG (semigranulosos), H (hialinos), A (atípicos).

Gullian (2001) realizando ensayos inmunitarios, con estas cepas probióticas en camarones juveniles *L. vannamei*, no encontró diferencias significativas en el porcentaje de hemocitos G entre los tratamientos *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y en el control *V. alginolyticus* (Ili). Sin embargo, encontró un incremento significativo en la población de células hialinas.

La utilización de estas cepas en mezclas durante una exposición prolongada de 45 días, no mostró diferencias significativas con el control posiblemente, el sistema inmunitario se ha adaptado a la presencia de estas bacterias. Es decir el sistema inmunitario estimuló la producción de hemocitos durante las primeras semanas, para luego llegar a un nivel de equilibrio en la producción de hemocitos.

4.4.3.2. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)

En la prueba *in vivo* los valores de fenoloxidasa fueron significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales del tratamiento P62-P64 con respecto al tratamiento P63-Ili. Sin embargo, P62-P64 no registró diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto al control. (Figura 10).

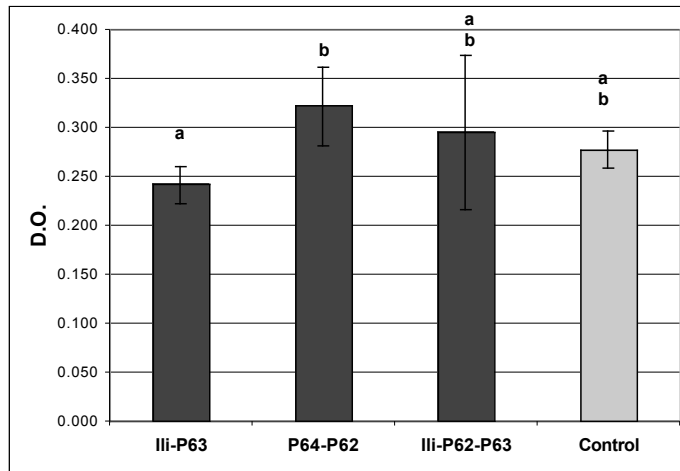


Figura 10. Densidad óptica relacionada con la estimulación de actividad fenoloxidasa producida por las mezclas P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili.

Gullian (2001), encontró después de 10 días de aplicación con cepas probióticas, valores de actividad fenoloxidasa significativamente más altos ($p < 0.05$) en los animales estimulados con *Bacillus* P64, *Vibrio* P62 y *V. alginolyticus* (Ili) que en el control.

Los resultados indican que la bacteria P64 en las mezclas presenta mayor estimulación en la actividad PO que Ili y P63.

4.4.3.1. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (A.A)

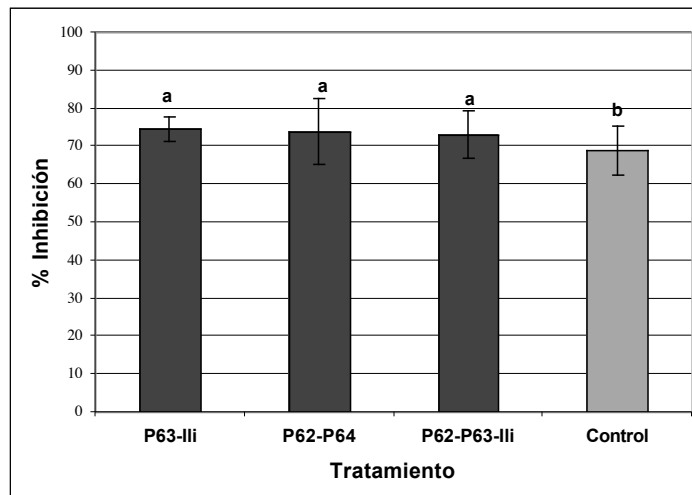


Figura 11. Porcentaje de la actividad antibacteriana del plasma de los tratamientos.

El ensayo establecido por Tapia (1996), nos permitió evaluar la actividad antibacteriana de las muestras de plasma de animales tratados con mezclas probióticas durante 45 días, se utilizó el plasma de los animales sin tratamiento con probióticos como control.

La actividad antibacteriana en los tratamientos con mezclas probióticas presentó diferencias significativamente mayores ($p < 0.05$) respecto al control. No se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos.

Gullian (2001) utilizando cepas probióticas Ili, P64 y P62 en la cuantificación de la actividad antibacteriana, reportó porcentajes bajos de inhibición entre los tratamientos y el control. Además, Sotomayor (2000) utilizando como control la cepa Ili en una prueba experimental, reportó que ésta cepa desarrolla niveles bajos de inhibición de la actividad antibacteriana del plasma de camarón.

Sin embargo, los porcentajes de inhibición registrados, demuestran una mayor actividad antibacteriana al parecer por la presencia de péptidos antimicrobianos en los tratamientos con mezclas probióticas. Destoumieux *et al.* (2000), reportaron la presencia de peneidinas,

las cuales contribuirían en la eliminación de microorganismos durante el proceso de fagocitosis en camarones *L. vannamei*.

4.5. EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS DESAFIANDO JUVENILES *L. vannamei* CON *V. harveyi*.

Las mezclas probióticas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili obtuvieron porcentajes de colonización mayores al 70%. Por su alta capacidad colonizadora éstas mezclas fueron sometidas a una prueba de desafío con una mezcla de cepas patógenas.

En este bioensayo se probó la competencia entre las mezclas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili contra *V. harveyi*. Se utilizó un control con patógenos. El diagnóstico de interacción entre probióticos-patógenos se realizó mediante microbiología. Los porcentajes de interacción y los valores medios de concentración bacteriana están representados en la figura 12 .

