

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE ZOOTECNIA

**EFFECTO ESTIMULADOR DE TRES PRODUCTOS NATURALES SOBRE EL
SISTEMA INMUNOLÓGICO DEL CAMARÓN *Litopenaeus vannamei*,
DESAFIADO CON *Vibrio parahaemolyticus*.**

**TESIS DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN ZOOTECNIA**

NELSON PEÑA NAVARRO

**CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA**

2012

TRIBUNAL EXAMINADOR

Tesis de graduación presentada a la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia.

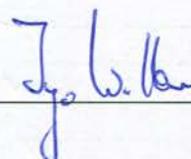
Ing. Ruth Vargas Cordero, M.A.E.
Directora de la Tesis de Graduación
Universidad de Costa Rica



Ing. Henry Soto Murillo, PhD.
Miembro del Tribunal
Universidad de Costa Rica



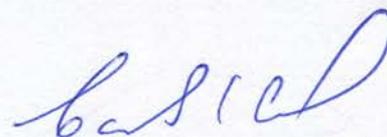
Ingo S. Wehrtmann, Dr. rer. nat.
Miembro del Tribunal
Universidad de Costa Rica



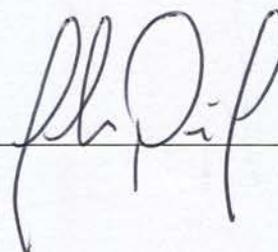
Kenneth Dirst, M. Sc.
Miembro del Tribunal
Universidad de Costa Rica



Ing. Carlos Arroyo Oquendo, M. Sc.
Director de la Escuela de Zootecnia
Universidad de Costa Rica



Nelson Peña Navarro, Bach.
Sustentante



“La gloria del mundo es transitoria, y no es ella la que nos da la dimensión de nuestra vida, sino la elección que hacemos de seguir nuestra leyenda personal, tener fe en nuestras utopías y luchar por nuestros sueños”

Paulo Coelho

AGRADACIMIENTOS

A Dios por darme sabiduría, perseverancia, entrega, inteligencia y por no dejarme caer ante las circunstancias adversas.

A veces se tienen sueños que por sí solos no se pueden cumplir, por lo que hay que recurrir a otras personas para dar inicio a éstos; más difícil aún conocer a gente que se involucre de manera honesta y crean en nuestras ideas. Por lo tanto, quiero agradecer sinceramente a las personas que dieron su trabajo y carisma para que esta investigación fuera toda una realidad.

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre en todo momento, darme la mano cuando más la necesitaba y estar ahí cuando precisaba un favor o tenía una necesidad; sin ellos no sería lo que soy y no hubiera logrado llegar tan lejos en esta vida.

Le agradezco de todo corazón y especialmente a mí novia, por todas las veces que tuvo que ir a darme la mano al laboratorio cuando me encontraba solo, por su comprensión y ser la fuente de energía cuando más la necesitaba, por su amor infinito y soportar todas mis quejas y frustraciones.

A todas las instituciones que aportaron su granito de arena, cada colaboración fue imprescindible para iniciar y terminar este proyecto: Empresas privadas que aportaron los productos que fueron evaluados, Parque Marino del Pacífico por la donación del agua de mar; Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) por prestar sus laboratorios y materiales, en especial a doña Margarita Silva y a su director Álvaro Morales; a Rocío González del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) por la colaboración y apoyo técnico en los análisis histológicos; por último a don Norman Rojas del Laboratorio de Microbiología Médica perteneciente a la Escuela de Microbiología de la UCR, por la donación y el apoyo técnico en el uso y manejo de las cepas de bacterias.

A la Cooperativa Nacional de Productores de Sal (COONAPROSAL R.L.), por el apoyo económico y por creer que este proyecto logrará beneficiar a los productores de camarón del país.

A la Estación Experimental Alfredo Volio Mata (EEAVM) de la Universidad de Costa Rica, por el aporte económico otorgado para la ejecución de la tesis por medio de un proyecto de investigación asociado a esta unidad.

Por supuesto a Ken Dirst, por todo su apoyo logístico y entusiasmo, por creer en mí y estar siempre dispuesto a colaborar, por los sacrificios que tuvo que pasar, porque me tendió la mano para cumplir mis sueños y entrar al mundo de la acuicultura de camarones.

A mi gran amigo Alexander Varela, sus sacrificios y ayuda desinteresada nunca tendré como pagárselos, por haber hecho de esta investigación un proyecto mutuo y que de una u otra manera ayudó a cumplir nuestros deseos de superación.

Especialmente le agradezco a doña Ruth Vargas, por estar desde el inicio hasta el final en esta travesía de investigación, por comprenderme y hacer hasta lo imposible para que se diera la ejecución de esta tesis; por toda la transmisión de conocimiento y su apoyo incondicional. Gracias profe...

RESUMEN

Efecto estimulador de tres productos naturales sobre el sistema inmunológico del camarón *Litopenaeus vannamei*, desafiado con *Vibrio parahaemolyticus*. El objetivo fue determinar la respuesta inmunológica del camarón *Litopenaeus vannamei* utilizando manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y un compuesto de extractos de plantas (T3) después de ser desafiados con *Vibrio parahaemolyticus*. Se realizaron dos bioensayos con una duración de seis (1×10^6 UFC) y catorce (3×10^6 UFC) días en el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica durante el 2011. Para la investigación se extrajeron 120 camarones para cada periodo experimental de fincas ubicadas en la Península de Nicoya. Al finalizar la dosificación de los productos se evaluó la ganancia de peso y la conversión alimenticia. Luego de la infección con *V. parahaemolyticus* se realizaron hemogramas, coagulación, bacteriología de hemolinfa, mortalidad acumulada y análisis histológicos. Los parámetros inmunológicos no mostraron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre tratamientos en ningún periodo, sin embargo a los seis días T1 mostró los mejores resultados ($41,07 \times 10^5$ hemocitos/ml; una coagulación de 34,40 s y $4,44 \times 10^3$ UFC/ml). En el periodo de catorce días T2 obtuvo los mejores valores ($55,76 \times 10^5$ hemocitos/ml; una coagulación de 34,20 s y $15,4 \times 10^3$ UFC/ml). La mortalidad acumulada presentó a las 10 horas de inoculación, menor cantidad de muertes en T1 y T3 (76,2%) a los seis días, mientras que a los 14 días fue para T1 (93,2). Los parámetros zootécnicos como la ganancia de peso y la conversión alimenticia tuvieron diferencias estadísticas ($P < 0,05$) solo para el bioensayo que se extendió por seis días, siendo T2 el que presentó mejores resultados, al tener un peso final de biomasa de 54,3 g, un incremento en la ganancia de peso de 19,3% y una conversión alimenticia de 1,4. El análisis histológico demostró ser el mejor parámetro para medir el efecto inmunoestimulante, donde T1 y T2 mostraron los mejores resultados para esta variable.

Palabras claves: Inmunología del camarón, inmunoestimulación, análisis histológico, hemogramas, infección bacteriana.

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA.....	i
TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Generales.....	5
2.2. Específicos.....	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL TEMA	6
3.1. Generalidades del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	6
3.2. Características de los sistemas de cultivo para camarón.....	6
3.3. Caracterización de la Vibriosis en los sistemas de cultivo para camarón	9
3.4. Inmunología del camarón.....	12
3.5. Sustancias naturales y su efecto inmunoestimulador en camarón.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Camarones experimentales	16
4.2. Aclimatización y acondicionamiento en acuarios	17
4.3. Preparación de dietas y régimen de alimentación.....	18
4.4. Tratamientos	20

4.5. Examen clínico y análisis en fresco.....	21
4.6. Cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22
4.7. Parámetros Inmunológicos.....	23
4.7.1. Hemograma	23
4.7.2. Tiempo de coagulación de hemolinfa	23
4.7.3. Bacteriología de hemolinfa	24
4.7.4. Mortalidad acumulada.....	24
4.8. Parámetros Zootécnicos	25
4.8.1. Ganancia de peso.....	25
4.8.2. Conversión alimenticia.....	25
4.9. Histología	26
4.10. Prueba de <i>Sensidiscos</i> o discos de sensibilidad.....	26
4.11. Estadística.....	27
4.11.1. Metodología estadística.....	27
4.11.2. Análisis estadístico	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. Análisis general de camarones evaluados	29
5.2. Parámetros Inmunológicos.....	29
5.2.1. Hemograma	29
5.2.2. Coagulación.....	33
5.2.3. Unidades Formadoras de Colonias.....	36
5.2.4. Mortalidad acumulada.....	38
5.3. Parámetros zootécnicos.....	42
5.3.1. Ganancia de peso.....	43
5.3.2. Conversión alimenticia.....	45

5.4. Histología	47
5.4.1. Análisis histológico asociado a los tratamientos	55
5.5. Discos de sensibilidad.....	59
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
7. LITERATURA CITADA.....	64
8. ANEXOS	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Rangos adecuados de los parámetros físico-químicos y biológicos del agua para el cultivo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
2 Perfil nutricional del alimento comercial utilizado para alimentar a <i>L. vannamei</i> en ambos periodos experimentales.	19
3 Medias del peso inicial, final y ganancia de peso obtenidas de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con diferentes dietas.....	44
4 Medias de la conversión alimenticia obtenidas en <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con diferentes dietas.....	46
5 Porcentaje de lesiones histológicas sobre las diferentes órganos de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con diferentes dietas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Anatomía externa del <i>Litopenaeus vannamei</i> , donde se observan los principales sitios de evaluación metodológica realizados en los periodos experimentales de seis y catorce días.....	22
2 Medias de los conteos totales de hemocitos realizados en <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.	32
3 Medias de la coagulación determinadas en <i>Litopenaeus vannamei</i> y desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.	35
4 Medias del conteo total de Unidades Formadoras de Colonias realizada en <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.	37
5 Medias de la Mortalidades acumuladas realizada en <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días	

	donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.	41
6	Cortes histológicos obtenidos de <i>L. vannamei</i> desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> . Hepatopáncreas, Órgano linfoide y Músculo	49
7	Cortes histológicos obtenidos de <i>L. vannamei</i> desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> . Corazón, Branquias, Glándula antenal	50
8	Cortes histológicos obtenidos de <i>L. vannamei</i> desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> . Tejido conectivo, Tejido nervioso, Epitelio Cuticular, Palpo mandibular	51
9	Cortes histológicos obtenidos de <i>L. vannamei</i> desafiados con <i>V. parahaemolyticus</i> . Tejido hematopoyético, Intestino, Globo ocular, Pedúnculo ocular, Arteria, Flagelo antenal	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1	Reporte del estado de salud general de los camarones extraídos de la finca Cerro Mar y utilizados en el Bioensayo 1, donde se inyectó 1×10^6 UFC/camarón.75
2	Reporte del estado de salud general de los camarones extraídos de la finca Caraito 2 y utilizados en el Bioensayo 2, donde se inyectó 3×10^6 UFC/camarón.76
3	Medias de los parámetros inmunológicos obtenidos de <i>Litopenaeus vannamei</i> desafiados con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). I) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. II) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.77
4	Imágenes del proceso de experimentación realizada en los bioensayos donde se desafió a <i>Litopenaeus vannamei</i> con <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . A) Aclimatización de camarones. B) Medición de oxígeno. C) Preparación de dietas. D) Alimentación de camarones. E) Pesaje de camarones. F) Fijación con Davidson. G) Distribución de peceras. H) Daño muscular por infección en camarones.78

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos acuáticos han surgido como una importante fuente de alimento y trabajo en los principales países dedicados a este tipo de producción (Balcázar 2002). En este aspecto, la camaronicultura ha incrementado su producción en los últimos años, donde según la FAO (2010) durante el 2008 la producción de *Litopenaeus vannamei* en América constituyó el 80,7% de la producción acuícola mundial de esta especie y comercialmente se ha convertido en un producto muy importante, trascendiendo en el mercado internacional e incrementándose en el nacional.

A nivel internacional, los principales países exportadores de camarón fueron Tailandia, China y Vietnam. Este último pasó de 800 millones de USD en 1998 a 4600 millones en el 2008, siendo el quinto mayor exportador del mundo, vinculados particularmente a la producción de camarones y gambas (FAO 2010). A nivel regional, el mismo autor menciona que los principales productores son México y Honduras; siendo el mercado estadounidense y europeo los principales importadores de la región.

Comparativamente en Costa Rica, se reportó un incremento de las toneladas de camarón exportado en un 64,3% durante el 2011 en relación al 2010. Sin embargo, durante el 2009 y 2010, el sector sufrió una disminución promedio de 18,5% en comparación a las exportaciones del 2008 (PROCOMER 2012).

Efecto de lo anterior y al vislumbrarse la camaronicultura como un mercado promisorio, los productores han incrementado las densidades de cultivo, ocasionando una reducción de la calidad de las aguas (Álvarez *et al.* 2000), provocando gran estrés en los camarones (Balcázar 2002) y generando un incremento en la ocurrencia de enfermedades infecciosas oportunistas (Gullian y Rodríguez 2002; Trujillo *et al.* 2005), entre éstas las de tipo viral y bacteriana (Ibarra *et al.* 2003), producto del detrimento progresivo del sistema inmunológico

(Gómez *et al.* 2001). El impacto de las enfermedades en las producciones acuícolas ha generado grandes pérdidas económicas (Montserrat y Herrera 2000; Burge *et al.* 2007; Decamp *et al.* 2008), siendo las de tipo bacterial como *Vibrio* sp. (Gómez *et al.* 1998; Rojlorsakul *et al.* 1998; Kannapiran *et al.* 2009; Ganesh *et al.* 2010) una de las más importantes en los camarones, situación confirmada por Varela (comm. pers.) para Costa Rica; las cuales son responsables de mortalidades de hasta un 100% (Trujillo *et al.* 2005) y reportando pérdidas de hasta 3 billones de dólares en las explotaciones de todo el mundo (Mayer 2010).

Ante tal problema, para combatir los organismos patógenos se han utilizado antibióticos como la oxitetraciclina o el florfenicol, de manera indiscriminada y en ocasiones sin experiencia previa (Villamar 2000). Los efectos ecológicos, la resistencia bacterial y las restricciones en la exportación del camarón, por la presencia de residuos en los tejidos y su eventual incidencia en la población humana ha ocasionado que se considere la utilización de productos naturales para sustituir a los sintéticos (Balcázar 2002; Sotomayor y Balcázar 2003; Mayer 2010), con la finalidad de bioestimular las defensas y combatir los virus, bacterias y parásitos que afectan la salud de los crustáceos (Villamar 2000; Decamp *et al.* 2008; Villamil y Martínez 2009; Heidarieh *et al.* 2010).

En los últimos años, también se ha promovido la producción de camarón de una forma sostenible, fomentando que las operaciones de cultivo se desarrollen de una manera responsable con el ambiente y con la sociedad (Cuéllar *et al.* 2010). Del mismo modo, la búsqueda de alternativas naturales eficientes contra enfermedades surgen de la necesidad de sustituir el uso de antibióticos, que como indican Haws *et al.* (2001), son dañinas si se usan de manera inadecuada, no solo por su efecto en la contaminación del ambiente sino también por el posible daño perjudicial en los seres humanos que consumen camarones con residuos de químicos en su organismo. Cuéllar-Ánjel *et al.* (2010) mencionan la necesidad de que el producto final esté libre de peligros químicos y biológicos para el

consumidor y que el proceso de producción se realice utilizando prácticas amigables al medio ambiente.

Como alternativa natural, Curiquén y González (2006) realizaron investigaciones con oligosacáridos, particularmente manano-oligosacáridos; donde mencionan que éstos funcionan principalmente cumpliendo roles inmunológicos y nutricionales en los animales. Asimismo en los últimos años, se ha promovido mundialmente una gran cantidad de trabajos que se han dedicado al estudio del uso de extractos de plantas, como una opción para reducir el uso excesivo de antibióticos que se han venido utilizando en la alimentación. Los extractos se han considerado como una alternativa para reemplazar los promotores de crecimiento y para mejorar la productividad animal sin incurrir en daños ambientales (Benchaar *et al.* 2007); quedando demostrado el efecto benéfico de una gran variedad de aceites esenciales sobre enfermedades bacterianas y principalmente contra las producidas por bacterias Gram negativas (Villamar 2000; Prieto *et al.* 2005) entre las que se encuentran las del género *Vibrios* sp.

Los extractos de plantas se han ido utilizando en la alimentación de los animales, principalmente en rumiantes (Yang *et al.* 2007; Hart *et al.* 2008), exhibiendo una amplia gama de actividades sobre los microbios y ganando interés como posibles sustitutos naturales de los antibióticos que son utilizados para modificar la fermentación ruminal (Burt 2004; Castillejos 2005). Algunos de los extractos esenciales más comunes obtenidos de las plantas incluyen los siguientes compuestos: eugenol (clavo de olor), carvacrol y timol (tomillo y orégano), cinamaldehído (canela), capsaicina (chiles), terpenoide (árbol de té), allicina (ajo) y anetol (anís), entre otros (Castillejos 2005).

De lo anterior se desprende, que la búsqueda de alternativas que no causen peligro en la salud humana al consumir productos de origen animal, ha incentivado la inversión en diversas instituciones en la investigación de productos naturales que combatan enfermedades bacteriológicas o mejoren la immuno-

competencia de los animales. De ahí que la presente investigación analiza los manano-oligosacáridos y extractos de plantas como posibles estimuladores de la capacidad de respuesta del sistema inmunológico del camarón ante la presencia de bacterias de la familia *Vibrionaceae*.

2. OBJETIVOS

2.1. General:

Determinar la respuesta inmunológica del camarón *Litopenaeus vannamei* en dos bioensayos con duración de seis y catorce días, utilizando tres productos naturales como inmunoestimulantes después de ser desafiados con la inoculación de *Vibrio parahaemolyticus*.

2.2. Específicos:

2.2.1. Verificar el efecto de tres productos de origen natural en dos periodos experimentales de tiempos diferentes, con la finalidad de orientar a los productores sobre su uso y comprobar el efecto de los inmunoestimulantes a corto o mediano plazo.

2.2.2. Utilizar el hemograma, coagulación de hemolinfa y mortalidad acumulada como parámetros inmunológicos indicadores de la salud de los camarones post-infección.

2.2.3. Analizar el efecto inmunoestimulante de tres productos naturales: manano-oligosacáridos, ajo y una mezcla de extractos de varias hierbas ante la inoculación de la cepa de *Vibrio parahaemolyticus*.

2.2.4. Estudiar el efecto inmunoestimulante de los aditivos evaluados mediante la implementación de técnicas de microscopía directa, bacteriología de hemolinfa e histopatología de branquias, estómago, hepatopáncreas, intestino y músculo.

2.2.5. Determinar el efecto de cuatro dietas diferentes sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia en camarones asociado al adecuado funcionamiento del sistema inmunológico.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DEL TEMA

3.1. Generalidades del camarón *Litopenaeus vannamei*.

El camarón *Litopenaeus vannamei*, es una de las especies más explotadas a nivel mundial debido a la gran adaptación a los sistemas controlados, su alta tolerancia a un amplio rango de salinidad y una conversión alimenticia baja (FAO 2010). *Litopenaeus vannamei* se caracteriza por poseer un rostro moderadamente largo, entre 8-9 dientes dorsales y 1-2 dientes ventrales (Perez-Farfante y Kensley 1997). El ciclo de vida comprende seis subestadios nauplio, tres subestadios para larva zoea, tres etapas en mysis, juveniles y adultos. La coloración de ésta especie es normalmente blanca opaca, pero puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua, debido a estas características se le conoce como el camarón blanco del Pacífico (FAO 2010).

Según FAO (2010), China, Tailandia, Indonesia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Vietnam, Malasia, P.C. de Taiwán, Islas del Pacífico, Perú, Colombia, Costa Rica, Panamá, El Salvador, Estados Unidos de América, India, Filipinas, Camboya, Surinam, Saint Kitts, Jamaica, Cuba, República Dominicana y Bahamas son los productores a nivel mundial de esta especie.

3.2. Características de los sistemas de cultivo para camarón.

Con respecto a los sistemas de cultivo, las densidades de siembra sin aireación se encuentran en el rango de 10 a 15 camarones/m²; sin embargo, debe determinarse tomando en cuenta la supervivencia y la capacidad de carga (Saborío y Almanza 2008).

Entre las prácticas de cultivo de dicha especie más comunes están: la preparación de los estanques que involucra el drenado, secado, manejo de

sedimentos, aplicación de cal y llenado de los estanques (Saborío y Almanza 2008); seguidamente se procede a realizar la siembra de los camarones no sin antes valorar la calidad de las postlarvas y una adecuada aclimatización (Cuéllar-Ánjel *et al.* 2010). Dentro de los aspectos más importantes a considerar durante el desarrollo del cultivo está el manejo y dosificación controlada del alimento, el manejo de la calidad de aguas donde se monitorean los parámetros físico-químicos como oxígeno, pH, temperatura y salinidad; además de controlar la aparición de enfermedades en los camarones (Cuéllar-Ánjel *et al.* 2010). Por otro lado, se recomienda que el lugar seleccionado para la ubicación de la finca pueda garantizar el adecuado uso de los recursos naturales y evitar la creación de conflictos ambientales y sociales (Cuéllar-Ánjel *et al.* 2010).

En Costa Rica, los sistemas productivos de camarón se caracterizan por sembrar entre 12-20 camarones/m², alcanzando un incremento en las tallas de uno a dos gramos por semana, y logrando en condiciones normales un peso de 12 gramos en tres meses, aproximadamente (López 2010). Entre las prácticas realizadas comúnmente en las camaroneras antes de la siembra, se pueden mencionar a parte de las descritas por Saborío y Almanza (2008) y Cuéllar-Ánjel *et al.* (2010), el arado para exponer mayor superficie de tierra al sol y liberar los nutrientes presentes debajo de la capa superficial del suelo y por último el clorinado del agua que es retenida por las irregularidades normales del estanque, con el fin de eliminar organismos que sean posibles vectores de enfermedades o competidores directos (peces, larvas, crustáceos, etc.). Luego se realiza la siembra de los animales, utilizando las mismas técnicas descritas por Cuéllar-Ánjel *et al.* (2010), siendo su finalidad adaptarlos a las nuevas condiciones de estadía (Peña 2009).

Durante el periodo de engorde, las principales actividades antes de la cosecha son la alimentación, verificación del estado sanitario mediante análisis de rutina como muestreos y análisis en fresco; además se realiza el monitoreo

constante de los parámetros físico-químicos del agua, que según Cuéllar-Ánjel *et al.* (2010) se describen a continuación:

- Oxígeno disuelto: incide directamente en la calidad del agua, se recomienda medir los niveles de oxígeno hacia la salida del sol y por la tarde entre las 2 y 4 p.m., en caso de disminución del oxígeno durante las tardes por debajo de 6 mg/L; se pueden tomar medidas correctivas como cambio de agua de profundidad o aplicación de oxigenantes como nitrato de amonio o permanganato de potasio.
- Temperatura: Se mide directamente en el agua usando un termómetro común o mediante sondas incorporadas al oxígeno, pH o similares. Además este parámetro provoca una disminución en la capacidad de retención de oxígeno en el agua y sus variaciones immuno-suprimen al camarón (Cuéllar 2008).
- pH: Se mide directamente en el campo ya que cambia constantemente, puede provocar muerte súbita de microalgas y disminuir la producción de oxígeno al aumentar la demanda bioquímica de oxígeno por parte de las bacterias degradadoras.
- Disco de Secchi: Existe una relación inversa entre la visibilidad del disco y la abundancia de fitoplancton. A medida que el plancton aumenta la visibilidad disminuye.

El registro de los parámetros físico-químicos destacados anteriormente, indicarán los niveles de producción mínimos y se podrá asociar la productividad si se monitorean sus variaciones a través del tiempo; sin excluir la supervisión de dichos parámetros durante el proceso de aclimatización y en el momento de la siembra. A partir de lo anterior, se podrán realizar los ajustes al medio, siempre y cuando se mantengan los límites adecuados que permitan obtener las mejores condiciones de confort para los camarones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rangos adecuados de los parámetros físico-químicos y biológicos del agua para el cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

Parámetros	Nivel
Oxígeno disuelto (Mín), mg/L	4,0
Temperatura, °C	25-30
Salinidad, ppmil	15-25
pH del agua	7,0-8,0
Amoníaco (Mín), mg/L	0,10
Alcalinidad (Mín), mg/L	80,0
Disco de Secchi, cm	35-40

Cuéllar-Anjel *et al.* (2010) y Alfaro (2004).

Un inadecuado manejo de las características mencionadas sobre la calidad del agua, puede producir un gran estrés en los animales que se encuentran presentes en los sistemas productivos (Balcázar 2002), provocando la proliferación de agentes oportunistas que generan enfermedades infecciosas (Gullian y Rodríguez 2002; Trujillo *et al.* 2005), siendo las de origen bacteriano de las principales causantes del deterioro de la salud de *L. vannamei*.

3.3. Caracterización de la Vibriosis en los sistemas de cultivo para camarón

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae*, especialmente las del género *Vibrio*, se han identificado como las mayores responsables de pérdidas económicas en la camaronicultura (Gullian y Rodríguez 2002; Ibarra *et al.* 2003; Villegas 2004; Burge *et al.* 2007; Vankateswora 2009; Mayer 2010).

El tipo de producción artificial del camarón crea ambientes que favorecen la proliferación y adaptación de poblaciones bacterianas, que forman parte de la flora normal de los animales (Álvarez *et al.* 2000; Trujillo *et al.* 2005; Mayer 2010). Estas bacterias se caracterizan principalmente por encontrarse suspendidas en el

medio acuático, esperando la oportunidad (Gómez *et al.* 1998; Trujillo *et al.* 2005; Decamp *et al.* 2008; Morales 2008) de que ocurra una alteración en el sistema inmune de los animales para ocasionarles una enfermedad infecciosa (Roque *et al.* 1998a). Por otro sentido, se reconoce la importancia de algunas bacterias para conservar el suelo y el agua en condiciones normales, ya que son las encargadas de eliminar detritos y reciclar nutrientes (Leyton y Riquelme 2008; Morales 2008).

Morales (2008) menciona que factores como la genética, la contaminación del medio ambiente y la intensificación de los métodos de producción, estresan a los camarones y los hace susceptibles a las enfermedades. Las especies del género *Vibrio* spp. pueden ingresar al organismo de los camarones por medio del consumo de algún material infectado o por medio de heridas, encontrando un medio idóneo para su desarrollo, especialmente en los intestinos ya que se produce mayor cantidad de materia orgánica que la presente en el agua (Leyton y Riquelme 2008). Además algunas bacterias al generar exotoxinas pueden romper las paredes intestinales e infectar las células inmunológicas del camarón (Mayer 2010), aunque Varela (comm. pers.) reconoce que primero se afectan los órganos como el hepatopáncreas.

Entre las especies de *Vibrio* que se han identificado en la acuicultura de camarón, se mencionan: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterrani*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. splendidus* y *V. vulnificus*, entre otras (Rojlorsakul *et al.* 1998; Ibarra *et al.* 2003; Vankateswora 2009). Estas bacterias pueden ocasionar mortalidades de hasta un 100% de los cultivos a las 24 horas de iniciada la infección (Alfaro 2004; Trujillo *et al.* 2005; Mayer 2010). Las especies *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* están consideradas como las más perjudiciales al ser causantes de la vibriosis (Morales 2008; Heidarieh *et al.* 2010; Mayer 2010).

Tanto *V. harveyi* como *V. parahaemolyticus* son bacterias Gram negativas (Alfaro 2004); *V. harveyi* se localiza principalmente en ambientes marinos y puede

ocasionar epizootias en las producciones acuícolas (Villegas 2004), es una bacteria luminosa y una de las causantes de gran cantidad de mortalidades a nivel larval (Vankateswora 2009).

Ganesh *et al.* (2010) enfatizan que la turbidez y la materia orgánica son determinantes en la distribución de *V. parahaemolyticus* en el agua de los estanques; donde el abono orgánico, fertilizantes, densidad poblacional alta y desperdicio de alimento son los principales precursores del medio óptimo para su desarrollo. Además, es el responsable de brotes de gastroenteritis aguda en humanos debido al consumo de mariscos afectados (Ganesh *et al.* 2010) y al igual que *V. harveyi* su reservorio son las aguas salinas (Dabanch *et al.* 2009).

En general, de acuerdo a Morales (2008), los signos clínicos que ocasionan las bacterias del género *Vibrio* en los camarones son: letargo (disminución de la actividad normal), nado errático, permanencia en el fondo del tanque y mortalidades masivas y como consecuencia de lo anterior, presencia de aves en la zona que se alimentan de éstos. Al inicio de la patología, se presenta opacidad muscular y tracto digestivo vacío, en la fase final se puede observar expansión de cromatóforos, hepatopáncreas inflamado y luminiscencia en los animales (Trujillo *et al.* 2005; Morales 2008; Mayer 2010). En el análisis en fresco, se puede observar atrofia del hepatopáncreas, desprendimiento celular, células con núcleos hipertrofiados, coloración pálida, melanización, picnosis en hemocitos y núcleos hipocrómicos (Morales 2008).

A pesar de lo anterior, se considera que el camarón posee un sistema inmunológico eficiente y con la suficiente capacidad para poder protegerlo de los agentes patógenos presentes en su ambiente natural y bajo condiciones normales de cultivo (Jiravanichpaisal *et al.* 2006; Barracco *et al.* 2008). Sin embargo, se reconoce que posee un sistema inmunitario que no es específico y sin capacidad de memorizar (Rendón y Balcázar 2003; Alfaro 2004; Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

3.4. Inmunología del camarón

La inmunología del camarón se enfatiza principalmente en las reacciones celulares como la fagocitosis, nodulación y encapsulación, pero además, implica las reacciones humorales y los productos de los sistemas que involucran enzimas, como la coagulación y la melanización (Cedano y Olmos 2003; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Los efectores celulares y humorales, se encargan de eliminar los microorganismos que pueden provocar algún tipo de infección (Rendón y Balcázar 2003) y son considerados como parte de sistema inmune innato presente en los crustáceos (Jiravanichpaisal *et al.* 2006; Barracco *et al.* 2008).

La hemolinfa (análoga a la sangre y la linfa de los vertebrados) contiene los componentes del sistema inmunológico (Barracco *et al.* 2008) y está constituida por plasma y hemocitos, los cuales tienen la capacidad de fagocitar, encapsular, formar nódulos y hasta provocar citotoxicidad (Söderhäll y Cerenius 1992; Jiravanichpaisal *et al.* 2006) en presencia de una enfermedad infecciosa y es considerada como una de las reacciones más importantes que ejerce el sistema inmunológico (Alfaro 2004, Burgents *et al.* 2005; Burge *et al.* 2007).

Se han identificado tres tipos de hemocitos (Johansson *et al.* 2000, Rendón y Balcázar 2003; Jiravanichpaisal *et al.* 2006): (1) los hialinos (H) que no poseen gránulos pero sí poseen la capacidad de fagocitar, iniciando la defensa contra los patógenos mediante la coagulación; (2) los semigranulosos (SG) con muchos gránulos pequeños en el citoplasma y pueden fagocitar, encapsular y liberan el sistema profenoloxidasa proPO (encargado de la melanización) y por último (3) los hemocitos granulosos que tienen grandes gránulos citoplasmáticos, que almacenan las enzimas que conforman el sistema proPO y realizan encapsulación.

En lo que respecta al sistema proPO, se localiza en el interior de los gránulos de los hemocitos granulosos y semigranulosos (Rendón y Balcázar 2003)

y se activa cuando se presenta material patógeno, generando varias proteínas que participan en la melanización, pero además, producen citotoxicidad, encapsulación, adhesión y fagocitosis (Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

La formación de melanina inicia al activarse la enzima fenoloxidasa por medio del sistema proPO, el cual es mediado por una cascada de proteasas y es considerado un importante medio de defensa contra los ataques de agentes patógenos (Cerenius y Söderhäll 2004). Por su parte, Barracco *et al.* (2008) destacan que la melanización representa el final de un proceso inmunofector altamente potente.

El sistema proPO genera moléculas muy tóxicas, como las quinonas, hemiquinonas y radicales libres de oxígeno, que provocan eventualmente la eliminación de los microorganismos invasores (Barracco *et al.* 2008). Mientras que Lee y Söderhäll (2002) mencionan que el sistema funciona mediante la activación de la PO a partir de la proPO, mediado por una enzima activadora (EA) que se encuentra también en los gránulos, pero solo actúa cuando la concentración de calcio oscila entre 7-10 mM en plasma. La PO oxida los aminoácidos que poseen núcleos aromáticos, los cuales, mediante un proceso de reticulación se transforman en quinonas, y luego en melanina, con fuerte poder bactericida (Cerenius y Söderhäll 2004).

Ante la necesidad de proteger los cultivos, en los últimos años se han buscado alternativas para incrementar la resistencia de los camarones y protegerlos de las bacterias y virus que están en constante acecho. Lo anterior se lograría mediante el fortalecimiento del sistema inmunológico y se destaca la utilización de inmunoestimulantes como una opción natural de defensa (Gullian y Rodríguez 2002; Smith *et al.* 2003; Barracco *et al.* 2008).

3.5. Sustancias naturales y su efecto inmunoestimulador en camarones.

Las sustancias inmunoestimulantes son principalmente extraídas de lipopolisacáridos, péptidoglicanos, hongos, levaduras, y algas (Rendón y Balcázar 2003), pero últimamente se ha valorado el uso de los extractos esenciales de plantas, como inmunoefectivos en camarones (Citarasu *et al.* 2006).

No obstante, Barracco *et al.* (2008) señalan que no es recomendable una activación continúa de las respuestas inmunológicas como forma de prevenir infecciones debido al riesgo de causar daños en los tejidos por la constante exposición de sustancias tóxicas no específicas y que son liberadas para eliminar patógenos. Preferiblemente lo que se quiere al utilizar inmunoestimulantes es lograr un aumento en la inmunocompetencia de los animales, que logre una mejor capacidad de respuesta cuando se presentan microorganismos infecciosos, sin embargo, lo aconsejable sería utilizar aditivos que logren activar el sistema inmunológico para que reaccione rápido y pueda soportar el ataque de las enfermedades en determinados momentos (A. Varela comm. pers.).

Los oligosacáridos poseen la capacidad de estimular la microflora intestinal y de secuestrar bacterias patógenas, ya que las adhesinas o lecitinas de éstos se unen especialmente a los carbohidratos que conforman a los oligosacáridos (Santomá 1998). Por lo que al estar incluidos en la flora intestinal se reduce la fijación de las bacterias en los carbohidratos presentes en las paredes intestinales de los animales, principalmente las Gram negativas y adicionalmente modulan el sistema inmune y mejoran el desarrollo de la mucosa intestinal (Curiquén y González 2006).