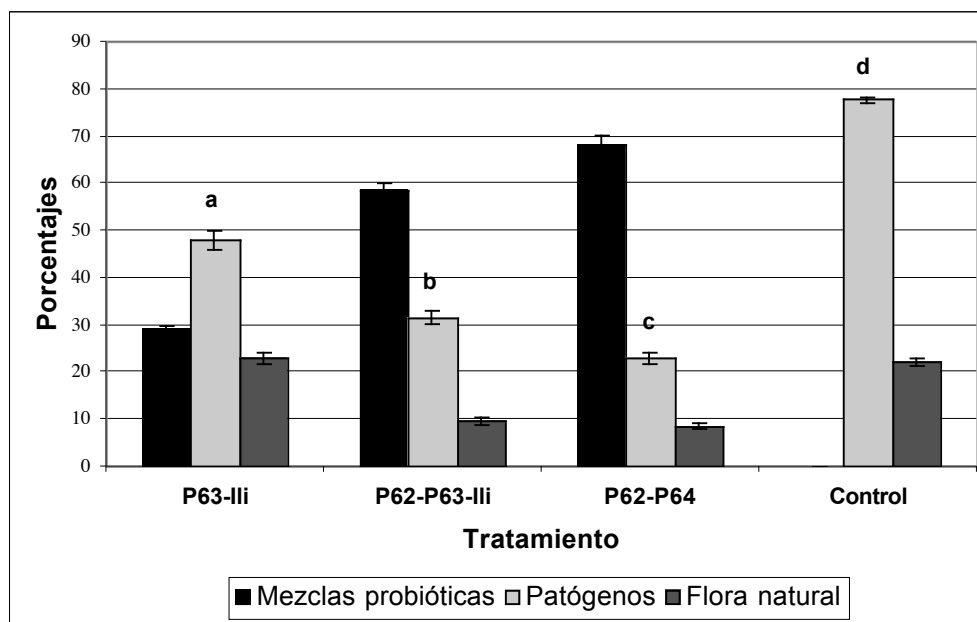


Figura 12. Interacción de las mezclas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili-contra vibrios patógenos (*V. harveyi*.)

Se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los animales tratados con las mezclas probióticas y el control patógeno, al analizar los porcentajes de colonización de *V. harveyi*.

La mezcla P62-P64 logró el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *V. harveyi*. y sobre la flora natural del HP. La mezcla , P62-P63-Ili compitió con las cepas patógenas y con la flora natural, sin embargo su capacidad de inhibir el crecimiento de *V. harveyi*. patógeno fue menor que la mezcla P62-P64. La mezcla P63-Ili presentó menor efecto de inhibición en la colonización de *V. harveyi* .

La supervivencia fue de 100% durante el período experimental en todos los tratamientos. Los análisis microbiológicos reportaron un 77.8% de las cepas positivas en el control con patógenos.

Se han realizado ensayos *in vivo* para demostrar su efecto con *Vibrios sp.* patógenos. Phianphak *et al.* (1999) reportaron el efecto probiótico de una mezcla de *Lactobacillus sp.* en camarones *P. monodon* al someterlos a una prueba de desafío por 10 días con *V. harveyi* D331, encontrando 100% de supervivencia en los grupos tratamientos y 26% de supervivencia en el grupo control.

Gullian (2001) reportó que la cepa *Vibrio* P62 mostró su efecto antagonista *in vivo* reduciendo la entrada de S2 en un 60% y desplazando la microflora autóctona. Además reportó un efecto menor en *Bacillus* P64 y *Vibrio* P63 en la exclusión de cepas patógenas en un 34% a 19% respectivamente.

Los resultados indican que la cepa P62, al participar en las mezclas, P62-P63-Ili y P62-P64 permite mayor inhibición del *V. harveyi*.

Rengpipat *et al.* (1998) en pruebas con *P. monodon*, suministrando la cepa Bacillus S11, reportaron en los tanques con probiótico con una concentración de 10^7 a 10^8 UFC/ml, bajas concentraciones de *Vibrio sp.* 10^5 UFC/ml en el agua y 10^2 UFC/ml en el intestino del camarón, con respecto al control que presentó concentraciones entre 10^5 a 10^7 UFC/ml de *Vibrios sp.* en el agua y camarón.

Moriarty (1998) en estanques de engorde de camarón *P. monodon* en Indonesia, demostró que la incorporación de *Bacillus sp.* durante 160 días de cultivo a una concentración de (10^4 a 10^5 UFC/ml) en el agua, cambió la composición de las especies bacterianas, decreciendo la proporción de *Vibrios sp.* luminiscentes mejorando la producción del cultivo.

4.5.1. Evaluación inmunitaria

4.5.1.1. Hemograma

En el conteo total de hemocitos de los tratamientos no se registraron diferencias significativas para el conteo total de hemocitos entre los tratamiento P63-Ili, P62-P63-Ili y el control (Figura 13). El tratamiento no registró diferencias significativas con el tratamiento P62-P63-Ili en el conteo total de hemocitos, sin embargo P62-P64 registró diferencias significativas menores ($p < 0.05$) con Ili-P63 y el control.

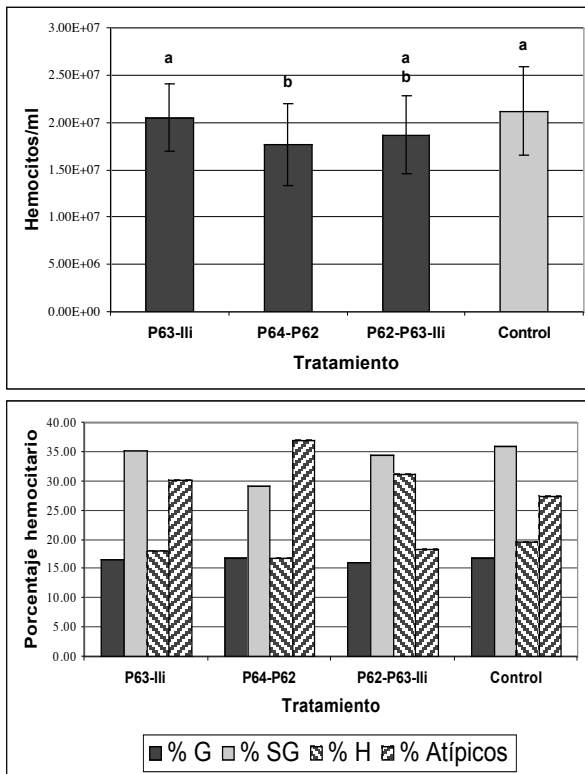


Figura 13. Conteo total de células plasmáticas en los tratamientos y control, expresados en H/ml.

Figura 14. Porcentaje de hemocitos. Donde: G (granulosos), SG (semigranulosos), H (hialinos), A (atípicos).

Con respecto al porcentaje de tipos hemocitarios, las células G, no registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Figura 14). La cantidad de células H fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los animales tratados con P62-P63-III con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento P62-P64 presentó menor porcentaje de células SG con respecto al control. Mientras los porcentajes de células atípicas fue mayor ($p > 0.05$) en el tratamiento P62-P64 respecto a los demás tratamientos, existiendo una disminución de este porcentaje en el tratamiento P62-P63-III.

Trabajos de Rengpipat *et al.* (2000) en *P. monodon* utilizando *Bacillus* S11 como probiótico en ensayos de infección con *V. harveyi*, encontraron un alto índice en la

respuesta inmunitaria, en el tratamiento con bacterias con respecto al control. Donde el índice inmunitario, número total de hemocitos disminuyó al incluirse el vibrio patógeno en todos los tratamientos. En nuestros resultados, se observó disminución de número total de hemocitos en la mezcla P62-P64, respecto las otras mezclas.

4.5.1.2. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)

Los valores de fenoloxidasa fueron significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento P62-P64 con respecto a P63-Ili. Los tratamientos P63-Ili, P62-P63-Ili y el control no registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 15).

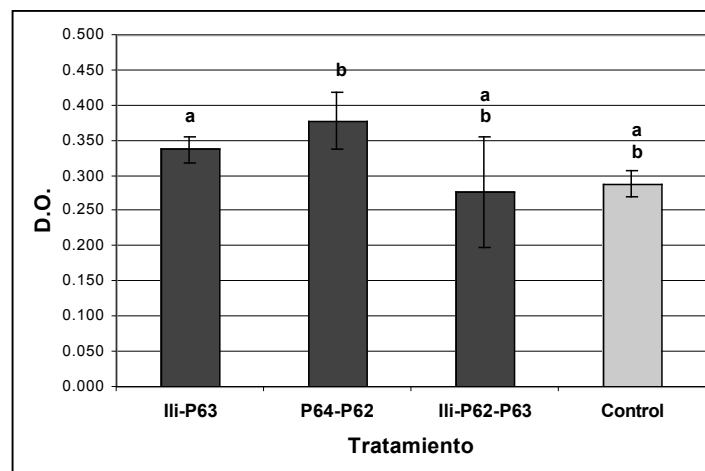


Figura 15. Valores de densidad óptica para la cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los tratamientos P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili y el control.

Comparando la respuesta inmunitaria del sistema fenoloxidasa de este ensayo con respecto a los animales estimulados por 45 días con probiótico, no se encontró diferencias entre los

tratamientos (P62-P64, P62-P63-Ili y control), pero si en la mezcla P63-Ili al incluirse el patógeno.

4.5.1.3. Cuantificación de la actividad antibacteriana del plasma (A.A)

Los valores de actividad antibacteriana, no reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos P63-Ili, P62-P63-Ili y el control. Sin embargo, P62-P64 registró diferencias significativas mayores ($p < 0.05$) con respecto a todos los tratamientos. (Figura 16).

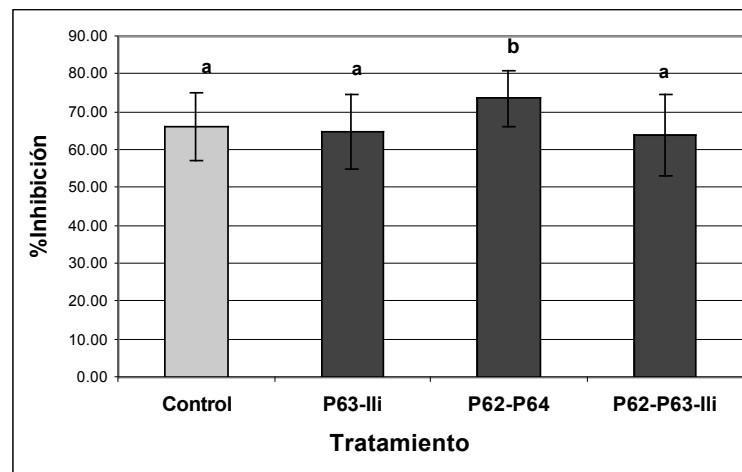


Figura 16. Porcentajes de actividad antibacteriana del plasma de los tratamientos P63-Ili, P62- P64, P62-P63-Ili y el control, al ser desafiados con vibrios patógenos.

Resultados semejantes fueron obtenidos por Rengpipat *et al.*, 2000, quienes al incluir el *V. harveyi* aumentaron la actividad antibacteriana del plasma en *P. monodon*. La mezcla P62-P64 mostró ese comportamiento, posiblemente atribuible su capacidad de inhibición observada sobre la colonización del patógeno en el hospedero.

4.6 EVALUACIÓN *in vivo* DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS ENFRENTANDO JUVENILES *L. vannamei* A UNA PRUEBA DE DESAFÍO CON VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSV)

Con la finalidad de observar “un efecto” de las mezclas probióticas en camarones juveniles, en presencia de virus, estos fueron sometidos a una prueba de desafío con WSV. Los resultados en la prueba *in vivo*, reportaron en los tratamientos diferencias significativamente mayores ($p < 0.05$) con respecto al control (Figura 17).

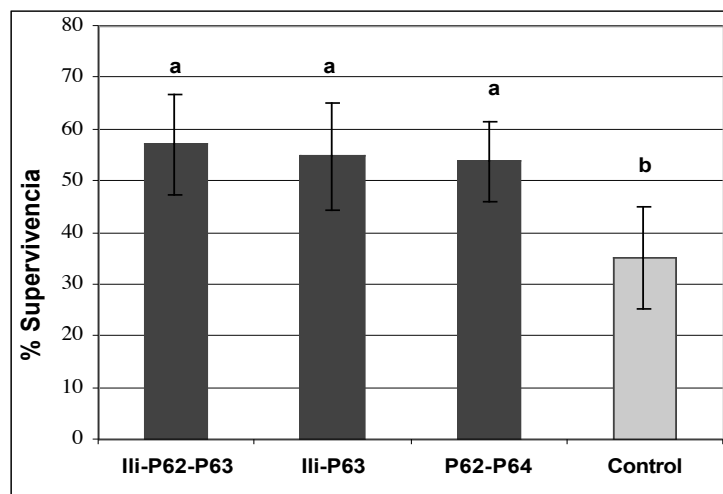


Figura 17. Porcentajes alcanzados después de 4 días de infección con WSV.