En este aspecto, los manano-oligosacáridos (MO) son considerados los azúcares que poseen mayor capacidad de adherencia frente al material infeccioso y se extraen principalmente de la pared celular externa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Santomá 1998; Curiquén y González 2006).

Por su parte, los extractos esenciales obtenidos de las diversas plantas son componentes volátiles de origen natural que pueden ser extraídos por los métodos de destilación, principalmente por medio de destilación al vapor (Dorman y Deans 2000). Según Benchaar *et al.* (2008) se puede localizar en las hojas, flores, tallos, semillas, raíces y corteza.

Los extractos esenciales poseen una gran variedad de propiedades. Se puede mencionar que no sólo reducen el crecimiento de las bacterias, sino que también poseen la capacidad de inhibir la germinación de esporas y pueden alterar la producción de toxinas al perturbar la patogenicidad de las bacterias (Castillejos 2005). Enfatizando sobre las propiedades de los productos naturales, Prieto *et al.* (2005) resaltan su uso para la profilaxis y terapia en los organismos acuáticos, ya que se reduce considerablemente la contaminación de las aguas y los costos siempre serán menores que si se hiciera uso de productos sintéticos.

Existe una gran variedad de extractos esenciales, principalmente las mezclas de terpenoides, específicamente monoterpenoides (C_{10}) y sesquiterpenoides (C_{15}) (Oh *et al.* 1968), igualmente pueden localizarse en diterpenoides (C_{20}). Los aceites esenciales obtenidos de extractos de plantas también pueden incluir: hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres cíclicos, lactonas y excepcionalmente nitrógeno y compuestos que contienen azufre y cumarinas (Dorman y Deans 2000).

Según Varela (comm. pers.), uno de los más utilizados en la acuicultura de camarón a nivel internacional y en Costa Rica ha sido el ajo (*Allium sativum*). La allicina presente en el ajo es conocida por sus propiedades antiparasitaria, insecticida, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, y su actividad antimicrobiana actúa contra un amplio espectro de gram-positivas y gram-negativas, siendo ésta su más destacada función (Reuter *et al.* 1996; Prieto *et al.* 2005) debido a que disuelven los lípidos que protegen a las bacterias (Villamar 2000).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos bioensayos de seis (Bioensayo 1) y catorce días (Bioensayo 2) en el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) en la Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, durante Junio y Agosto del 2011.

La infraestructura destinada al desarrollo de esta investigación consistió en un laboratorio de acuarios acondicionado con seis tanques de almacenamiento de aproximadamente 900 litros de capacidad cada uno, aireación suministrada por un blower de 2,5 hp y un compresor. Las unidades experimentales consistieron en peceras de vidrio de 40 x 40 x 40 cm, para un total de 64 litros y de los cuales se utilizó solo el 78% de la capacidad total. Estas estuvieron apoyadas en estantes metálicos de dos y tres niveles. Las peceras fueron cubiertas con una tapa de malla plástica y marco de madera para evitar la fuga de animales y la caída de los mismos en otras peceras o al suelo.

El agua utilizada fue donada por el Parque Marino del Pacífico, la cual fue extraída del mar en la localidad de Puntarenas y filtrada a 70 μm ; con una salinidad de 35 ppm. Ésta se almacenó en seis tanques y diez reservorios con capacidad de 900 y 425 litros, respectivamente. Dicha agua fue trasladada a las peceras por medio de una bomba de agua sumergible de 1.5 hp y filtrada nuevamente a 100 μm para evitar el ingreso de partículas alojadas durante el traslado.

4.1. Camarones experimentales

Los juveniles de *L. vannamei* utilizados para el estudio se recolectaron en las fincas Cerro Mar 3 (primer ensayo) y Caraito 2 (segundo ensayo), ubicadas en la zona de Colorado de Abangares (10° 16' 55" Latitud Norte 84° 57'42" Longitud Oeste), Guanacaste, Costa Rica. Previo a su recolección se analizó una

muestra de diez camarones por medio de la metodología de análisis en fresco (Cuéllar 2008), se implementó el examen clínico como un mecanismo que avaló un estado de salud óptimo antes del traslado. La muestra para el estudio fue de 120 animales por ensayo distribuidas en 20 peceras; el primer experimento con rangos de pesos entre 7,83 a 10,00 g, con promedio de $8,85 \pm 0,59$ (media \pm D.E); el segundo experimento con rangos de 6,67 a 8,67 g, promedio de $7,80 \pm 0,55$ (media \pm D.E).

4.2. Aclimatización y acondicionamiento en acuarios

Luego de recolectar los camarones en horas de la mañana (6-7 am) y de manera aleatoria por medio de una atarraya, y al presentarse en los estanques valores iniciales promedio de temperatura de $30,2^{\circ}\text{C}$; salinidad de 24 ppm y oxígeno disuelto en 3 mg/L; se acondicionaron lentamente en bolsas con agua filtrada. Esta agua fue modificada para que tuvieran en promedio $25,5^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 24 ppm de salinidad y una saturación de oxígeno de 23,8 mg/L. Lo anterior para prepararlos y trasladarlos a la mayor brevedad posible hasta el CIMAR, tratando de disminuir al máximo el estrés provocado.

Paralelamente, en el área experimental del CIMAR, el agua de los reservorios tanto para recibir a los camarones como para su eventual recambio fue aireada y se midió la salinidad con un salinómetro durante todo el experimento; tratando de conservar las mismas características físicas y químicas.

Al recibir los camarones en el área experimental ubicada en el CIMAR, se aclimataron por espacio de dos días en dos reservorios de 425 litros y cubiertos con tapas de malla plástica. Las bolsas, que contenían el agua y los animales se vaciaron lentamente distribuyendo 60 individuos en cada uno, con el fin de ambientarlos a las nuevas condiciones y descartar enfermos o débiles. Luego se igualaron paulatinamente las temperaturas y salinidades del agua contenidas en las bolsas y acondicionadas previamente en el laboratorio, las cuales presentaban

una temperatura de 27°C, una salinidad de 35 ppm y una concentración de oxígeno disuelto de 6 mg/L. El proceso anterior duró aproximadamente 90 min. y no se observaron mortalidades. Posterior a esto, se agregó alimento balanceado con 30% de proteína cruda (PC).

Luego de la aclimatización, se trasladaron los animales aleatoriamente a las peceras que poseían aireación y temperatura controlada, la primera producida por un sistema central de ventilación y distribuida mediante la utilización de piedras difusoras; mientras el segundo utilizando termostatos (Anexo 4a). El primer bioensayo presentó rangos de oxígeno entre 4,24 y 4,39 mg/L, con promedio $4,33 \pm 0,04$ (media \pm D.E), temperatura de 29,46 y 30,28°C, con promedio $29,97 \pm 0,21$ (media \pm D.E); mientras que el segundo bioensayo mostró rangos de oxígeno de 4,68 y 4,95 mg/L, con promedio $4,81 \pm 0,84$ (media \pm D.E), temperatura de 29,17 y 30,20°C, con promedio $29,54 \pm 0,34$ (media \pm D.E); en ambos casos la salinidad fue de 35 ppm (Anexo 4b). Tanto para medir el oxígeno como la temperatura se utilizó un oxigenómetro portátil (YSI 55, Yellow Springs Instrument) mientras que la salinidad se midió con un refractómetro (SR6, Vital Sine).

Con el fin de mantener las condiciones óptimas de la calidad del agua, se realizó un recambio manual diario del 15%, sifoneando desde el fondo, lo que mantuvo constantes los siguientes parámetros durante la alimentación: pH, $7,86 \pm 0,08$ (media \pm D.E.); NH_3 , ≤ 1 ppm; NH_3^- y NH_2^- , 0 ppm; las últimas tres medidas con un *Kit* comercial. Además, los camarones fueron sometidos a un fotoperiodo de 12 h de luminosidad y 12 h de oscuridad (iniciando a las 6:00 h y finalizando a las 18:00 h).

4.3. Preparación de dietas y régimen de alimentación

Durante los periodos experimentales de catorce y seis días, los camarones fueron alimentados con los tratamientos definidos por la mezcla del concentrado

comercial (Cuadro 2) y los diferentes productos naturales seleccionados, siendo la dosificación de acuerdo a la recomendación de las casas fabricantes.

Cuadro 2. Perfil nutricional del alimento comercial utilizado para alimentar a *L. vannamei* en ambos periodos experimentales.

	Perfil Nutricional	
	Alimento comercial	Proteína Cruda.....
	Humedad	12% máx.
	Grasa Cruda	5% mín.
	Fibra Cruda	5% máx.
	Energía Digestible.....	2950 Kcal/kg.
	Cenizas.....	15% máx.
	Calcio	0,95% máx.
	Calcio	0,70% mín.
	Fósforo.....	0,90% mín.
	Sal (NaCl)	2,50% máx.
	Sal (NaCl)	1% mín.

Las dietas, conformadas por el alimento balanceado, los aditivos comerciales y el aceite de pescado que se utilizó para facilitar el proceso de recubrimiento, se prepararon individualmente de acuerdo a las recomendaciones para cada uno de los aditivos, con la finalidad de formar los tratamientos que fueron utilizados durante los ensayos. A cada aditivo se le agregó el aceite y luego el alimento balanceado se combinó con la preparación anterior. Adicionalmente se formuló una dieta control a partir de alimento concentrado y aceite de pescado.

Con base en lo anterior, 150 gramos de alimento balanceado fue preparado por triplicado, conteniendo individualmente cada una de ellas 0,45 g de manano-oligosacáridos, 3 g de ajo molido y 0,3 g de extracto de plantas; todas adicionadas con 10 ml de aceite de pescado (Anexo 4c). Posterior a la preparación, se secó el alimento durante 20 min. en un horno a 60°C; luego se dejó reposar a temperatura

ambiente por otros 20 min. y finalmente se llevó a 4°C durante 5 min., con la finalidad de acelerar el proceso de secado. Por último, las dietas fueron empacadas en bolsas plásticas dobles y almacenadas en recipientes plásticos para conservar sus características nutricionales.

Los camarones de cada pecera fueron alimentados con un equivalente al 4% del peso vivo; siendo suministradas diariamente dos veces, a las 9:00 y 17:00 h (Anexo 4d).

4.4. Tratamientos

Los tratamientos seleccionados fueron tres productos cuyos ingredientes principales son extractos obtenidos a partir de plantas y levaduras. Fueron seleccionados de acuerdo a sus cualidades para promover la actividad del sistema inmunológico (Curiquén y González 2006) y por poseer funciones antibactericidas (Prieto *et al.* 2005). Los tratamientos se incorporaron al alimento comercial balanceado de forma homogénea y utilizando aceite de pescado como medio envolvente, además se empleó como tratamiento control el uso de alimento sin ningún tipo de aditivo. Los anteriores tratamientos se describen a continuación:

T0: Alimento comercial (control) + aceite de pescado (66,4 ml/Kg.).

T1: Alimento comercial + manano-oligosacáridos (*Saccharomyces cerevisiae*) (3 g/Kg.) + aceite de pescado (66,4 ml/Kg.).

T2: Alimento comercial + ajo (*Allium sativum*) (20 g/Kg.) + aceite de pescado (66,4 ml/Kg.).

T3: Alimento comercial + mezcla de extractos de plantas (2 g/Kg.), cada gramo contiene = *Azadirachta indica* (270mg), *Eclipta alba* (135 mg), *Phyllanthus amarus* (135 mg), *Terminalia chebula* (135 mg), *Yasada bhasma* (100 mg), *Cichorium intybus* (113 mg), *Terminalia arjuna* (56 mg), *Solanum nigrum* (56 mg) + aceite de pescado (66,4 ml/Kg.).

4.5. Examen clínico y análisis en fresco

El examen clínico fue realizado por el encargado del laboratorio de camarón de la Cooperativa COONAPROSAL. R.L, al momento de la recolección de los animales en las fincas establecidas.

De acuerdo a la metodología de Cuéllar (2008), se examinaron diez animales y a éstos se les observó el color, tamaño del cuerpo comparado con el resto de la población (enanismo), expansión de cromatóforos, deformidad en rostro, abdomen o apéndices, flexión del músculo abdominal, color de las branquias (amarillas, marrón o negras), color de los apéndices (pereiópodos, pleópodos y urópodos), color de las antenas, presencia de edemas en apéndices u otras partes del cuerpo (Figura 1), transparencia de los músculos del abdomen y del cefalotórax, repleción intestinal (porcentaje del intestino que se encuentra lleno), textura del exoesqueleto (duro o blando), tono del músculo abdominal (firme o flácido) manchas, heridas, color del esófago y estómago (anaranjado sugiere canibalismo y mortalidad), presencia de moco sobre la cutícula (resbaloso o áspero al tacto) y laceraciones.

Seguidamente y después de revisar la condición fisiológica inicial de los camarones, se enviaron las muestras para el análisis en fresco de los camarones al Laboratorio de Patología y Microbiología de la Cooperativa COONAPROSAL R.L. Según la técnica descrita por Morales (2008), se pesaron inicialmente los camarones para obtener el peso promedio, luego se seleccionó una porción de tejido u órgano mediante una disección y se colocaron individualmente en un portaobjetos limpio, inmediatamente se le adicionó una gota de agua de mar estéril y se colocó el cubreobjetos. Mediante un microscopio compuesto con objetivos de 4, 40, y 100 X, se buscaron alteraciones causadas por parásitos y patógenos en las branquias, hepatopáncreas, intestino y músculo.

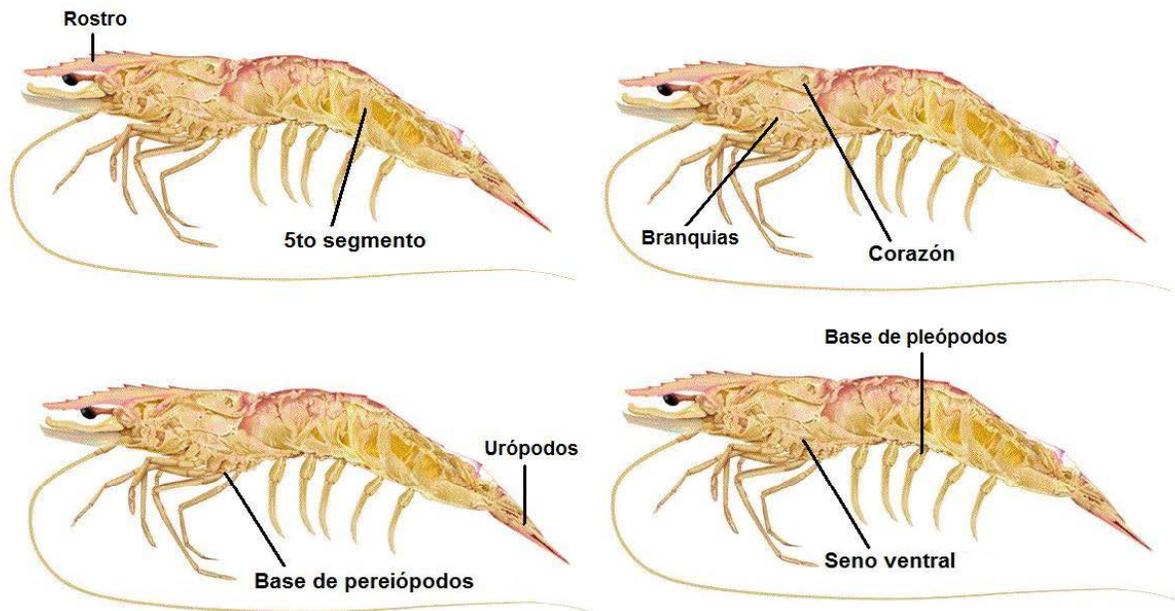


Figura 1. Anatomía externa del *Litopenaeus vannamei*, donde se observan los principales sitios de evaluación metodológica realizados en los periodos experimentales de seis y catorce días. Alday y Flegel (1999).

4.6. Cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

Se recibió la donación de las suspensiones de *Vibrio parahaemolyticus* por parte del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, las cuales fueron obtenidas a partir de la cepa ATCC 17802.

Se desafiaron los camarones inyectándoles una suspensión bacteriana, obtenida a partir de la dilución en solución salina estéril de un concentrado bacterial al estándar de turbidez 0,5 de Mc Farland. Los camarones se inocularon mediante inyección intramuscular, entre el tercer y cuarto segmento abdominal (Figura 1) con una jeringa estéril de 1 cc y con aguja de calibre 29x½ (evitó traumatismos excesivos). Se utilizaron 20 microlitros (N. Rojas comm. pers.) de

una solución de bacterias de $0,5 \times 10^8$ UFC/ml (ensayo 1) y $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (ensayo 2), conteniendo $1,0 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^6$ UFC/camarón respectivamente.

4.7. Parámetros Inmunológicos

Se realizaron análisis de hemograma total, coagulación de la hemolinfa y bacteriología en camarones moribundos, los cuales presentaban cambio en el comportamiento al inclinarse de medio lado, observándose diferencias en la coloración debido a los procesos de necrosis e infiltración hemocítica en la región inoculada. De igual manera, se fijaron los camarones destinados a histología cuando presentaron las características mencionadas anteriormente.

4.7.1. Hemograma

Empleando la técnica descrita por Cuéllar (2008), se extrajo hemolinfa del seno cardíaco (Figura 1) e inmediatamente se procedió al montaje en una cámara de Neubauer para realizar el conteo total de hemocitos (CTH) utilizando un microscopio óptico. El número de hemocitos totales es expresado en millones de células por mililitro.