Los tratamientos reportaron una supervivencia del 55%, mientras el control reportó una supervivencia promedio del 35%. Los resultados indicarían una posible inmunoestimulación sobre los camarones, preparándolos de una manera no específica al ataque de agentes bacterianos y virales.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1.	ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR BACTERIAS EN EL CULTIVO DE CAMARÓN	2
2.1.1.	Generalidades	2
2.1.2.	Enfermedades en el Ecuador	3
2.2.	TÉCNICAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES	4
2.3.	PROBIÓTICOS	5
2.3.1.	Mecanismos de acción de los probióticos	6
2.3.2.	Selección de cepas probióticas	7
2.3.3.	Capacidad de colonización del probiótico	9
2.3.4.	Interacción y antagonismo bacteriano	9
2.4.	PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA	10
2.4.1.	Peces	12
2.4.2.	Moluscos bivalvos	12
2.4.3.	Crustáceos	13
2.4.4.	Uso de probióticos en el Ecuador	14
2.5.	LA RESPUESTA INMUNE EN LOS CRUSTÁCEOS	15
2.5.1.	Estimulación de la respuesta inmune	16
2.5.2.	Técnicas Inmunitarias	17
2.5.2.1.	Hemograma	17
2.5.2.2.	Sistema fenoloxidasa (PO)	18
2.5.2.3.	Actividad antibacteriana	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1.	LUGAR DE REALIZACIÓN	19
3.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	19
3.2.1.	Cepas probióticas	19
3.2.2.	Cepas patógenas	19

3.2.3. Manejo de las cepas bacterianas	20
3.3. ESTUDIO <i>in vitro</i> DE LAS CARACTERÍSTICAS ENZIMÁTICAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS	20
3.3.1. Protocolo para determinar producción de enzimas	20
3.4. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LA INTERACCIÓN DE MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS	21
3.5. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DEL EFECTO INHIBIDOR DE MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE VIBRIOS PATÓGENOS	22
3.6. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DE LAS MEZCLAS DE CEPAS PROBIÓTICAS EN JUVENILES <i>L. vannamei</i>	23
3.6.1. Preparación de las mezclas probióticas	23
3.6.2. Diseño experimental	24
3.6.3. Análisis microbiológicos	24
3.6.4. Análisis histológico	24
3.6.5. Técnicas inmunitarias	25
3.6.5.1. Hemograma	25
3.6.5.2. Cuantificación de la actividad fenoloxidasa (PO)	25
3.6.5.3. Actividad antibacteriana	26
3.7. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DEL EFECTO PROBIÓTICO DE LAS MEZCLAS ENFRENTANDO LOS JUVENILES <i>L. vannamei</i> A UNA PRUEBA DE DESAFÍO CON <i>V.harveyi</i> .	26
3.7.1. Estado de salud de los animales	27
3.7.1.1. Análisis microbiológicos	27
3.8. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DE LAS MEZCLAS PROBIÓTICAS ENFRENTANDO JUVENILES <i>L. vannamei</i> A UNA PRUEBA	

V.	CONCLUSIONES	50
	RECOMENDACIONES	51
VI.	RESUMEN	52
VII.	ABSTRACT	54
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	56
IX.	ANEXOS	65

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Esquema de selección de probióticos para larvas de organismos acuáticos. Tomado de Gomez (1998).	8
Fig. 2.	Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de E22	34
Fig. 3.	Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de S2	34
Fig. 4.	Porcentajes de inhibición de las mezclas probióticas sobre el crecimiento de PA2	35
Fig. 5.	Porcentajes de colonización de las P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili	37
Fig. 6.	Porcentajes de animales supervivientes, después de 45 días de aplicación con mezclas probióticas mediante alimento.	38
Fig. 7.	Peso promedio alcanzado por los juveniles <i>L. vannamei</i> , luego de 45 días de aplicación de las mezclas mediante el alimento.	39
Fig. 8.	Conteo total de células plasmáticas en los tratamientos y control expresados en H/ml.	40
Fig. 9.	Porcentajes de hemocitos.	40
Fig. 10.	Densidad óptica relacionada con la estimulación de actividad fenoloxidasa producida por las mezclas P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili	41
Fig. 11.	Porcentaje de la actividad antibacteriana del plasma de los tratamientos.	42
Fig. 12.	Interacción de las mezclas P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili contra vibrios patógenos (<i>V. harveyi</i> .)	44
Fig. 13.	Conteo total de células plasmáticas en los tratamientos y control, expresados en H/ml.	46

Fig. 14.	Porcentajes de hemocitos.	46
Fig. 15.	Valores de densidad óptica para la cuantificación de la actividad fenoloxidasa de los tratamientos P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili y el control.	47
Fig. 16.	Porcentajes de actividad antibacteriana del plasma de los tratamientos P63-Ili, P62-P64, P62-P63-Ili y el control, al ser desafiados con vibrios patógenos.	48
Fig. 17.	Porcentajes alcanzados después de 4 días de infección con WSV.	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Probióticos utilizados como agentes de control en acuicultura	11
Tabla 2.	Distancia (mm) del borde de la colonia hasta el límite del halo hidrolizado.	29
Tabla 3.	UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezclas dos cepas.	31
Tabla 4.	UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezclas tres cepas	32
Tabla 5.	UFC/ml recuperadas con sus porcentajes correspondientes en mezclas cuatro cepas	32

Tabla 1. Probióticos utilizados como agentes de control en acuicultura

Probiótico	Hospedero	Patógeno
Peces		
• Mezcla de <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>R. viridis</i> , <i>R. palustris</i> y <i>R. vanniellii</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>A. salmonicida</i>
• <i>Pseudomonas fluorescens</i> AH2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>A. salmonicida</i>
• <i>Carnobacterium sp.</i>	<i>Salmo salar</i> L.	<i>A. Salmonicida</i> <i>Y. ruckeri</i>
Moluscos Bivalvos		
• <i>V. tubiashi</i> cepa C33 <i>Pseudomonas</i> cepa 11 y <i>Arthrobacter</i> cepa 77	<i>Argopecten purpuratus</i>	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. splendidus</i> y <i>A. hidrophyla</i>
• <i>Aeromonas medis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>V. tubiashii</i> <i>Y. ruckeri</i>
Crustáceos		
• <i>Bacillus sp.</i> cepa S11	<i>Penaeus monodon</i>	<i>V. harveyi</i> D331
• Cepas de <i>Bacillus sp.</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Vibrio sp.</i> luminicentes
• <i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
• <i>Vibrio alginolyticus</i> cepa Ili	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>V. harveyi</i> E22
• Cepas de <i>Vibrio sp.</i> y <i>Bacillus sp</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>V. harveyi</i> S2
• Cepas de <i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Penaeus monodon</i>	<i>Vibrio harveyi</i>