4.7.2. Tiempo de coagulación de hemolinfa

Se empleó la técnica recomendada por Varela (comm. pers.), que consistió en la extracción de hemolinfa del hemocele de animales a los que se les sometió a una mínima manipulación para evitar estrés. Se introdujo la jeringa descartable de insulina entre los dos quintos pereiópodos (Figura 1), en un ángulo de aproximadamente 30° . La aguja penetró únicamente la cutícula y el tejido subyacente, debido a la superficialidad del hemocele; inmediatamente se colocaron dos o tres gotas de hemolinfa en un portaobjetos, y se agitó con la aguja de la misma jeringa, hasta evidenciar la formación de coágulos. Bajo condiciones

normales, la hemolinfa debe presentar un tiempo de coagulación menor a un minuto.

4.7.3. Bacteriología de hemolinfa

Se empleó la técnica descrita por Cuéllar (2008), la cual consistió en utilizar solo camarones vivos para la prueba. Se desinfectó el área de punción (seno hemolinfático ventral) con alcohol al 70%. Con una jeringa para insulina (1 mL) nueva y estéril con aguja hipodérmica, se extrajeron 100 μ L de hemolinfa y se sembraron completamente en agar TCBS (tiosulfato citrato bilis sal sacarosa) el cual es selectivo diferencial para bacterias del género *Vibrio* sp.

Una vez inoculados los 100 μ L de muestra sobre el agar elegido y en condiciones asépticas se extendió circularmente mediante el uso de un asa de Drigalski previamente flameada, para obtener una distribución homogénea del inóculo. Seguidamente se invirtió la caja de Petri y se incubó a una temperatura de 35°C por 24 horas. Revisando la presencia o ausencia de bioluminiscencia cada 12 horas. Posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) que se presentaron en cada placa utilizando como método la observación directa (a trasluz).

4.7.4. Mortalidad Acumulada (M.A.)

Después de inoculados los camarones y al mostrar síntomas como inclinación de medio lado, nado errático, poca reacción o coloración rojiza, se contabilizaron las muertes de animales a las 5 y 10 h post-infección, donde se obtuvieron los porcentajes de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{M.A. (\%)} = \frac{\text{No. de animales muertos}}{\text{No. de animales inoculados}} \times 100$$

4.8. Parámetros Zootécnicos

4.8.1. Ganancia de peso (GP)

Se pesaron los animales de cada pecera con una balanza electrónica con una precisión de 0,1 g al inicio y final de cada experimento (Anexo 4e). Posteriormente se obtuvo la diferencia y se calculó el porcentaje de ganancia de peso con respecto al peso inicial. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$GP (\%) = \frac{(Pf - Pi) \times 100}{Pi}$$

Donde:

GP (%): Porcentaje de ganancia de peso total; Pi: Peso inicial; Pf: Peso final.

4.8.2. Conversión alimenticia (C.A.)

Se pesó por pecera la cantidad de alimento suministrado a los camarones en una balanza electrónica con una precisión de 0,001 g. Al final de cada periodo experimental se contabilizó el total de alimento suministrado diariamente. Igualmente, los camarones se pesaron procurando eliminar el exceso de agua que los cubría y se registró la información. Luego el valor acumulado del consumo de alimento concentrado se dividió por la ganancia de peso final registrada por pecera.

La fórmula empleada para medir éste parámetro fue la siguiente:

$$C.A. = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Ganancia de peso}}$$

4.9. Histología

La histología se realizó en la sección de Patologías del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE), Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) de Costa Rica.

Para la fijación, preparación de los animales e histología, se siguió la metodología empleada por Cuéllar (2008). Se utilizó el fijador de Davidson en animales vivos o moribundos, nunca muertos, inyectándose en hepatopáncreas, cefalotórax y en músculo. Luego, se realizó un corte en la cutícula (Anexo 4f), paralela a la línea medial, con la finalidad de facilitar la penetración del fijador; luego se sumergió todo el camarón en el mismo fijador manteniendo una relación de 1:10 (camarón-fijador) durante 12-24 horas. Por último, se trasladaron a etanol al 70%. Posterior a la fijación, se remitió la muestra al LANASEVE para su procesamiento, realizando la deshidratación de los tejidos y su inclusión en parafina, formando bloques que fueron cortados en micrótomos a tres micras de espesor. Los cortes fueron colocados en un baño de recuperación y los tejidos seleccionados se capturaron con una lámina portaobjetos. Por último se realizó la tinción de los tejidos mediante la Técnica de Gram (Søgaard *et al.* 2007) y se analizaron los cortes observándose en un microscopio óptico.

4.10. Prueba con *Sensidiscos* o discos de sensibilidad

Se realizó una variación de la Técnica Kirby-Bauer (Sacsquispe y Velásquez 2002) la cual está diseñada para probar la sensibilidad anti-microbiana para microorganismos no exigentes y de crecimiento moderadamente alto. Lo anterior se efectuó con la finalidad de verificar de forma cualitativa y preliminar algún efecto antibacterial de los tres productos en evaluación, sobre las bacterias presentes en el agua.

Se inocularon 100 µL del agua utilizada en las peceras sobre agar TCBS y en condiciones asépticas se extendió circularmente mediante el uso de un asa de Drigalski, para obtener una distribución homogénea del inóculo. Seguidamente se invirtió la caja de Petri y se incubó a una temperatura de 35°C por 24 horas.

Después de comprobarse la presencia de colonias en el agua que contenía camarones inoculados con *V. parahaemolyticus*, se preparó un litro de agua destilada con un gramo diluido de cada uno de los tres productos. Posterior a esto se impregnaron tres discos de papel filtro color blanco de un diámetro de 6.5 mm con las soluciones anteriores y se colocaron sobre la superficie de una placa con agar Müller-Hilton, la cual se encontraba previamente inoculada con 1 cc del agua utilizada en las peceras. A la vez, se incubó la placa de forma invertida a 35°C durante aproximadamente 18-24 h. Para su interpretación solo se evaluó de forma cualitativa la presencia de halo de inhibición alrededor de los discos de papel filtro, sin catalogarse como sensible, intermedio y resistente.

4.11. Estadística

4.11.1. Metodología estadística

Se generó la información empleando un diseño de bloques completos al azar, donde los bloques correspondían a la gradiente ocasionada por la luminosidad (fotoperiodo) y en donde se utilizaron cinco bloques (Anexo 4g). Cada bloque correspondió a un nivel de cada estante con cuatro unidades experimentales distribuidos equitativamente y con cinco repeticiones.

Se incluyeron dos periodos experimentales manteniendo la metodología descrita anteriormente, verificando la respuesta inmunológica de los camarones con respecto a los tratamientos y considerando el uso de productos naturales ante un desafío con *Vibrio parahaemolyticus*. Una vez obtenidos los datos, cada

periodo fue analizado individualmente de acuerdo al efecto producido por los bloques y tratamientos.

4.11.2. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se evaluaron por pecera, siendo estas peso final, ganancia de peso, conversión alimenticia, porcentaje de mortalidad acumulada a las 5 y 10 horas post-infección, conteo de hemocitos total, tiempo total de coagulación de la hemolinfa y conteo bacteriológico en hemolinfa.

Los datos se procesaron por medio de un análisis de varianza ANOVA, con el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (2003). La ecuación estadística empleada fue el siguiente:

$$Y_{ik} = \mu + \beta_j + T_k + e_{ik}$$

Donde:

Y_{jk} = Variables de respuesta de j-ésima unidad experimental asociado al k-ésimo tratamiento.

μ = Media general.

β_j = Efecto del j-ésimo bloque.

T_k = Efecto del k-ésimo tratamiento.

e_{jk} = Error experimental.

Se realizó un análisis comparativo de las medias entre tratamientos con la prueba de Duncan, considerando una significancia de $\alpha=0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Análisis general de camarones evaluados

De acuerdo al examen clínico y análisis en fresco inicial que se efectuó en ambos grupos de camarones (Anexo 1 y 2), los resultados mostraron niveles diferentes de infestación de gregarinas, desde ninguna detección hasta en algunos casos un número mayor de 100 gregarinas por campo visual. Se presentó un nivel de ectoparásitos leve en lamelas branquiales con presencia de *Zoothamnium* sp. y *Epistylis* sp., sin melanosis o necrosis asociada.

Los túbulos del hepatopáncreas presentaron niveles altos de lípidos, la coagulación de la hemolinfa estuvo por debajo de un minuto y no se detectaron lesiones causadas por virus o bacterias.

De acuerdo a la información anterior y lo descrito por Cuéllar (2008) se concluyó que los animales presentaban una condición sanitaria general apta para el inicio de los experimentos. Los mismos, estaban libres de la enfermedad que se pretendía reproducir y sin signos clínicos que demostraran la presencia de otra patogenicidad.

5.2. Parámetros Inmunológicos

Para las variables que se determinaron en los bioensayos 1 (seis días) y 2 (catorce días), que correspondían a los parámetros inmunológicos, no se determinaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($P > 0,05$).

5.2.1. Hemograma

Después de seis días de suministrar los diferentes tratamientos, el conteo total de hemocitos fue mayor en T1 al obtener $41,07 \pm 7,56 \times 10^5$ cel/ml. En este

caso T2 ($35,29 \pm 9,25 \times 10^5$ cel/ml) obtuvo el conteo más bajo (Figura 2A). A pesar de lo anterior, la variación de los datos obtenidos no demuestra una diferencia numérica marcada, sin embargo, al analizar el efecto producido por el tratamiento control (T0) se observa en promedio mayor cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa que las dietas que contenían aditivos adicionales, como fue el caso del ajo y los extractos de plantas. Lo anterior es contrario a lo que se esperaba, principalmente debido a que de manera preliminar los tratamientos T2 y T3 debieron resultar en mejores resultados, de acuerdo a su composición y características principales; esto asociado a lo expuesto por Prieto *et al.* (2005) que indica que la función más destacada del ajo es la actividad antimicrobiana.

Por otro lado, durante el periodo de catorce días el conteo más alto de hemocitos obtenido del hemograma fue para el tratamiento que contenía ajo con $55,76 \pm 2,41 \times 10^5$ cel/ml. Sin embargo se presentó una diferencia con respecto a T0 de alrededor de un 26,5%. Los tratamientos compuestos por T1 y T3 mostraron valores inferiores respecto a T0 y T2; por otro lado, hay similitud entre los valores promedios obtenidos de T1 ($36,55 \pm 9,09 \times 10^5$ cel/ml) y T3 ($36,84 \pm 12,65 \times 10^5$ cel/ml), teniendo una diferencia menor al 1% (Figura 2B).

Por efecto de las bacterias patógenas que fueron inoculadas a nivel muscular (Anexo 4h), se dio una disminución de la cantidad de hemocitos presentes en la hemolinfa debido a la migración de estos al punto donde se promovió la afectación y como respuesta inmunológica, en concordancia con lo descrito en la literatura (Burgents *et al.* 2005; Yeh y Chen 2008).

Del proceso anterior resultan la fagocitosis, encapsulación, nodulación, activación del sistema proPo, liberación de péptidos antimicrobianos, lisozima, entre otros (Chang *et al.* 2000; Johansson *et al.* 2000; Rodríguez y Le Moullac 2000; Cerenius y Söderhäll 2004; Jiravanichpaisal *et al.* 2006; Burge *et al.* 2007; Dantas *et al.* 2009), lo que causó un proceso inflamatorio (Smith *et al.* 2003).

Según Rodríguez y Le Moullac (2000) lo anterior está asociado a las principales funciones de los hemocitos, al cicatrizar heridas e iniciar el proceso de coagulación, y como recursos utilizados para contener la propagación de partículas infecciosas que lograrán entrar al hemocele (Smith *et al.* 2003).

Jiravanichpaisal *et al.* (2006) mencionan que como respuesta a la presencia de microorganismos se da una disminución de los hemocitos pero que después de algún tiempo vuelven a la normalidad, situación que no se logró determinar en los ensayos de este estudio, ya que no fue posible realizar los hemogramas a través del tiempo, principalmente debido a la velocidad de reacción de los camarones ante el desafío y al equipo reducido de personal experimentado en la ejecución del análisis.

Por otro lado, Smith *et al.* (2003) mencionan que los estudios realizados donde se utilizan inmunoestimulantes han logrado afectar los conteos de hemocitos, misma respuesta observada para los productos utilizados en la presente investigación, donde se determinó un aumento hemocitario a los catorce días de T2 en comparación a los otros tratamientos.

A la vez, se presentó el mismo efecto por parte de T1 a los seis días, pero que no sobrepasó en más del 13% a los otros productos evaluados como inmunoestimulantes. Lo anterior se podría deber a una rápida activación inmunológica de los camarones o bien, a un mejor desarrollo y producción de células en el órgano hematopoyético, que según Johansson *et al.* (2000) y Jiravanichpaisal *et al.* (2006), ya está demostrado que es el órgano productor de hemocitos y que éstos se desprenden de forma continua pero a niveles variables en la circulación y después de su maduración.

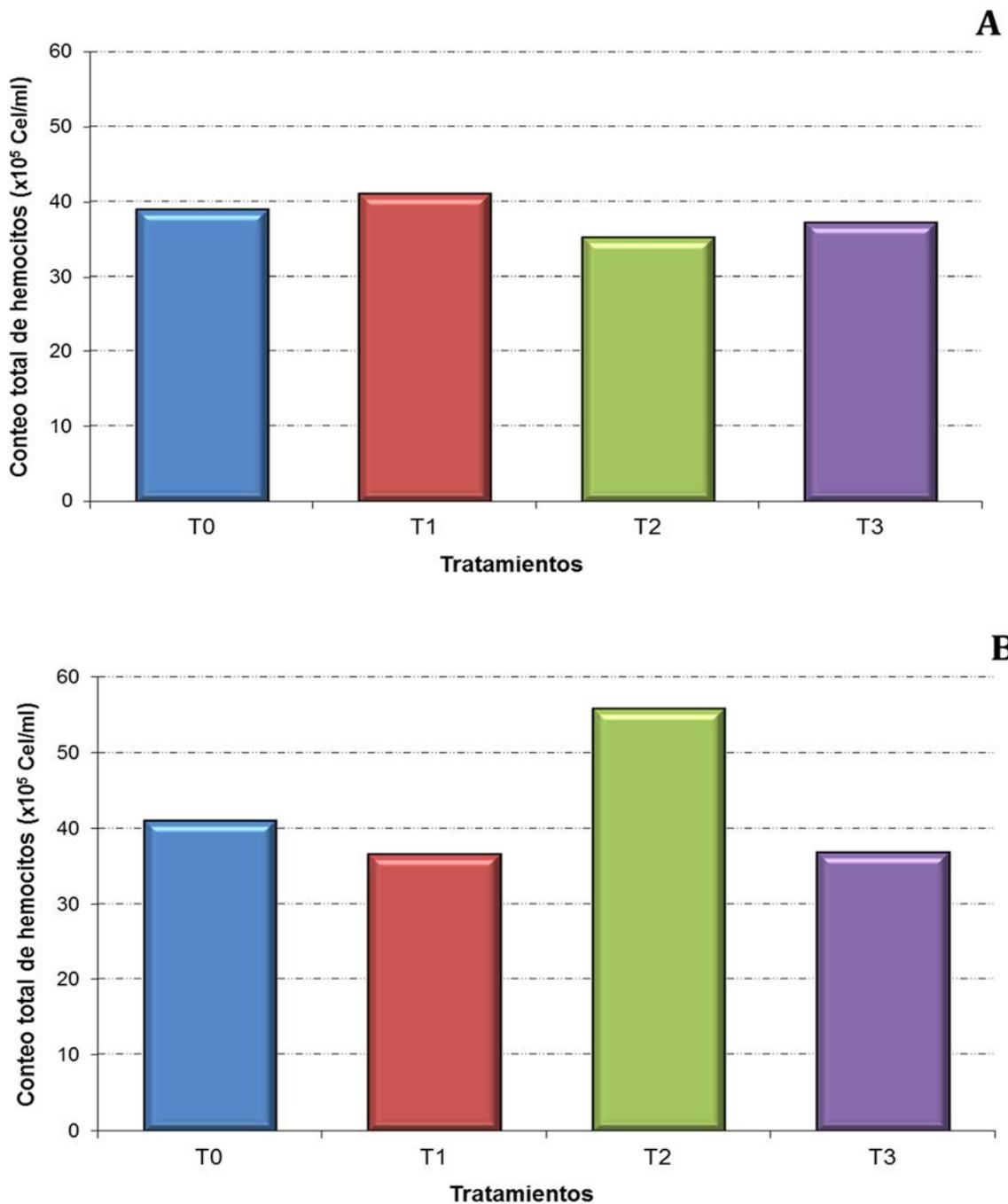


Figura 2. Medias de los conteos totales de hemocitos realizados en *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

La investigación ejecutada por Dantas *et al.* (2009), donde se realizó conteo total de hemocitos en crustáceos mostraron una disminución considerable después de la inyección de bacterias. Por otro lado, Burge *et al.* (2007) expusieron una disminución del 45% en las primeras cuatro horas, adicionadas a un 23% a las 48 h post-infección. Lo anterior aunado a lo publicado por Rodríguez *et al.* (2000), quienes mostraron valores finales de hasta 5×10^6 hemocitos/ml, coincidiendo con los resultados expuestos en ambos bioensayos; pero determinados por una respuesta fisiológica que varía individualmente de acuerdo a la respuesta ante la infección, estrés ambiental o a la actividad endocrina durante el ciclo de muda (Johansson *et al.* 2000; Dantas *et al.* 2009).