V. CONCLUSIONES

- Los resultados observados en el incremento de peso con el suministro de mezclas probióticas, indicarían posible contribución de los probióticos al proceso digestivo de los animales a través del suministro de enzimas esenciales.
- Este estudio demuestra que es esencial evaluar la interacción de las cepas bacterianas, para suministrarlas en proporciones adecuadas al desarrollar diversos tipos de mezclas, dependiendo de las concentraciones y número de cepas participantes.
- Las mezclas de cepas probióticas P62-P64 y P62-P63-Ili mostraron mayor inhibición de las cepas patógenas *in vitro*.
- Las mezclas probióticas presentaron mayor capacidad de colonización que las cepas individuales evaluadas en estudios anteriores.
- La mezcla P62-P64 en ensayos *in vivo*, presentó mayor capacidad en colonización, inhibición de patógenos, y aumento de la actividad antibacteriana frente a patógenos, sin embargo se observó leves daños histológicos en los animales.
- La mezcla P62-P63-Ili demostró su efecto probiótico, al inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* el crecimiento de vibrios patógeno y no provocando daños histológicos en los animales.
- El estudio preliminar de evaluación del efecto de las mezclas probióticos sobre el Virus de la Mancha Blanca (WSV), indica que existiría un efecto “protector” frente a este agente viral, cuando el grado de infección es moderado, siendo la mezcla P62-P63-Ili la que presentó mayor supervivencia.

RECOMENDACIONES

- Evaluar las mezclas probióticas a diferentes concentraciones, para determinar la concentración máxima y mínima que permita una buena colonización sin causar daños en el hospedero.
- La mezcla P62-P64 presentó leves daños histológicos en los animales, por lo que se recomienda establecer la concentración y frecuencia de aplicación.
- Evaluar el tiempo óptimo de aplicación de las mezclas, para establecer períodos que permitan mantener la colonización de las mezclas en el hospedero.
- Evaluar la exposición de las mezclas a diferentes parámetros abióticos (temperatura y salinidad).
- Estudiar la dinámica poblacional de las cepas probióticas.
- Caracterizar sustancias antimicrobianas que esten involucradas en la prevención de enfermedades.
- Evaluar las cualidades inmunoestimulantes de los probióticos, en camarones para prevenir infecciones virales.
- Realizar estudios sobre la producción de enzimas que incrementen la nutrición en el hospedero.

VI. RESUMEN

Las enfermedades constituyen un factor limitante en el desarrollo de la producción, es por eso que se buscan herramientas de control para el tratamiento de patologías infecciosas. La rutina para el manejo de los microorganismos patógenos ha implicado el suministro de antibióticos, sin embargo, por su uso indiscriminado se han presentado inconvenientes como la presencia de resistencia bacteriana. En la búsqueda de alternativas para el control y prevención de enfermedades se destaca el uso de probióticos, que actúan mediante mecanismos de exclusión competitiva de bacterias patógenas e incremento de la respuesta inmune en el hospedero.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar mezclas de cepas probióticas observando colonización, supervivencia, incremento de peso, inhibición de bacterias patógenas, inmunoestimulación y respuesta a la presencia del Virus de la Mancha Blanca (WSV) en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Se evaluaron la interacción de cuatro cepas (*Vibrio* P62, *Vibrio* P63, *Vibrio alginolyticus* y *Bacillus* P64) *in vitro* para obtener mezclas que presenten proporciones similares. Las mezclas escogidas fueron sometidas a una prueba de inhibición *in vitro* con vibrios patógenos (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 y *V. parahaemolyticus* PA2) para demostrar su efecto antagónico. Las mezclas P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50 %.

Las mezclas seleccionadas fueron sometidas a evaluaciones *in vivo* en los animales con un peso promedio de $1.38 \pm 0.1g$ a una concentración de 3.6×10^7 UFC/ml de las mezclas probióticas por gramo de alimento durante 45 días, logrando incrementar el peso de los animales y porcentajes superiores al 70% de colonización en los tratamientos. El análisis histológico, después de los bioensayos de colonización, demuestran la inocuidad de las mezclas P62-P63-Ili y P63-Ili, sin embargo la mezcla P62-P64 presentó leves daños histopatológicos.

Al final del bioensayo los animales fueron sometidos a una prueba de desafío, logrando inhibir el crecimiento de *Vibrio harveyi*. Se observó un 23%, 32% y 48%, de ingreso de la cepa patógena en los tratamientos P62-P64, P62-P63-Ili y P63-Ili respectivamente.

El efecto inmunoestimulante, fue evaluado *in vivo* mediante pruebas inmunitarias en los animales mantenidos con las mezclas probióticas. El número total de hemocitos no se vió incrementado por la exposición de bacterias durante 45 días, la mezcla P63-Ili presentó menor actividad fenoloxidasa y la actividad antibacteriana aumentó por la presencia de mezclas probióticas en los tratamientos.

En los tratamientos con mezclas probióticas se reportaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control en la supervivencia de los animales, cuando fueron sometidos a una prueba de desafío con el Virus de la Mancha Blanca (WSV).

VII. ABSTRACT

Diseases constitute a limiting factor for the development of the commercial production systems. Therefore, there is an imminent need for the development of control tools of infectious pathologies. The actual routine management of pathogenic microorganisms implies the use of the antibiotics, nevertheless, its indiscriminate use has resulted in the development of bacterial resistance to these antibiotics. In order to find new alternatives for the control and prevention of diseases, probiotics have been proposed as a substitute, which act by means of competitive exclusion mechanisms of the pathogenic bacteria and by increasing the immune response in the host.