Lo anterior se podría comparar a lo observado en este estudio donde se presentó en los animales muda, melanización y estrés de manejo asociado principalmente a la expansión de cromatóforos.

5.2.2. Coagulación

Al comparar la coagulación obtenida de los diferentes tratamientos aplicados en los camarones evaluados durante el primer trabajo experimental (Figura 3A), resultó el promedio menor para la dieta de T1 ($34,40 \pm 9,73$ s). Por otro lado, los tratamientos T0, T2 y T3 muestran valores muy similares y no se encontró diferencias estadísticas entre tratamientos ($P > 0,05$): $38,20 \pm 6,90$ s; $39,00 \pm 21,17$ s y $39,10 \pm 8,73$ s; para cada uno respectivamente.

Con respecto al tiempo de coagulación evaluado en el segundo periodo, hubo un incremento sustancial de éste aunque sin diferencia estadística en el tratamiento compuesto por T1 con respecto a los otros ingredientes utilizados (Figura 3B), pero dentro del valor permitido para esta variable (A. Varela comm. pers.). Los camarones alimentados con T1 duraron $48,50 \pm 25,01$ s para lograr la coagulación de la hemolinfa; a la vez T3 provocó una disminución de 9,50 s con respecto a T1.

La coagulación más rápida fue para el ajo ($34,20 \pm 18,14$ s) aunque la diferencia presentada con respecto al tratamiento control fue alrededor de un segundo, siendo prácticamente semejantes pero logrando una mejor respuesta en relación al tratamiento donde se suministró manano-oligosacáridos.

Aunque no se encontró información detallada del tiempo mínimo para determinar una coagulación apropiada en camarones, Varela (comm. pers.) menciona que lo ideal es un minuto de tiempo, aunque indica que algunos especialistas permiten hasta minuto y medio. Dado lo anterior y según las pruebas realizadas los tratamientos que tenían manano-oligosacáridos y ajo mostraron los mejores valores, el primero en periodos cortos y el segundo en periodos prolongados.

Dado lo anterior y en vista de la importancia de esta variable para preservar el estado de salud en *L. vannamei*, la disminución en el tiempo de coagulación asociado T2 y utilizado en periodos mayores a catorce días podría ser la mejor opción, lo que coincide con las conclusiones presentadas por Prieto *et al.* (2005).

Unido a esto, la importancia de la coagulación radica en que es una reacción que evita la pérdida de hemolinfa a través de las heridas (Lee y Söderhall 2002) y ayuda en la captura de microbios que ingresan, a la vez que reducen su propagación por todo el hemocele (Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Además, el tiempo de coagulación está relacionado directamente con los niveles de patógenos invasores que ingresan generalmente por medio de heridas, donde se genera, una activación secuencial de los factores de coagulación que finalizan con la formación de coágulos (Lee y Söderhall 2002).

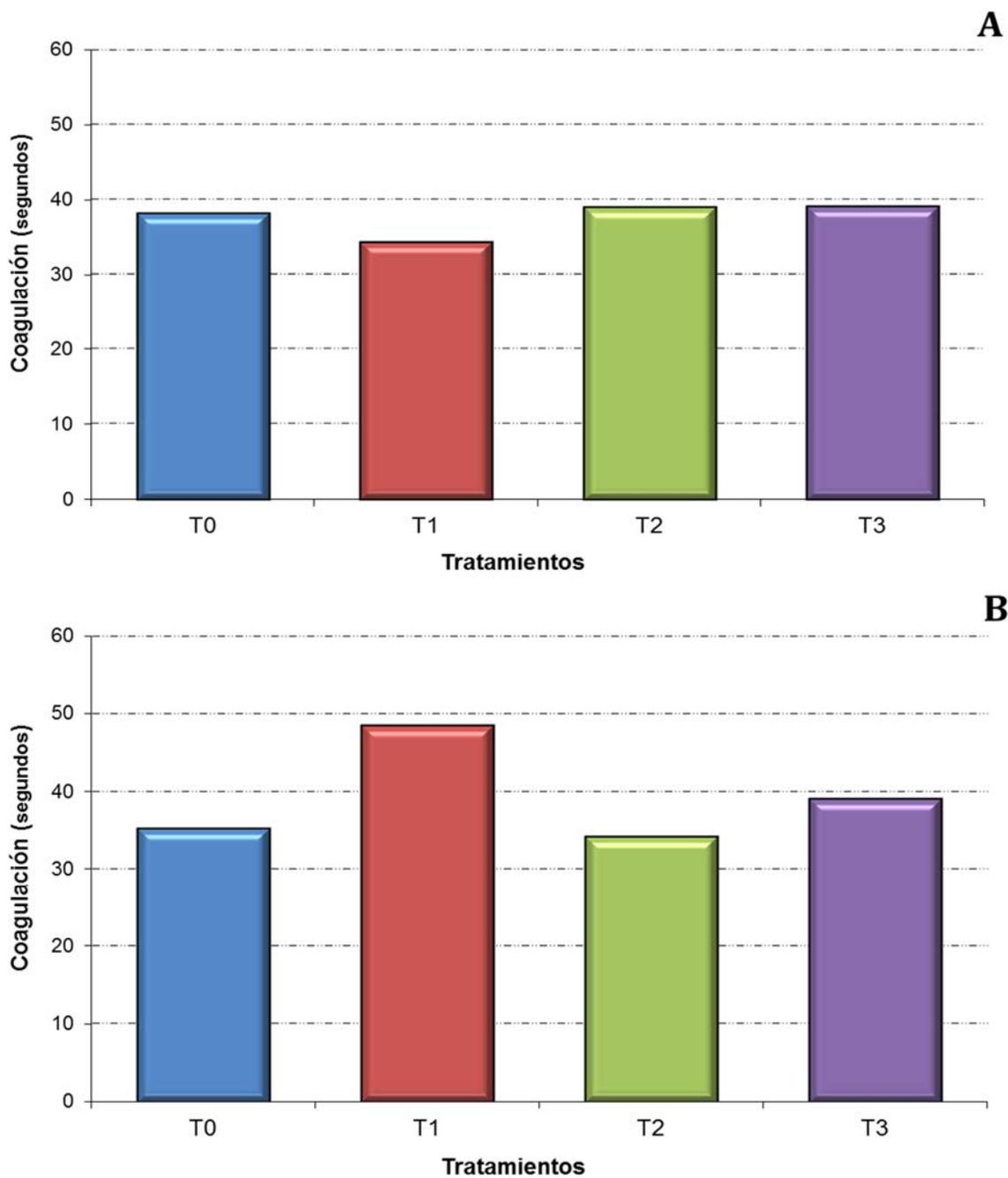


Figura 3. Medias de la coagulación determinadas en *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

5.2.3. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Al analizar la cantidad de UFC en el bioensayo 1, el tratamiento que mostró los conteos mayores fue para T1 con $4,44 \pm 8,10 \times 10^3$ UFC/ml (Figura 4A), igualmente, se observó una disminución de UFC para el tratamiento control, ajo y extractos de plantas con respecto a T1 de 39, 46 y 56%, respectivamente; a pesar de lo anterior los valores fueron similares entre sí ($P > 0,05$).

A la vez, en el bioensayo 2, los resultados mostraron una alta diferencia en los valores obtenidas de T2 y T3. T3 presentó un conteo de alrededor de $3,40 \pm 2,77 \times 10^3$ UFC/ml de hemolinfa, representando alrededor del 22% del valor obtenido en T2 (Figura 4B), revelando una aparente resistencia de los animales más elevada hacia las bacterias cuando se utilizó el alimento suministrado con ajo. Sin embargo, en T1 y T0 se observaron valores similares a T2 ($15,4 \times 10^3 \pm 20,65 \times 10^3$), con una diferencia menor a 25 y 38% respectivamente. A los catorce días fue evidente una menor capacidad de reacción por parte del tratamiento que contenía la combinación de extractos de plantas en comparación a la información obtenida de los otros productos.

Se determinó que los camarones que presentaron los conteos promedios más altos obtuvieron una mayor resistencia, lo que podría deberse a una mayor reproducción y distribución de las bacterias por el organismo de los camarones para lograr su deceso, coincidiendo con Roque *et al.* (1998b) donde según estos, las bacterias se multiplican y producen toxinas letales que si no son eliminadas por los camarones causan la muerte. De acuerdo a Pantoja (2005), quien indica que niveles altos de bacterias abruma el sistema inmune del camarón sucumbiendo rápidamente a la enfermedad; se podría considerar que T1 y T2 lograrían presentar una mayor fortaleza inmunológica post-infección a los seis y catorce días, respectivamente.

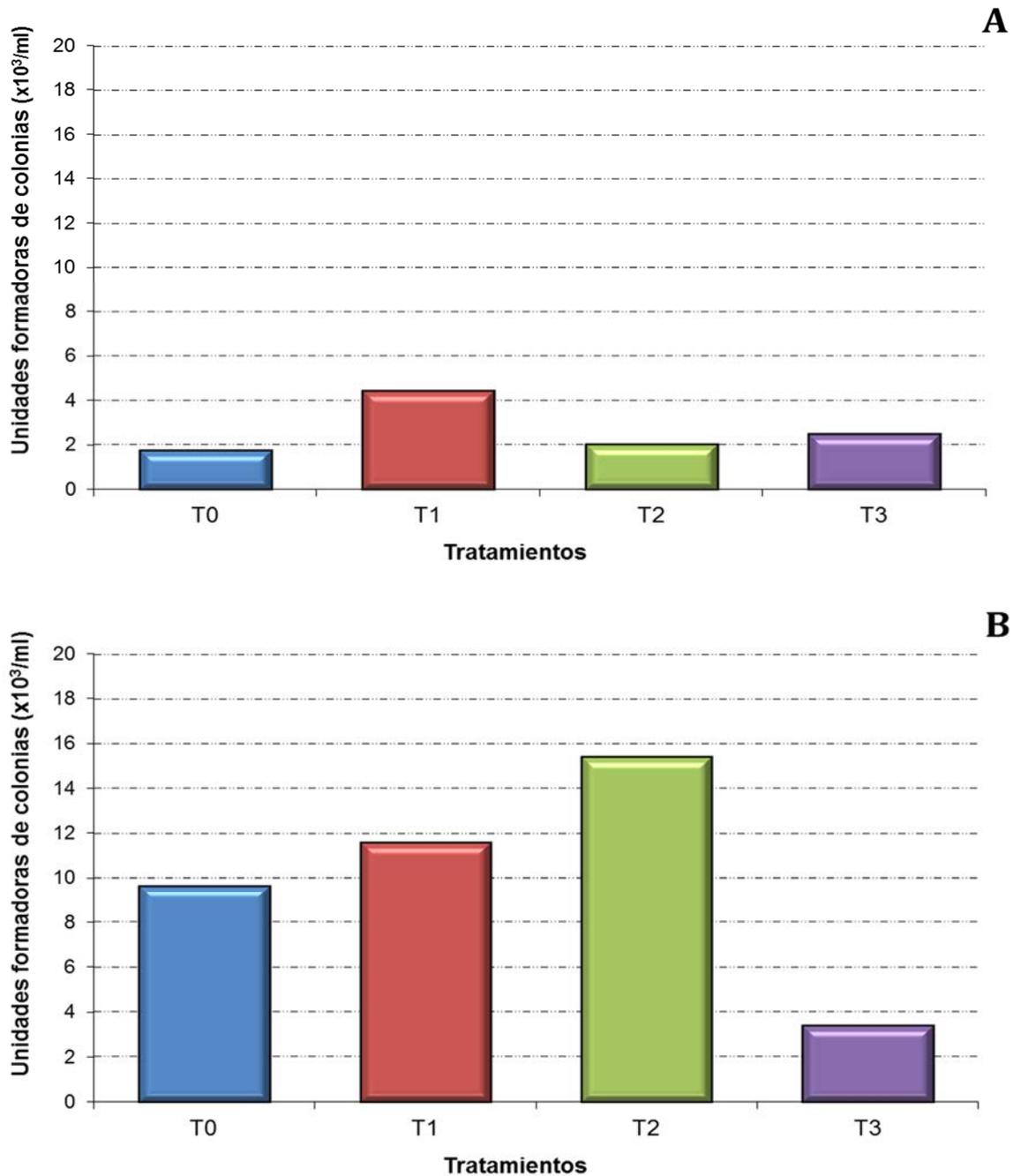


Figura 4. Medias del conteo total de Unidades Formadoras de Colonias realizadas en *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/ camarón.

Rodríguez y Le Moullac (2000), detallan la capacidad inhibitoria del crecimiento de las bacterias por parte de la hemolinfa cuando se ejecuta su cuantificación a través del tiempo. En este sentido, algunos estudios muestran como a través del tiempo la actividad antimicrobiana de la hemolinfa puede lograr disminuir la cantidad de patógenos presentes al aplicar un producto con propiedades inmunoestimulantes o al causar una determinada respuesta inmune, como por ejemplo los glucanos, *S. cerevisiae* (Scholz *et al.* 1999), sulfuro (Hsu y Chen 2007), carragenatos (Yeh y Chen 2008), entre otros.

Durante el conteo de las bacterias se observaron casos de crecimiento de colonias amarillas y verdes en TCBS, probablemente debido al cambio de pH generado por el uso de sucrosa producto de la contaminación de otras bacterias (Cuéllar 2008). Esto podría deberse a la población diversa de bacterias fermentadoras de sucrosa presente en los tejidos del camarón o bien, por la contaminación de bacterias localizadas en el entorno (Gómez *et al.* 1998) que logran contaminar las placas antes de colocarlas en la incubadora.

Sin embargo, un estudio donde se desafió a *L. vannamei* por medio de un baño con *V. parahaemolyticus* indicó que al realizar el conteo en TCBS, alrededor del 20% del total de *Vibrio* sp. formó colonias amarillas (Roque *et al.* 1998b), lo que indicaría una alta probabilidad de crecimiento de este tipo de bacterias bajo estas condiciones.

5.2.4. Mortalidad acumulada

Las medias de la mortalidad acumulada que se presentó en el análisis donde se inyectó 1×10^6 UFC/camarón, mostraron una alta similitud (sin diferencias estadísticas) entre todos los tratamientos a las 5 y 10 h post-infección. Al registrar las muertes de camarones a las 5 h existió menos de un 7% de fallecimientos, donde T3 mostró alrededor de un 6% contrario a T1 que no presentó fatalidades (Figura 5B). Para T0 y T2 la cantidad de animales afectados mortalmente por el

inóculo fue igual (3,2%). Por otro lado, se mantuvo la relación existente de mortalidad acumulada entre tratamientos después de transcurridas 10 h desde el inicio del desafío (76 a 79%), a excepción del tratamiento control que parece que sufrió a través del tiempo mayor efecto negativo de las bacterias, ya que alrededor del 86% de los animales murieron.

Cuando se inocularon los animales con 3×10^6 UFC/camarón, y al tener una mayor concentración de bacterias, se observó que la mortalidad acumulada a las 5 h post-infección presentó porcentajes altos de decesos en casi todos los tratamientos, alcanzando en algunos casos valores cercanos al 50%. Los menores porcentajes de fallecimientos se dieron para T3 (34%) y T0 (37%), mientras que los tratamientos T2 y T1 presentaron respectivamente 45 y 47% de muertes respecto al número inicial (Figura 5B). Luego de 10 h de exposición al inóculo, se dio un 100% de animales fallecidos en los tratamientos control y el representado por extractos de plantas, mientras que en T1 y T2 la mortalidad acumulada estuvo entre el 93 y 96%, observándose una leve resistencia hacia las bacterias.

La mortalidad estuvo determinada por la reacción surgida principalmente por el efecto ante las bacterias. Se consideró que en las primeras horas post-infección (5 h) los camarones tuvieron una respuesta acelerada (hiper-reacción) ante los patógenos invasores lo que tal vez generó una deficiencia inmunológica y se vio representada con una mayor mortalidad a las 10 h; efecto asociado a lo expresado por Maldonado (2003) y Cuéllar (2008). De acuerdo a lo anterior en ambos bioensayos se observó que los camarones que mantuvieron una menor mortalidad al inicio presentaron mayores muertes al final, al contrario, el grupo de camarones que en inicio declinaron con mayor facilidad lograron mantener una mayor sobrevivencia.

Las células circulantes pueden ocasionar respuestas inflamatorias que amplifican las reacciones inmunes ante una invasión microbial, liberando sustancias autolíticas y citotóxicas inducidas de una manera no específica

(Maldonado 2003), como el caso de la peroxinectina que se genera a partir de la activación del sistema proPO (Cuéllar 2008). Dicho autor menciona que las moléculas altamente tóxicas que se producen para combatir los agentes invasores, también generan daño al tejido del hospedero. Dado lo anterior, se estableció que los camarones que soportaron la reacción inicial presentaron mejores expectativas de sobrevivencia y relacionado estrechamente a los tratamientos empleados.

La patogenicidad de las bacterias determinó la mortalidad de los camarones, aunque estuvo asociada indirectamente a la cantidad de bacterias inoculadas. Lo anterior quedó demostrado en el estudio realizado por Roque *et al.* (1998b). En otro estudio se observó cuando se utilizó *V. penaeicida* (Pantoja 2005), mortalidades del 100, 95 y 90% cuando se utilizaron concentraciones de 5×10^5 , 1×10^4 y 5×10^4 UFC/camarón, respectivamente, y asociado a lo expuesto con anterioridad .