The objective of this work was to evaluate mixtures of probiotic strains by their capacity to colonize, increase host survival, increase of host weight, inhibition of pathogenic bacteria growth, immunostimulation and response to the presence of the White Spot Virus (WSV) in juvenile *Litopenaeus vannamei* shrimp. The interaction among the mixtures of the four strains of probiotic bacteria (*Vibrio* P62, *Vibrio* P63, *Vibrio alginolyticus* and *Bacillus* P64) were evaluated *in vitro*, in order to obtain mixtures that present similar proportions.

The selected mixtures were challenged under an *in vitro* inhibition test with pathogenic vibrios (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 and *V. parahaemolyticus* PA2) in order to confirm its antagonistic effect. The mixtures P63-Ili, P62-P64 and P62-P63-Ili presented a percentage of inhibition greater than 50 %. The selected mixtures were put under evaluations *in vivo* in animals with average weights of 1.38 ± 0.1 g at a 3.6×10^7 concentration of CFU/ml of the probiotics mixtures per grams artificial diets for 45 days, obtaining an increase in animal weight and a colonization percentage higher than 70% in the treatments. After the colonization experiments, the histological analysis, demonstrated the

innocuousness of the P62-P63-Ili mixtures and P63-Ili alone, nevertheless the P62-P64 mixture presented slight histopathologic damages.

At the end of experiment the animals were put under a challenge test, being able to inhibit the growth of *Vibrio harveyi*. A 23%, 32% and 48%, entrance percentage was observed for pathogenic strains in the treatments, P62-P64, P62-P63-Ili and P63-Ili, respectively.

The immunostimulant effect, was evaluated *in vivo* by means of immune tests in the animals maintained with the probiotic mixtures. The total number of hemocytes did not increase when exposed to the probiotic mixtures of bacteria for 45 days. The P63-Ili mixture presented less phenoloxidase activity, while the antibacterial activity increased due to the presence of probiotic mixtures in the treatments.

In the treatments with probiotic mixtures significant differences ($p < 0.05$) in terms of survival were observed with respect to the control, when they were put under a challenge test with the White Spot Virus (WSV).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, A. 1991. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. *Fish & Shellfish Immunology*. 1: 59-70.
- Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del Punto Blanco. *El Mundo Acuícola*. 5:3-7.
- Ali, A. 2000. Probiotics in fish farming. Evaluation of a candidate bacterial mixture. Ph. Licentiate Thesis. Universitet Lantbruks Sveriges, p. 18.
- Aguirre, G. 1993. Aplicación de probióticos en la Acuicultura. En: Cruz, L., Ricque, D. y Mendoza, R., (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de alimentos para Acuicultura*. 12-14 Febrero, 1993. Nuevo León, México.
- Anderson, I., Shamsudin, M., Shariff, M. y Nash, G. 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fish. Sci.* 2:93-108.
- Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Effendi, I. y Griffith, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93-96.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*. 191: 71-88.
- Baticados, M., Lavilla, C., Cruz, L., de la Peña, L. y Suñaz, N. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9: 133-139.
- Benetti, D. 2001. Proactive health management, Using probiotics in marine fish hatcheries. *The Advocate*. 4: 30
- Berger, C. 2000. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmuno-estimulación de camarones peneidos. En: Cruz, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M. y Civera, R.,

- (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
- Brown, J. 1989. Antibiotics: their use and abuse in Aquaculture. *World Aquaculture* 20(2): 34-44.
- CENAIM. 2001. El Mundo Acuícola. Salud Animal. Microbiología. Probióticos. Pag. 9-10. Vol 7 (2). Ecuador.
- Chamberlain, G. 2001. Feed additives. *The Advocate*. 4: 61-65
- Chisholm and Smith, 1992. Antibacterial Activity in The Haemocytes of Shore Crab, *Carcinus Maenas*. *J. mar boil. Ass. U. K.*, 72. 529-542.
- CNA. 2001. Acuicultura del Ecuador. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura. 41: 8-19.
- Dehority, B. 1998. Microbial interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron (LUZ)*. 15: 69-86
- Dopazo, C., Lemos, M., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. y Toranzo, A. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 97-101.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. y Bachère, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of Biological Chemistry*. 45: 28398-28406.
- Douillet, P. 1998. Aplicación de la biotecnología en el control de la calidad de agua. En Memorias del II Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán Sinaloa, México.
- Douillet, P. 2000. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 182: 241-248.
- Fueller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal Applied of Bacteriology*. 66:365-378.
- Garriques, D. y Arevalo G. 1995. An Evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C. y Hopkins, J. (Eds.),

- Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp. 53-59.
- Gatesoupe, F. 1999. The use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gibson, G., Saavedra, J., MacFarlane, S. y MacFarlane, G. 1997. Probiotics and intestinal infections. In *Probiotics 2* (ed. R. Fuller), Chapman and Hall, London. 10-31
- Gibson, L., Woodworth, J. y George, A. 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169: 111-120.
- Gomez, B. 1995. The use of bacteria as probionts in shrimp larviculture. In: P. Lavens, E. Jaspers y I. Roelants (Eds.). *Larvi'95-Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent; Belgium.
- Gomez, B. 1998. Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval culture. PhD Thesis, the University of Stirling, 179 pp.
- Gomez, B., Tron-Mayén, L., Roque, A., Turnbull, J., Inglis, V. y Guerra-Flores, A. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 163: 1-9.
- Gomez, B., Roque, A. y Turnbull J. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- Gomez, B., Roque, A., Velasco, G. 2002. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. 211: 43-48.
- Gorospe, J., Nakamura, K., Abe, M., Higashi, S. 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fish Sci.* 62: 914-918.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T. 1999. Applied and Environmental Microbiology. 65: 969-973.n
- Gram, L., Løvold, T., Nielsen, J., Melchiorson, J. y Spanggaard, B. 2001. In vitro antagonism of the probiont *Pseudomonas fluorescens* strain AH2 against *Aeromonas salmonicida* does not confer protection of salmon against furunculosis. *Aquaculture* 199: 1-11.

- Griffith, D. 1995. Microbiology and the role of probiotics in Ecuadorian shrimp hatcheries. In: P. Lavens, E. Jaspers y I. Roelants (Eds.). Larvi'95-Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication, Gent; Belgium.
- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis de Magister en Ciencias, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Hammed, A.S. 1995. Susceptibility of three penaeus species to a *Vibrio campbellii*-like Bacterium. Journal of the World Aquaculture Society 26: 315-310.
- Hood, M. 1974. Microbial aspect of penaeid shrimp digestion. Proceeding, Gulf and Caribbean Fisheries Institute. p. 81-91.
- Horowitz, A. y Horowitz, S. 2001. El Uso de Antibióticos y Probióticos bajo condiciones de Mancha Blanca: bueno, malo o indiferente?. Seminario organizado por el Centro de Servicios para la Acuicultura, Cámara Nacional de Acuicultura y Fundación CENAIM-ESPOL. Guayaquil, Ecuador.
- Horowitz, A. y Horowitz, S. 2001. Últimas investigaciones sobre probióticos. Acuicultura del Ecuador. 42: 22-24.
- Huber, J. 1997. Probiotics in cattle. In Probiotics 2 (ed. R. Fuller), Chapman and Hall, London. 162-181.
- Intriago, W. 1998. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al síndrome de Zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Intriago, P. y Jones, D. 1993. Bacteria as food for *Artemia*. Aquaculture. 113: 115-127.
- Jiménez, R., Barniol, R. y Machuca, M. 1996. Hepatopancreatitis necrotizante asociada a bacterias intracelulares en cultivos de *Penaeus vannamei* en el Golfo de Guayaquil-Ecuador. Acuicultura del Ecuador. 15.
- Johansson, M., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture. 191: 45-52.

- Johnson, S. 1989. Handbook of Shrimp Disease. Aquaculture. Department of Wildlife and Fisheries Science. Texas A&M University.
- Kimura, T., Yamano, K., Nakano, H., Monoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K. 1996. Detection of Penaeid Rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. Fish Pathology 31:93-98
- Lemos, M., Toranzo, A. y Barja, J. 1985. Antibiotic Activity of Epiphytic Bacteria Isolated from Intertidal Seaweeds. Microbial Ecology. 11:149-163.
- Lightner, D. 1992 Shrimp Pathology: Mayor diseases of concern to the shrimp farming industry in the Americas. Memorias I Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, 18-23 Octubre 1992, Guayaquil, Ecuador. 177-195.
- Makridis, P., Fjellheim, A., Skjermo, J. y Vadstein, O. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifer. Aquaculture International. 8: 367-380.
- Melena, J., Flegel, T. y Calderón, J. 2000. Ensayos para determinar los factores que influyen en la mortalidad por WSSV. El Mundo Acuícola. 6: 39-46.
- Mohney, L., Lightner, D. y Bell, T. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacean: Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society. 25:116-131.
- Morales, I. 1992. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Penaeus vannamei* en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 18-23 Octubre de 1992. Guayaquil, Ecuador. 203-207.
- Moriarty, D. 1997. The rol of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture 151: 333-349.
- Moriarty, D. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture 164: 351-358.
- Moriarty, D. 1999. Disease Control in Shrimp Aquaculture with Probiotic Bacteria. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C.,

- Brylinsky, M. and Johnson, G., (Eds.), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
- Mulder, R., Havenaar, R. y Huis in't Veld, J. 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. In Probiotics 2 (ed. R. Fuller), Chapman and Hall, London. 186-205
- Muñoz, 1996. Desarrollo y optimización de ensayos para la evaluación del estado inmunitario del camarón *P. vannamei*. Tesis de Acuicultura. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Newman, S. 1998. Development of management tools and strategies to prevent and minimize the impact of disease in commercial shrimp farming operations. En Memorias del II Simposium Internacional de Acuicultura. Mazatlán Sinaloa, México.
- Newman, S. 2000. Prevención de enfermedades del camarón de cultivo. Panorama Acuícola. 5: 22-23
- Newman, S. 2001. Probióticos para la acuicultura ¿Realidad o ficción?. Panorama Acuícola. 6: 20-21.
- Otero, V., Molina, C., Cedeño, R., Sotomayor, M. y Rodríguez, J. 2000. Evaluación del efecto inmunoestimulante de los β -glucanos. El Mundo Acuícola. 6: 46-51
- Peeters, M. y Rodríguez, J. 1999. Problemas bacterianos en la industria camaronera ecuatoriana, prácticas de manejo y alternativas de control. El Mundo Acuícola. 5: 13-18.
- Pérez, F. y Gómez, L. 2000. Programa de genética Promogen-Cenaim. El Mundo Acuícola. 7: 62.
- Phianphak, W., Rengpipat, S., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp. for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Journal of Scientific Research 24: 41-51.

- Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S. y Menasveta, P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. y Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271-288.
- Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. Y Candia, M. 1997. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture* 154: 17-26.
- Riquelme, C., Araya, R. y Escribano, R. 2000. Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture* 181: 25-36.
- Robertson, P., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. Y Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. As a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243.
- Sakai, M., Yoshida, T., Atsuta, S. y Kobayashi, M. 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *Journal of Fish Diseases*. 18: 187-190.
- Salyers, A. y Whitt, D. 1994. *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., USA. 418 pp.
- San Miguel, L. 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio *in vivo* de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Serrano, J. 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Penaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (cepa E22) mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (cepa Ili). Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

- Skjermo, J. y Vadstein, O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177: 333-343.
- Söderhäll, K. y Cerenius, L. 1992. Crustacean Immunity. *Annual Revision of Fish Diseases*. 3-23
- Song, Y., Gheng, W. y Wang, C. 1993. Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infections for cultured shrimp in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61: 24-31.
- Sotomayor, M. 2001. Obtención de un Modelo de Infección Experimental en Juveniles de *Penaeus vannamei*, con el *Vibrio vulnificus*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*. 191: 53-69.
- Sugita, H., Hirose Y., Matsuo, N. y Deguchi, Y. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. Strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269-280.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. y Deguchi, Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture* 145: 195-203.
- Tapia, L. 1997. Optimización de ensayos antibacterianos y estudios sobre la inducción de la actividad antibacteriana en la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., Gomez-Gil, B., Calderón, J., Sorgeloos, P. y Swings J. 1999. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and hatchery probionts. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2592-2597.
- Vandenbergh, J., Li, Y., Verdonck, L., Li, J., Sorgeloos, P., Xu, H. y Swings, J. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. *Aquaculture*. 169: 121-132

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 655-671.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2527-2533.
- Wang, X., Li, H., Feng, J., Han, L., Qi, Z., Li, J., Li, Y., Zhang, X., Ji, W., Xu, H., Yang, X., Ma, J., Yu, X. y Sun, X. 1996. Feasibility Study on the Delivery of a Probiotic Flora to Penaeid Larvae and the Bacterial Flora in the Digestive Tract of Adult Shrimp. Ocean University of Qingdao, P.R. China.
- Zherdmant, M. 1996. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del Síndrome de bolitas en larvas de *Penaeus vannamei* y estudio de la interacción in vitro con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador.