La mayoría de investigaciones realizaron desafíos por medio de inmersión de camarones con preparaciones que contenían *Vibrio* sp. (Scholz *et al.* 1999; Trujillo *et al.* 2005; Heidarieh *et al.* 2010). Contrario a lo anterior, el presente estudio utilizó como técnica la inoculación por medio de inyección intramuscular (Roque y Guerra 1998b), debido a su rapidez de acción y obtención de información en un periodo corto de experimentación. Sin embargo, al comparar la información obtenida en esta investigación, al final en la mayoría de los casos se presentaron altas mortalidades para el tratamiento que ejerció como control; lo que significaría que una diferencia en la composición de la dieta convencional ocasionaría un cambio en la capacidad de respuesta del camarón, ante una situación que lograra poner en riesgo su salud.

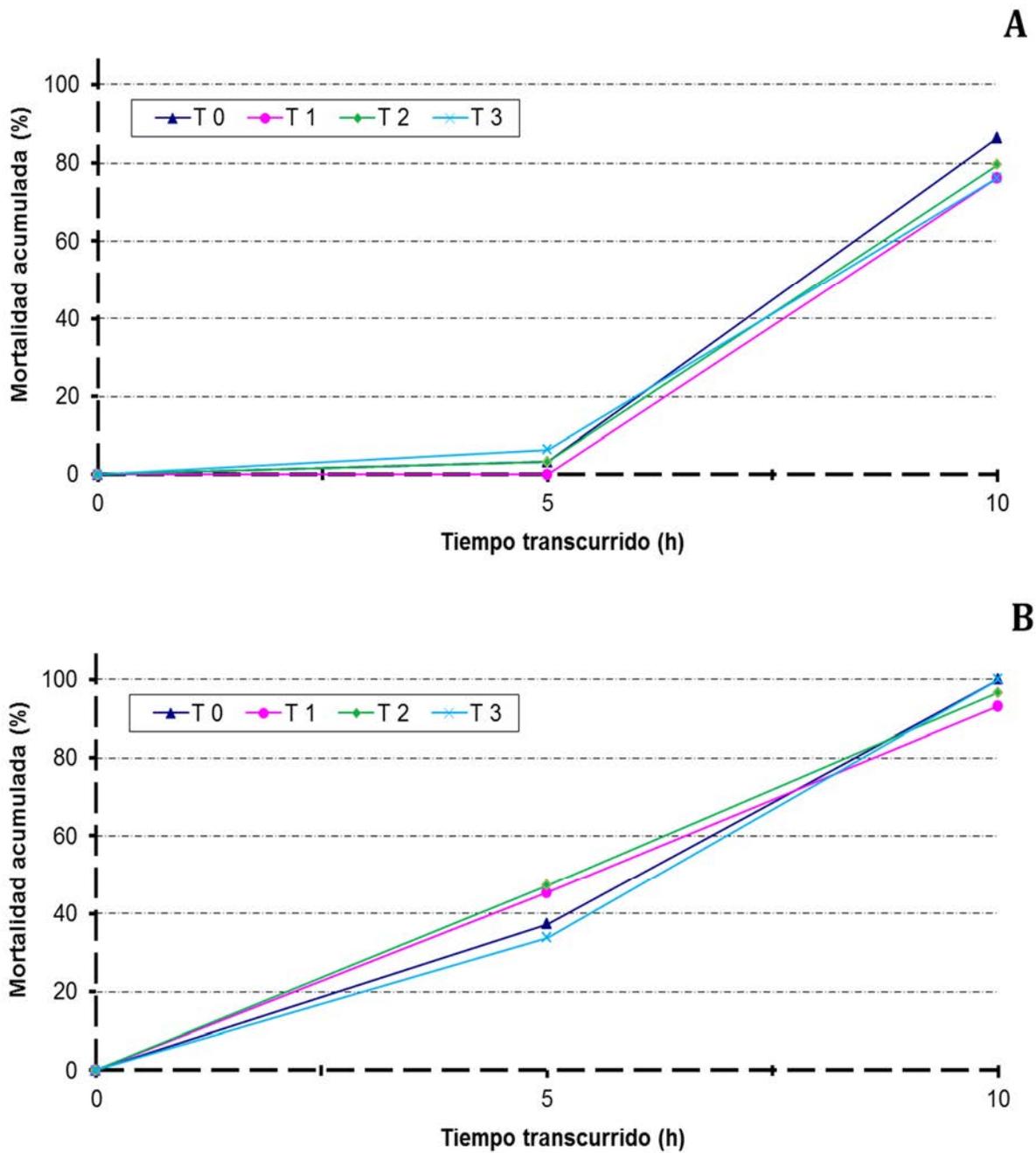


Figura 5. Medias de las mortalidades acumuladas obtenidas de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

Lo expuesto con anterioridad demuestra que al utilizar en la dieta algún aditivo obtenido a partir de un producto natural, puede lograr un cambio considerable en la salud de los camarones cuando están expuestos a niveles excesivos no solo de bacterias sino también de virus, hongos y parásitos (Barracco *et al.* 2008).

Dichos autores también mencionan que los inmunoestimulantes tienen el propósito de aumentar la resistencia natural, a la vez que minimizan el uso de agentes terapéuticos químicos como antibióticos; del mismo modo, deja claro que no se quiere un sistema inmunológico activo continuamente sino un estado de mayor inmunocompetencia, donde los camarones tengan mayor capacidad y rapidez en su respuesta ante patógenos.

Al analizar todas las variables en conjunto (hemograma, coagulación, UFC y mortalidad acumulada) e individualmente a los seis y catorce días (Anexo 3) como lo realizó Rodríguez *et al.* (2000), se observó que en el bioensayo de más días, T2 fue mejor en CTH, UFC y coagulación, mientras que en la sobrevivencia final estuvo entre los menores porcentajes junto a T1.

A los seis días T1 mostró los mejores valores en todos los parámetros inmunológicos analizados, pero con valores muy cercanos a los otros tratamientos.

5.3. Parámetros Zootécnicos

Las ganancias de pesos y las conversiones alimenticias presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) en el periodo de seis días del bioensayo 1; no obstante en la fase que duró catorce días las variables evaluadas no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0,05$).

5.3.1. Ganancia de Peso

Los pesos finales obtenidos del bioensayo que duró seis días, demostraron que el tratamiento conformado por T2 ($54,3 \pm 1,9$ g) fue estadísticamente mejor que T3 ($P < 0,05$). Sin embargo, no fue diferente del tratamiento control ni de la dieta que contenía T1. A la vez, los resultados obtenidos de T3 ($47,0 \pm 6,3$ g) fueron similares a T0 y T1 (Cuadro 3A).

Los camarones alimentados con T1 obtuvieron un valor del 8,8 g de ganancia de peso, superando en más de un 15% a los demás tratamientos que fueron evaluados y llegando a promediar datos porcentuales similares al periodo experimental que se extendió por catorce días (Cuadro 3B). Contrario a lo anterior, los tratamientos restantes resultaron en valores inferiores al 5% de ganancia de peso e inclusive se obtuvo un valor negativo para esta variable en T0 (-0,4%), lo que indica un autoconsumo por parte de los camarones. Posiblemente aunado al estrés producido por el manejo general y a los niveles reducidos de oxígeno que se presentaron esporádicamente, que habrían provocado una inadecuada conversión del alimento consumido o una reducción de la ingesta. Por consiguiente y dado lo anterior, se podrían determinar en general que si existieron efectos positivos debido a la inclusión de los diferentes aditivos en las dietas.

Durante el periodo de catorce días se promediaron ganancias de peso entre $7,25 \pm 4,03$ y $10,25 \pm 2,22$ g. Aunque no se dieron diferencias estadísticas (Cuadro 3B), las medias reflejaron valores por encima de los esperados en la realidad, ya que en condiciones normales de cultivo se esperan incrementos semanales de un gramo para cada animal (López 2010) y al finalizar la fase experimental se obtuvo un incremento promedio de 4,5 g en cada semana. Lo anterior se debió probablemente a las condiciones idóneas en las que se desarrolló esta etapa de la investigación asociado a los aditivos incorporados en el alimento concentrado.

Cuadro 3. Medias del peso inicial, final y ganancia de peso (g) obtenidas de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con diferentes dietas.

A

Tratamiento	PI	PF	GP	Δ%
T0	49,0	48,8	-0,2 ^b	-0,4
T1	47,0	49,3	2,3 ^b	4,9
T2	45,5	54,3	8,8 ^a	1,3
T3	46,0	47,0	1,0 ^b	2,1

B

Tratamiento	PI	PF	GP	Δ%
T0	52,0	62,0	10,0	19,2
T1	55,0	65,3	10,3	18,7
T2	51,8	59,0	7,3	14,0
T3	52,8	61,0	8,3	15,6

^{a,b} Letras diferentes en una misma columna difieren entre si (P<0,05).

A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón.

B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

T0: control, T1: manano-oligosacáridos, T2: ajo, T3: extractos de plantas

PI: peso inicial, PF: peso final, GP: ganancia de peso, Δ%: incremento porcentual

Al utilizar dietas con *S. cerevisiae*, β-glucanos y *Phaffia rhodozyma*, se demostró (Scholz *et al.* 1999) que después de siete semanas no se presentaron diferencias significativas en los pesos finales de los animales, sin embargo la biomasa final si presentó diferencias entre los tratamientos, obteniendo los mejores resultados la dieta compuesta por β-glucano. Al considerar el origen natural de los aditivos anteriores y al asociarlos con los evaluados en la investigación realizada, se enfatiza la importancia de este tipo de productos para lograr un incremento acelerado en las ganancias de peso de los camarones.

Cuando se analizó la inclusión (Dantas *et al.* 2009) de probióticos (*Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*), para evaluar su efecto ante la infección de *V. harveyi*, el tratamiento control (sin probiótico) obtuvo las mejores ganancias de peso, considerando la condición natural (autótrofos y heterótrofos) de los camarones y valorando la posibilidad de que ya estaban acondicionados a la presencia de microbios. De lo anterior se podría entender, la necesidad de conocer el comportamiento alimenticio y las condiciones generales de cultivo antes de iniciar pruebas de este tipo y que sean similares a las presentadas en estos bioensayos. Sin embargo, de los resultados obtenidos en el periodo de catorce días (Cuadro 3B), las ganancias de peso demuestran que fueron mejores a las presentadas normalmente en los estanques de cultivo, lo que hace pensar que un cambio en las condiciones actuales de manejo en los estanques muestreados, podrían ocasionar mejorías en los parámetros zootécnicos que generalmente se monitorean y cuyo resultado final sería la maximización de las ganancias económicas.

5.3.2. Conversión alimenticia

Según la prueba de Duncan las medias de T1 y T2 fueron estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) para la conversión alimenticia en el periodo determinado por seis días; siendo el tratamiento al que se le incorporó ajo mejor que MO, obteniendo una conversión alimenticia de $1,40 \pm 0,63$ y $4,53 \pm 2,25$ respectivamente. Por otro lado, el tratamiento control y T3 ($3,23 \pm 1,16$) no fueron diferentes de T1 ni de T2 (Cuadro 4A). Respecto al bioensayo 2, las medias fueron $4,82 \pm 2,08$; $3,17 \pm 1,20$; $3,12 \pm 0,73$ y $2,96 \pm 0,90$ respectivamente para T2, T0, T1 y T3 (Cuadro 4B).

Los resultados del tratamiento control en el bioensayo que duró seis días presentaron una conversión alimenticia muy variable, reflejando una dispersión muy elevada de los datos analizados; lo anterior posiblemente se debió a que en algunas de las repeticiones los camarones tuvieron una reducida ganancia de

peso, asociada al estrés provocado por el manejo y a los episodios esporádicos que sucedieron en la disminución del oxígeno. De los resultados del trabajo de Rodríguez *et al.* (2000), se desprende que la condición fisiológica de los animales sufre alteraciones luego de su estadía en los tanques de experimentación, siendo semejante a la misma conclusión para la presente investigación.

Cuadro 4. Medias de la conversión alimenticia obtenidas de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con diferentes dietas.

A			B		
Tratamiento	Media	D.E	Tratamiento	Media	D.E
T0	2,64 ^{ab}	11,87	T0	3,17	1,20
T1	4,53 ^a	2,25	T1	3,12	0,73
T2	1,40 ^b	0,63	T2	4,82	2,08
T3	3,22 ^{ab}	1,16	T3	2,96	0,90

^{a,b} Letras diferentes en una misma columna difieren entre si (P<0,05).

D.E: Desviación Estándar

A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón.

B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

T0: control, T1: manano-oligosacáridos, T2: ajo, T3: extractos de plantas

Por otro lado, Scholz *et al.* (1999) no encontraron diferencias en la tasa de conversión alimenticia al utilizar en las dietas *S. cerevisiae*, β -glucanos y *Phaffia rhodozyma*, contrario a lo presentado en esta investigación, donde queda claro un efecto de los tratamientos suministrados a los seis días de evaluación, liderado ampliamente por el ajo. Respecto a este tratamiento, no presentó por sí mismo un efecto directo en la conversión del alimento ni en la ganancia de peso; sino más bien y de acuerdo a lo expuesto por Prieto *et al.* (2005) y lo obtenido en estos bioensayos, podría mejorar a corto plazo la absorción intestinal, ya sea eliminando las bacterias o los parásitos presentes en esta región; a la vez, al influir

positivamente en la inmunología, lograría mejorar la condición sanitaria del camarón y como resultado final una mayor capacidad de ingestión de los alimentos.

5.4. Histología

El análisis histopatológico realizado en los camarones seleccionados mostró información que fue evaluada de modo descriptivo, analizando reacciones producidas por la inoculación bacterial.

En los periodos experimentales que se extendieron por seis y catorce días se realizaron análisis en 24 y 21 camarones respectivamente, específicamente en branquias, epitelio cuticular, glándula antenal, hepatopáncreas, intestinos, órgano linfoide, tejido hematopoyético, músculo, gónadas, tejido nervioso, tejido conectivo y corazón. En todas las estructuras anteriores se hallaron anomalías propias ante las infecciones provocadas por bacterias del género *Vibrio* sp.

Indiferentemente del tratamiento de donde se obtuvieron las muestras, se agruparon las lesiones de acuerdo a la estructura que fue analizada, obteniéndose de lo anterior los siguientes resultados:

El hepatopáncreas presentó festoneo tubular poco pronunciado, presencia de bacterias, edema, nódulos hemocíticos melanizados en los senos hemales intertubulares, infiltración hemocítica y exfoliación de células epiteliales necróticas (Figura 6A, B, C, D).

En el órgano linfoide se generaron núcleos picnóticos, fibrosis generalizada, dilatación de los senos hemolinfáticos conteniendo abundante material eosinofílico, moderada infiltración de hemocitos, melanosis y necrosis parenquimal con pérdida de estructura tisular. Además se observó dilatación de arterias, picnosis parenquimal y endotelial, presencia de bacterias en senos hemolinfáticos

y senos intersticiales, cariomegalia hipocrómica, colonización bacterial abundante con necrosis coagulativa en regiones endoteliales, hipereosinofilia, licuefacción parenquimal, células vacuolizadas, nódulos hemocíticos con presencia de necrosis y formación de esferoides tipo I, II y III (Figura 6E, F, G, H).

Con respecto al músculo, se presentaron áreas extensas de mionecrosis coagulativa y licuefactiva de las fibras musculares, nódulos hemocíticos melanizados multifocales, tejido destruido, pérdida de estriaciones e hipereosinofilia, infiltración de hemocitos degenerados, alta cantidad bacterial con presencia en intermiocitos, fibrosis, algunos focos puntuales de infiltración hemocítica en espacios interfasciculares, picnosis difusa, y algunos casos con ausencia o presencia inflamatoria (Figura 6I, J, K, L).

En el corazón se formaron nódulos hemocíticos multifocales melanizados, con presencia en tejido miocárdico, proliferación de fibroblastos e infiltración de hemocitos, picnosis periférica, picnosis difusa de tejido miocárdico, fagocitos capturando células picnóticas y escasas agregaciones hemocíticas (Figura 7A, B, C, D).

Las branquias mostraron nódulos hemocíticos multifocales, picnosis periférica, leve infiltración de hemocitos donde se observaban algunos de éstos picnóticos en espacios vasculares, procesos fagocíticos, núcleos picnóticos, melanosis y necrosis en lámelas branquiales (Figura 7E, F, G, H). En la glándula antenal se desarrollaron nódulos hemocíticos con presencia en laberinto, tejidos periféricos y en la región del celomasaco, también melanosis en tejido conectivo, podocitos picnóticos y en algunos casos presentando compresión nucleolar, agregación hemocítica, prominente dilatación de los senos hemolinfáticos, picnosis e infiltración hemocítica difusa (Figura 7I, J, K, L).

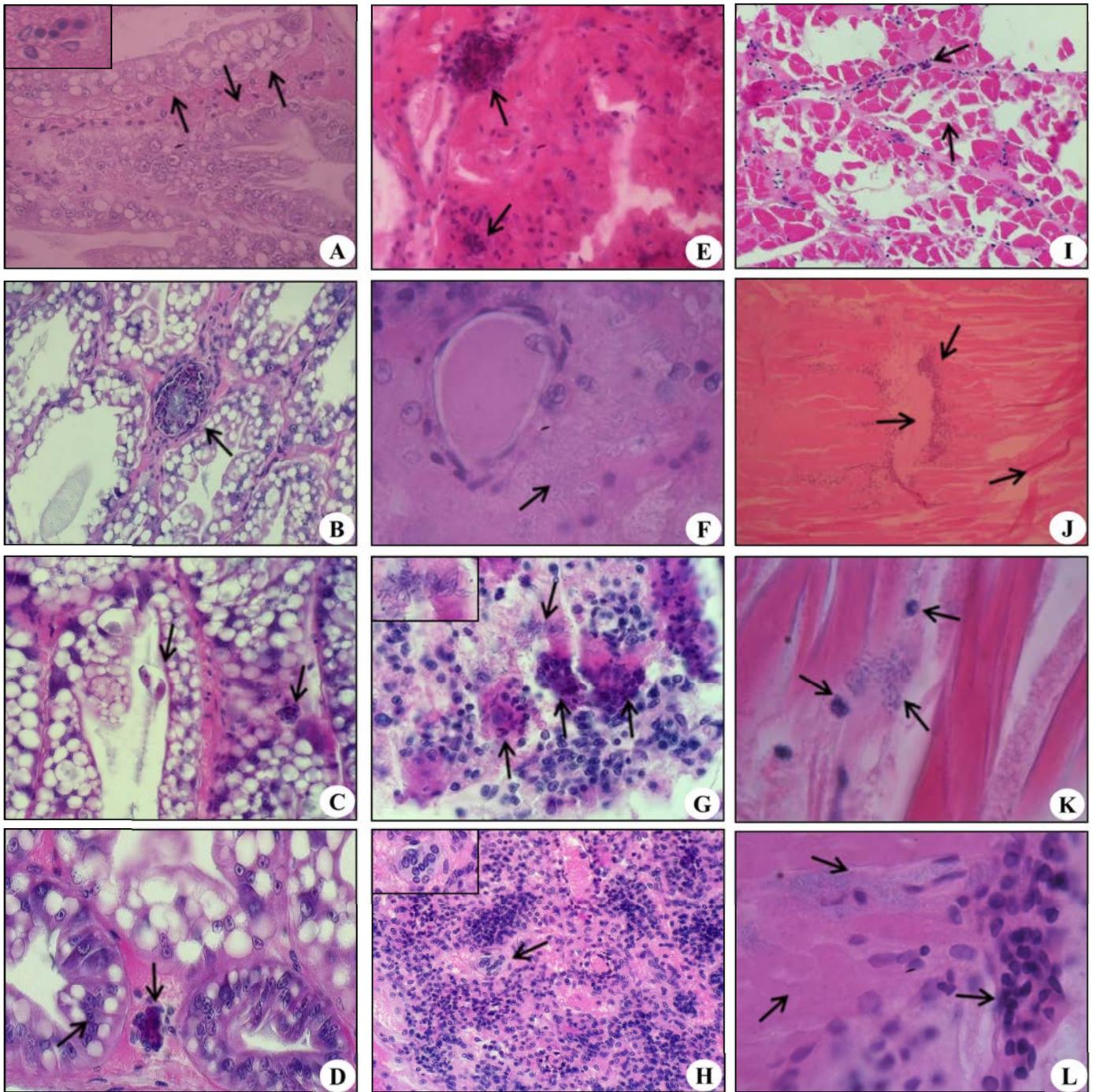


Figura 6. Cortes histológicos obtenidos de *L. vannamei* desafiados con *V. parahaemolyticus*. Hepatopáncreas: A) Bordes tubulares festoneados y hemocitos picnóticos. B) Nódulos hemocíticos con centros sépticos. C) Dilatación de senos hemales, nódulos hemocíticos y exfoliación de células epiteliales necróticas. D) Nódulos hemocíticos en senos hemales intertubulares e infiltración hemocítica. Órgano Linfoide: E) Nódulos hemocíticos melanizados, hipereosinofilia, presencia bacteriana y picnosis. F) Material granular intracitoplasmático y bacterias en espacio parenquimal. G) Pérdida de estructura normal, nódulos hemocíticos necróticos y presencia bacteriana. H) Pérdida de estructura normal, material eosinofílico, infiltración de hemocitos y esferoides tipo I. Músculo: I) Necrosis coagulativa de fibras musculares, infiltración de hemocitos degenerados y bacterias intralesionales. J) Mionecrosis coagulativa severa, agregación hemocítica, hipereosinofilia y pérdida de estriaciones de miocitos. K) Bacterias en espacios intermiocíticos y núcleos picnóticos. L) Mioneriosis coagulativa severa, presencia bacteriana, licuefacción, agregación hemocítica, fibrosis, hipereosinofilia y pérdida de estriación en miocitos. Tinción H&E

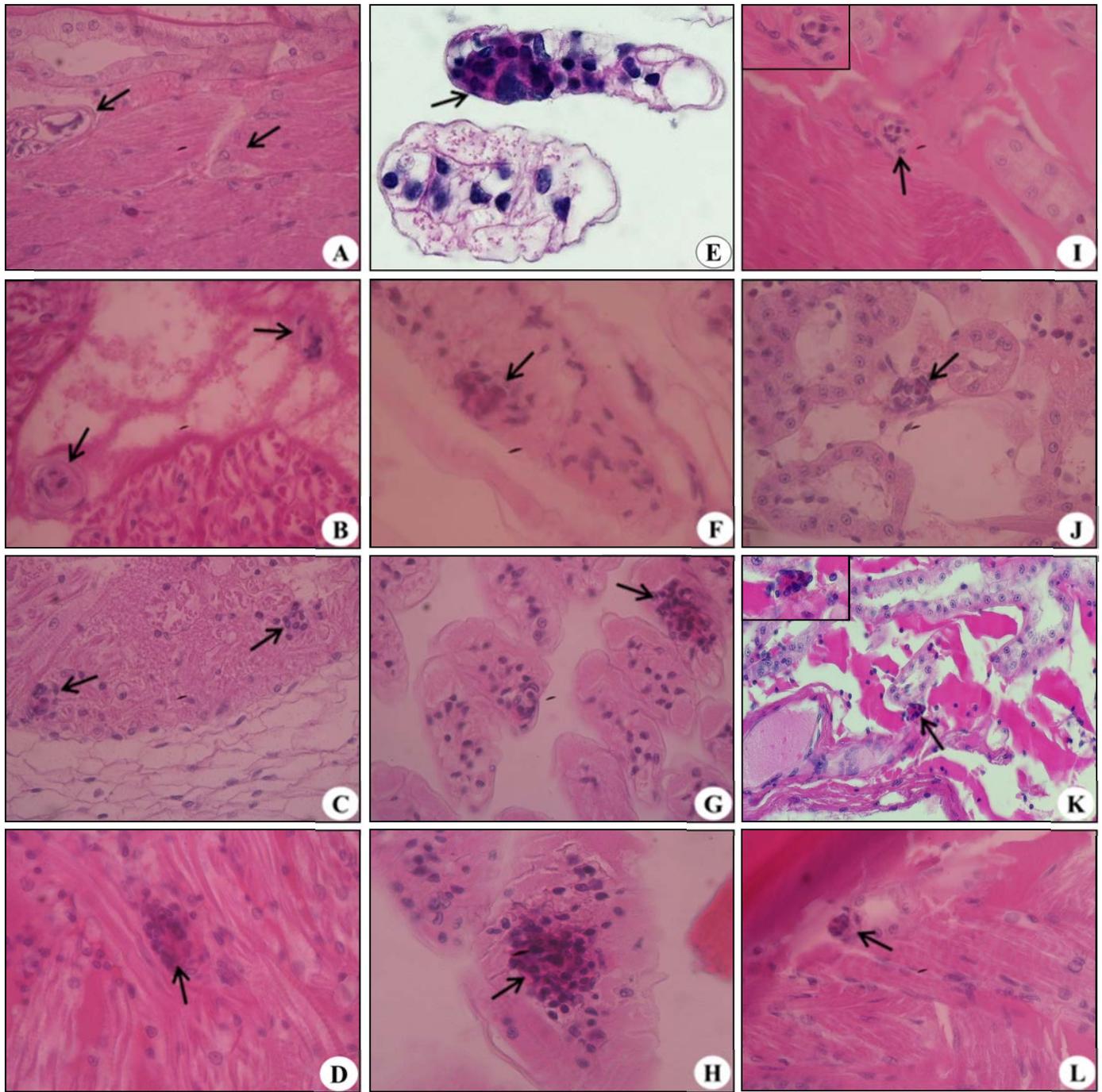


Figura 7. Cortes histológicos obtenidos de *L. vannamei* desafiados con *V. parahaemolyticus*. Corazón: A) Inicio de nodulación hemocítica, célula necrótica con núcleo picnótico con hemocito proximal e inicio de respuesta inflamatoria. B) Nódulo hemocítico en cámara cardíaca adyacente al miocardio, picnosis y fagocitosis de células necróticas. C) Nódulo hemocítico melanizado en tejido miocárdico, cercano al epicardio y núcleos picnóticos. D) Nódulo hemocítico en tejido miocárdico melanizado. Branquias: E) Nódulo hemocítico conteniendo bacterias en su interior. F) Nódulo hemocítico melanizado en lámina branquial. G) Nódulo hemocítico melanizado en lámina branquial y hemocitos picnóticos en espacios vasculares. H) Nódulo hemocítico en branquia, picnosis y necrosis en lamelas cercanas. Glándula Antenal: I) Nódulo hemocítico, subyacente a la glándula antenal. J) Nódulo hemocítico en glándula antenal, región del celomasaco, picnosis periférica. K) Dilatación de senos hemolinfáticos, hemocitos y nódulos hemocíticos. L) Nódulo hemocítico, adyacente a la glándula antenal. Tinción H&E

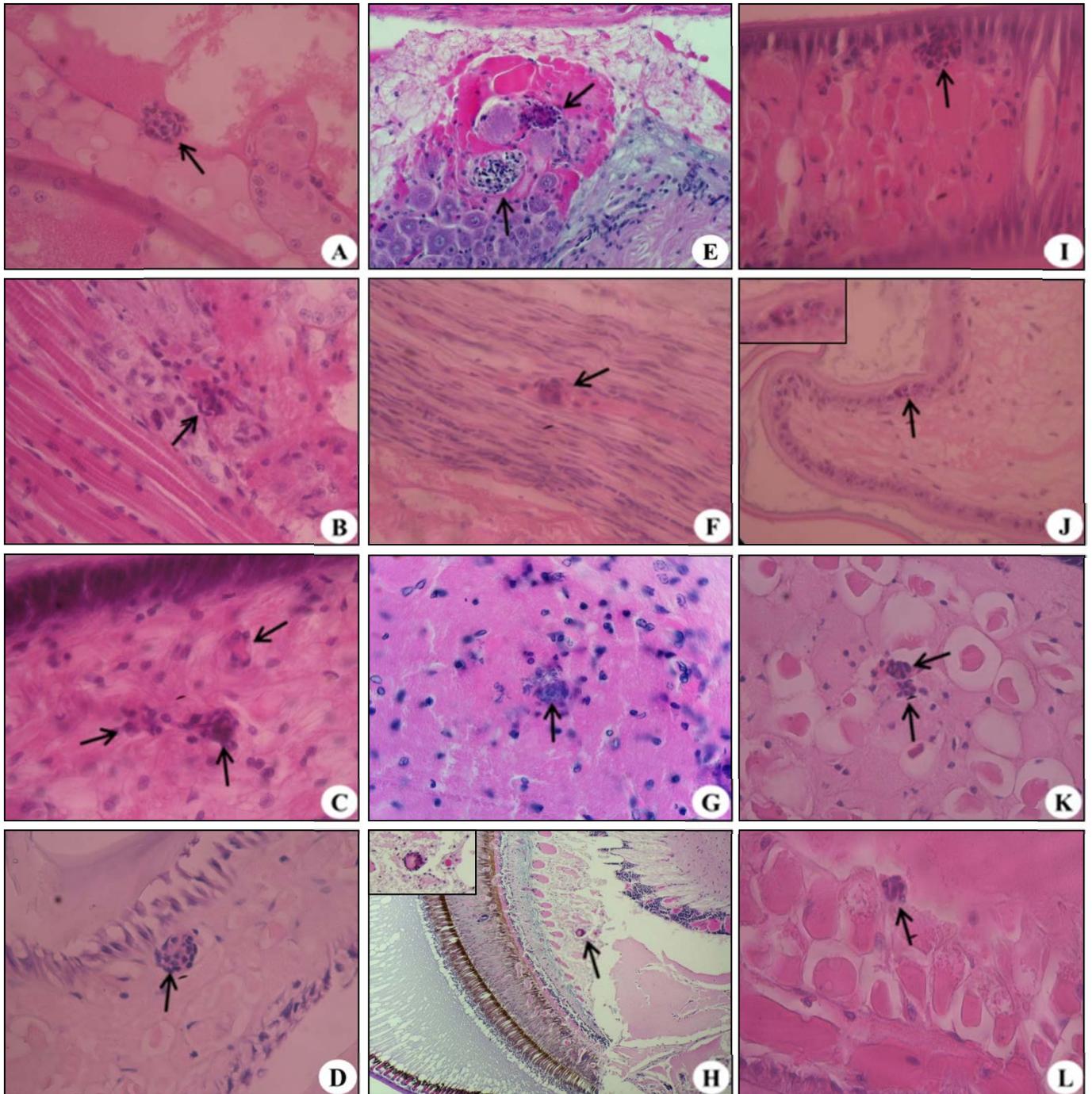


Figura 8. Cortes histológicos obtenidos de *L. vannamei* desafiados con *V. parahaemolyticus*. Tejido conectivo: A) Nódulo hemocítico en tejido conectivo de la glándula antenal, región del laberinto. B) Agregación hemocítica melanizada, en tejido conectivo de la glándula antenal. C) Pequeños nódulos hemocíticos multifocales en tejido conectivo perigástrico, melanizados. D) Nódulo hemocítico melanizado, en tejido conectivo perigástrico. Tejido Nervioso: E) Nódulos hemocíticos parcialmente melanizados. F) Nódulo hemocítico en cordón nervioso posterior al ganglio supraesofágico. G) Grumos bacterianos, necrosis del tejido nervioso y presencia de hemocitos. H) Nódulo hemocítico en láminas paraganglionares del ojo. Epitelio Cuticular: I) Flagelo antenal con nódulo hemocítico, adyacente al epitelio subcuticular. J) Nódulo hemocítico en epitelio gástrico. Palpo Mandibular: K) Nódulos hemocíticos multifocales, melanizados. L) Nódulo hemocítico. Tinción H&E

En el tejido conectivo se observaron bacterias, nódulos hemocíticos melanizados y picnosis, lo anterior principalmente en áreas del tejido conectivo del labrum y el perigástrico. Por último se presentó infiltración hemocítica en tejido conectivo estomacal (Figura 8A, B, C, D).

Las gónadas en general no presentaron muchas lesiones, aunque fueron visibles algunos nódulos hemocíticos melanizados en ámpula terminal y picnosis en bazo deferente. Mientras que el tejido nervioso presentó en algunos casos picnosis difusa, leve formación de hemocitos parcialmente degenerados, nódulos hemocíticos en nervio ocular y en cordón nervioso posterior al ganglio supraesofágico (Figura 8E, F, G, H). En el epitelio cuticular se apreciaron agregaciones hemocíticas, nódulos hemocitos multifocales, picnosis, además de nódulos hemocíticos en epitelio gástrico y sub-cuticular (Figura 8I, J).

A la vez, se evidenció la presencia de nódulos hemocíticos, picnosis y necrosis en el palpo mandibular (Figura 8K, L) y pedúnculo ocular (Figura 9B). El tejido hematopoyético produjo escasos nódulos hemocíticos melanizados, picnosis y melanosis multifocal con bajo impacto en lóbulos (Figura 9A). En los intestinos fue evidente en algunos casos la generación de procesos picnóticos, nódulos hemocíticos melanizados y picnosis en los miocitos longitudinales (Figura 9C). Por otro lado, se presentaron nódulos hemocíticos melanizados en arteria sub-gástrica (Figura 9D), flagelos antenales (Figura 9F) y entre las glándulas tegumentales. En el globo ocular se desarrollaron nódulos hemocíticos subyacentes a los rhabdomas, picnosis y melanosis, aunque sin presencia de bacterias intranodulares o externas (Figura 9E).

Aunque ya se han definido las principales lesiones expuestas anteriormente como propias de vibriosis, son pocos los que han presentado de manera exhaustiva estas reacciones (Lavilla-Pitogo *et al.* 1998; Esteve y Herrera 2000; van de Braak *et al.* 2002; Morales 2008; Intaraprasong *et al.* 2009), enfocándose principalmente en los órganos específicos que poseen más importancia como el

hepatopáncreas y el órgano linfoide. Ante lo anterior, resulta importante destacar los estudios realizados en *Penaeus monodon* en los que se encontraron graves daños histopatológicos ante la infección de *Vibrio harveyi*, siendo los principales efectos la formación de nódulos y la agregación de hemocitos con presencia inusual en arterias y senos hemales (Intaraprasong *et al.* 2009).