IX. ANEXOS

Colonización de las mezclas probióticas en juveniles *L. vannamei*.

Tratamiento	Total	Mezclas probióticas	Flora natural
Control	$2.8 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^5$		$2.8 \times 10^6 \pm 3.3 \times 10^5$
P63-Ili	$2.7 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^5$ ^a	$7.4 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^5$
P62-P63-Ili	$3.0 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^5$ ^b	$7.9 \times 10^6 \pm 6.1 \times 10^4$
P62-P64	$3.3 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$	$2.6 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$ ^c	$7.0 \times 10^6 \pm 3.9 \times 10^4$

Valores promedios de las UFC/g HP en los tratamientos con sus respectivas desviación estándar.

Mezcla	%P62	%P63	%P64	%Ili
P63-Ili		29.2		70.8
P62-P63-Ili	48.4	13.1		38.5
P62-P64	58.6		41.4	

Porcentajes de las cepa en las mezclas al final del bioensayo.

Inhibición del crecimiento de *V. harveyi* en juveniles *L. vannamei*, mediante el uso de mezclas probióticas.

Tratamiento	<i>V. harveyi</i>	Mezclas probióticas	Flora natural
Control	$2.1 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$ ^a		$6.0 \times 10^5 \pm 8.3 \times 10^4$
P63-Ili	$8.4 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$ ^b	$5.0 \times 10^5 \pm 6.6 \times 10^4$	$4.0 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^4$
P62-P63-Ili	$6.2 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$ ^c	$1.2 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$
P62-P64	$6.3 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^4$ ^d	$1.9 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^4$	$2.3 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^4$

Valores promedios de las UFC/g HP en los tratamientos con sus respectivas desviación estándar.

Desafío con el Virus de la Mancha Blanca (WSV).

Análisis inicial.

Tratamiento	Muestra	Positivo*
P63-Ili	7	0
P64-P62	6	1
P62-P63-Ili	7	0
Control	7	1

*Diagnóstico de WSV por PCR, mediante el Kit Kimura *et al.* (1996).

Análisis al final de la infección.

Tratamiento	Muestra	Positivo*
P63-Ili	10	3
P64-P62	10	6
P62-P63-Ili	10	0
Control	10	9

*Diagnóstico de WSV por PCR, mediante el Kit Kimura *et al.* (1996).

Técnica de histología descrita por Lightner (1998).

Las muestras fueron fijadas en solución Davidson durante 24 horas y transferidos después a alcohol al 70% para su almacenamiento en celdas para ser procesadas.

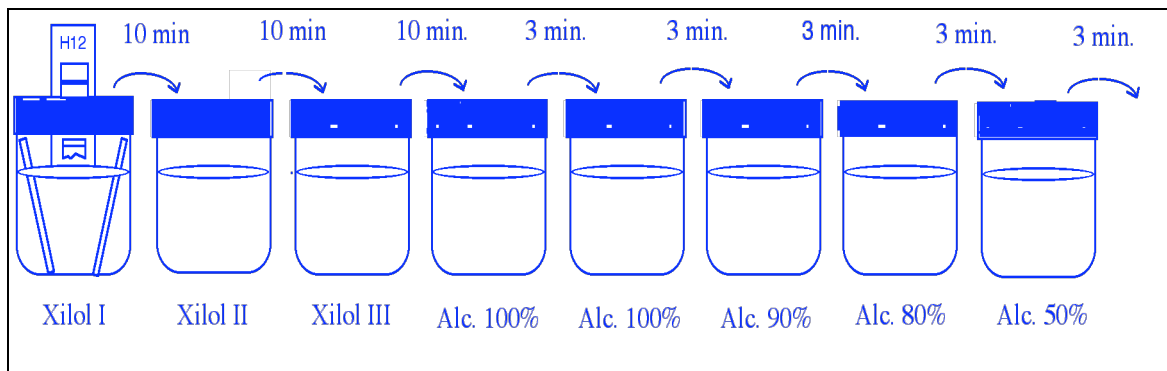
Deshidratación: posterior a la fijación de las muestras estas fueron deshidratadas en varios baños de etanol.

Mecanismo y tiempos de deshidratación

Baño	Tiempo
Etanol al 70%	1 hora
Etanol al 80%	1 hora
Etanol al 90%	1 hora
Etanol al 95%	1 hora
Etanol al 100% (I, II, III)	1 hora
Xilol (I y II)	1 hora

Posteriormente a la deshidratación las muestras fueron incluidas en tres baños de parafina sucesivos a una temperatura de 67 °C, por una hora cada baño.

Después de la inclusión en parafina, se cortó con un micrótomos ERMA INC. los bloques parafinados. Estos cortes se desparafinaron e hidrataron antes de ser sometidos a tinción.



Tiempos de desparafinado e hidratación

Los baños sucesivos de desparafinado, hidratación y tinción son detallados a continuación.

Tiempos para la tinción (Hematoxilina - Eosina)

Xilol (3 veces)	10 min.
Etanol al 100%	3 min.

Etanol al 90%	3 min.
Etanol al 80%	3 min.
Etanol al 50%	3 min.
Agua Destilada	3 min.
Hematoxilina (Anexo 1)	5 - 10 min.
Agua de la llave	5 min.
Eosina-Floxina (Anexo 1)	1 - 3 min.
Agua destilada	2 – 3 inmersiones
Etanol al 70%	1 min.
Etanol al 90%	1 min.
Etanol al 100% (dos veces)	1 min.
Xilol I y II	5 min.

El montaje de las placas se realizó con una gota de solución Permount[®]. Las muestras teñidas y montadas fueron observadas en el microscopio marca Olympus modelo BH-2 en un objetivo de inmersión 100 X, mientras que placas no teñidas fueron mantenidas a temperatura ambiente.