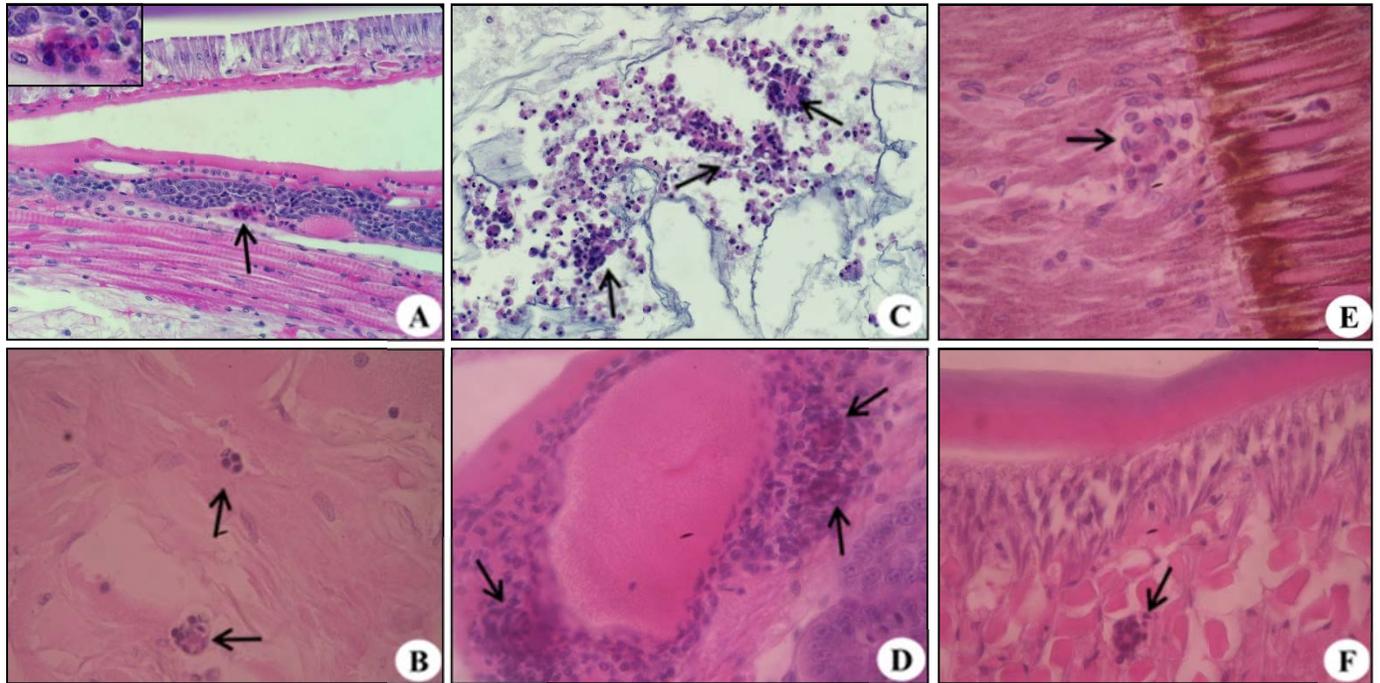


Figura 9. Cortes histológicas obtenidos de *L. vannamei* desafiados con *V. parahaemolyticus*. Tejido Hematopoyético: A) Nódulos hemocíticos. Pedúnculo Ocular: B) Nódulos hemocíticos en pedúnculo ocular, picnosis y necrosis. Intestino: C) Exfoliación de células epiteliales, algunas con contenido bacteriano. Arteria subgástrica: D) Nódulos hemocíticos melanizados. Globo ocular: E) Nódulo hemocítico, subyacente a los rhabdomas, picnosis y melanosis. Flagelo antenal: F) Nódulo hemocítico melanizado. Tinción H&E

De la misma manera, Soonthornchai *et al.* (2010), encontraron en la misma especie de camarón y el mismo tipo de vibriosis pero infectada de forma oral, una perturbación fuerte del epitelio intestinal, asociada a necrosis de la membrana basal e infestación masiva de hemocitos para combatir la infección, además de necrosis de túbulos hepatopancreáticos y encapsulación bacteriana. De este estudio es importante resaltar que no hubo daño sistémico en agallas ni corazón.

Se sitúa el hepatopáncreas como el órgano diana ante la infección grave de vibrios luminiscentes en los estanques de cultivo, caracterizado por inflamación de los senos interbulares y presencia de hemocitos, con epitelio tubular necrotizado y alta presencia bacteriana (Lavilla-Pitogo *et al.* 1998). Asociado a esto, Esteve y Herrera (2000) hallaron alteraciones histológicas en hepatopáncreas de *Farfantepenaeus brasiliensis* infectado con *V. alginolyticus*, compuestas principalmente por degeneración celular y picnosis extensiva, desaparición de acinos tubulares, infiltración hemocítica, formación de granulomas, necrosis y alta acumulación de bacterias.

Otro estudio realizado en *P. monodon* pero inyectado con *V. arguillarum*, reportó gran cantidad de hemocitos encapsulando bacterias en el punto de inyección, logrando una disminución de la circulación de éstas en hemolinfa; en este caso el órgano linfóide presentó la mayor cantidad de bacterias acumuladas, con alta presencia de células fagocíticas, desgranulación provocada por los hemocitos y alto contenido de esferoides con núcleos picnóticos y células necróticas, esto asociado a la carga infecciosa. De esta manera se concluye en ésta investigación la importancia del órgano linfóide como filtro para todos los materiales extraños que se encuentran en la hemolinfa (van de Braak *et al.* 2002).

Morales (2008) menciona que al utilizar tinción de hematoxilina-eosina en histopatología, se pueden observar secciones del hepatopáncreas con hipertrofia tubular, desprendimiento celular, infiltración de hemocitos y formación de nódulos hemocíticos con presencia de colonias bacteriales, además de observarse presencia bacteriana en estómago, esófago, apéndices y en branquias. Mismos resultados obtenidos en los análisis histológicos efectuados en los ensayos realizados.

Es importante resaltar el papel de los hemocitos para combatir la presencia de bacterias patógenas, ya que se destaca su aparición en todas las muestras utilizadas y en la mayoría de casos junto a la presencia bacteriana; resultados

similares a los presentados por Esteve y Herrera (2000), van de Braak *et al.* (2002), Morales (2008), Soonthornchai *et al.* (2010), entre otros.

Otro aspecto importante a considerar es el desempeño del hepatopáncreas y órgano linfoide como principales estructuras donde se generan la mayoría de reacciones para combatir las principales afecciones, situación reflejada en el estudio histológico efectuado.

Se resalta la aparición de esferoides de tipo I, II y III, en el órgano linfoide, que como mencionan Rusaini y Owens (2010) esto podría estar relacionado a la tolerancia de los camarones ante un agente infeccioso, posiblemente al controlar o reaccionar a ellos. A pesar de lo anterior, estos autores mencionan que la aparición de esferoides se debe a infecciones virales y desestima su formación a procesos bacteriológicos. Ante tal situación y al analizar las reacciones encontradas en el presente estudio, se mantiene que la formación de esferoides se vincula con la infección bacterial. Al comparar el estudio de Rusaini y Owens (2010) se confirma la formación de nódulos melanizados como respuesta protectora en los tejidos infectados.

Los estudios publicados para este tipo de análisis demuestran una alta similitud con los hallazgos generados en la presente investigación, confirmando la alta patogenicidad de las bacterias del género *Vibrio* sp. y para el presente caso en estudio *V. parahaemolyticus*.

5.4.1. Análisis histológico asociado a los tratamientos

Con la finalidad de tratar de asociar un posible efecto de los diferentes tratamientos que fueron evaluados en esta investigación a los diferentes órganos que se analizaron por medio de la histología, se obtuvo una relación porcentual de las lesiones generales que se dieron en las estructuras de los camarones y de acuerdo a la cantidad de muestras obtenidas para cada aditivo.

De las muestras obtenidas del primer bioensayo, se presentaron lesiones en el 100% de las branquias de T0, T1 y T3, solo T2 presentó una breve disminución de reacciones alcanzado el 75% de las muestras. Por otro lado, la glándula antenal, el hepatopáncreas, el órgano linfóide y el músculo fueron las estructuras donde se generaron más afecciones, en la mayoría de los casos fueron superiores al 80%. Contrario a lo anterior, el epitelio cuticular, los intestinos y el tejido hematopoyético fueron las que sufrieron menos alteraciones histológicas, presentando alrededor del 25% para cada tratamiento. El tejido nervioso mostró un 20% de lesiones para T0, T2 y T3, mientras que T1 alcanzó el mayor dato con 60%; sin embargo, el corazón fue el más inconsistente entre tratamientos, al revelar 20, 80, 60 y 40% para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Las gónadas no mostraron lesiones aparentes en ningún caso (Cuadro 5A).

Respecto a la información obtenida del bioensayo 2, al igual que el primer bioensayo, las branquias tuvieron lesiones en el 100% de las muestras de los diferentes tratamientos. Para este caso, el epitelio cuticular, la glándula antenal, el órgano linfóide, el corazón y el tejido conectivo exhibieron daños histológicos en más del 80% de las muestras analizadas para los distintos tratamientos. Por otro lado, solo el tejido hematopoyético y el tejido nervioso presentaron baja cantidad de lesiones, presentando niveles inferiores al 33% de las muestras y de acuerdo a los diversos aditivos utilizados. A la vez, regiones estructurales de importancia como el hepatopáncreas y el músculo, presentaron una alta variabilidad de los resultados por tratamiento; de esta manera, se obtuvieron valores de las muestras de hepatopáncreas de 20, 40, 75 y 0% para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Los cortes de músculo analizados fueron muy diferentes entre tratamientos, siendo para T1 y T3 un 80% con lesiones, mientras que T0 y T2 mostraron 20 y 50%, respectivamente (Cuadro 5B).

Sectores analizados del camarón como lo fueron el intestino y las gónadas, mostraron información diversa de acuerdo al tratamiento que fueron sometidos, para la primera estructura T0 arrojó que el 40% de las muestras analizadas

presentaba alguna reacción ante las bacterias, T1 no presentó ninguna lesión aparente, al contrario, T2 y T3 resultaron con 33% de sus muestras con lesiones. Para las gónadas, solo T1 y T2 mostraron información relevante (Cuadro 5B).

La importancia de la investigación que se llevó a cabo, radica en demostrar el posible efecto inmunoestimulante de los tratamientos utilizados, lo cual se ve reflejado en la capacidad del sistema inmune para generar reacciones en los diversos órganos donde se hicieron presentes las bacterias de *V. parahaemolyticus*. A partir de lo anterior y lo expuesto en el Cuadro 5; se podría determinar que los aditivos podrían estar ejerciendo cierta inmunidad en las diferentes estructuras. Ante esto y según las casas fabricantes, el tratamiento compuesto por manano-oligosacáridos (T1) tiene su principal acción en la superficie intestinal, al mismo tiempo que su absorción genera mayor inmunoestimulación en los camarones. Por otro lado, los extractos de plantas (T3) tienen su efecto positivo en el hepatopáncreas del camarón, ya que lo fortalece ante las posibles infecciones. Respecto al ajo (T2) se reconoce que su aceite esencial allicina es un potente antibacterial, aunque no se conocen estudios de este tipo para tal aditivo.

Dado esto y lo encontrado en el análisis histopatológico, al analizar las principales estructuras de acuerdo a lo expuesto en los trabajos de Lavilla-Pitogo *et al.* (1998), Esteve y Herrera (2000), van de Braak *et al.* (2002), Rusaini y Owens (2010), los órganos más importantes donde se generaron reacciones inmunológicas (nodulación, infiltración hemocítica, esferoides, etc.) ante la presencia de las bacterias fueron el hepatopáncreas, el órgano linfoide y el músculo, para el bioensayo que duró seis días. Respecto a lo anterior, se debe considerar que los camarones tuvieron menor tiempo consumiendo los tratamientos y se hace más difícil generar un efecto específico, como se logra observar en la Cuadro 5A, B; donde no se aprecia claramente la diferencia de los tratamientos con respecto al control (T0) en áreas como el órgano linfoide, el músculo, la glándula antenal y el hepatopáncreas.

Es visible el efecto provocado en las muestras pertenecientes a T1, ya que en los diferentes órganos siempre tuvieron mayores reacciones de defensa (Cuadro 5A, B). Por otro lado, T3 no tuvo buenos resultados en las principales estructuras como se observa en el hepatopáncreas y el órgano linfoide (Cuadro 5A, B). Con respecto a este último y debido a las funciones que ejerce éste, la reducción que se presenta en T3 no es un buen indicador de inmunoestimulación.

Contrario a lo anterior, en el bioensayo que se extendió hasta los catorce días, se presentó una mayor diferenciación de las diversas reacciones de defensa de los tratamientos con relación al control (Cuadro 5B). De esta manera, se puede observar que la mayoría de veces, T0 presentó mayor dificultad de crear reacciones de defensa que los demás tratamientos, solo se presentó una mejoría en las muestras obtenidas de los intestinos.

A los catorce días, la mejor inmunoestimulación fue dada por T1 y T2 debido a los niveles elevados de reacciones en los diferentes órganos pero principalmente al efecto observado en el hepatopáncreas y el órgano linfoide. Igualmente a lo sucedido en el primer bioensayo, T3 no presentó reacciones ante la presencia de bacterias en ninguna de las muestras obtenidas del hepatopáncreas, mismo hecho que sucedió en el tejido nervioso. Sumado a lo anterior, queda claro que la cantidad de inóculo utilizado fue diferente en ambos casos.

Ante los resultados expuestos anteriormente, existe una alta posibilidad de los tratamientos utilizados puedan generar una mayor inmunoestimulación en ciertos órganos mientras que en otros sea menor tal efecto, aunque como se ha determinado, la mayoría de estructuras que obtuvieron la mayor protección estaban asociadas al mismo producto.

Cuadro 5. Porcentaje de lesiones histológicas sobre las diferentes órganos de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con diferentes dietas.

Órganos	A				B			
	Presencia de lesiones histológicas por tratamiento (%)							
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
Branquias	100	100	75	100	100	100	100	100
Epitelio Cuticular	20	0	0	0	80	100	100	100
Glándula antenal	100	100	100	80	80	100	100	100
Hepatopáncreas	100	100	80	80	20	40	75	0
Intestino	0	0	0	20	40	0	33	33
Órgano linfoide	100	100	100	75	100	100	100	100
Tejido Hematopoyético	25	25	0	0	20	20	0	33
Músculo	100	100	100	100	20	80	50	80
Gónadas	0	0	0	0	0	40	25	0
Tejido Nervioso	20	60	20	20	20	20	25	0
Corazón	20	80	60	40	100	100	100	100
Tejido Conectivo ^Ω	-	-	-	-	80	100	100	100

^Ω Sin muestras de tejido conectivo para el bioensayo que duró seis días.

A) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón.

B) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

T0: control, T1: manano-oligosacáridos, T2: ajo, T3: extractos de plantas

5.5. Discos de sensibilidad

Después de observados a contra luz las placas previamente inoculadas con agua de mar y que presentaban bacterias del género *Vibrio* sp. se observó un halo de inhibición en todos los tratamientos utilizados para la realización de las pruebas en *L. vannamei*. Sin embargo, las diluciones que poseían extractos de plantas y

manano-oligosacáridos obtuvieron las mayores inhibiciones, siendo el primer producto sobresaliente.

Por otro lado, el ajo mostró el menor nivel de inhibición aunque no se descarta su efecto antimicrobiano debido a la presencia de sustancias que ejercen este tipo de reacciones, pero que posiblemente sean insolubles en agua. En ese sentido, el trabajo de Prieto *et al.* (2005) menciona que *Allium sativum* posee una fracción liposoluble (aleína) y otra hidrosoluble (allicina), presentando efecto bactericida *in vitro* sobre *Vibrio* sp.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. No se determinaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($P > 0,05$) con respecto a las variables que correspondían a los parámetros inmunológicos. Aunque, se determinó un aumento hemocitario a los seis días por T2 y a los catorce días del tratamiento compuesto T1, y mejores tiempos de coagulación cuando se dosificó T2 y T3 durante más tiempo. Por otro lado, T2 y T1 repercutieron en una mayor fortaleza inmunológica post-infección a los seis y catorce días, respectivamente. Además, la dieta control fue la que presentó los niveles más altos de mortalidades acumuladas en las dos etapas de investigación. De acuerdo a lo anterior, se recomienda la utilización de cualquiera de los aditivos estudiados para mejorar la inmunología del camarón ya que la dieta control presentó mortalidades mayores. Sin embargo, de todos los aditivos analizados T2 mostró los mejores efectos inmunológicos ya que comparativamente expresó resultados parecidos a T1 en el ensayo de una semana pero fue superior en los mostrados cuando el ensayo se extendió hasta catorce días.
2. Los parámetros zootécnicos que correspondieron al bioensayo que se extendió por seis días, obtuvo diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0,05$), sin embargo el estudio de catorce días no presentó diferencias entre los tratamientos evaluados ($P > 0,05$). El T2 presentó las mejores ganancias de peso y conversiones alimenticias en el primer bioensayo, mientras que en el segundo se observó una alta variación de los resultados, liderado por T1. Ante esto, T2 podría tener un impacto importante a nivel intestinal, eliminando las bacterias y parásitos en la región del cuerpo; a la vez, lo anterior lograría una mejor capacidad de absorción de los alimentos y se vería reflejado positivamente en la condición general del camarón.
3. Las variables analizadas en el proyecto mostraron resultados inconsistentes cuando se presentó el análisis estadístico. Sin embargo, parece que muchos estudios donde se evaluaban productos inmunoestimulantes mostraron en sus

- datos el mismo efecto. Es posible que una opción sea aumentar la cantidad de unidades experimentales utilizadas para realizar evaluaciones del mismo tipo.
4. Los resultados obtenidos del análisis histológico confirman su utilidad para establecer variaciones en el estado sanitario de los camarones y para esta investigación en particular, ante la infección por *V. parahaemolyticus*.
 5. Al asociar el análisis histológico con el efecto de los tratamientos post-infección con *V. parahaemolyticus*, T1 y T2 mostraron el mejor efecto inmunoestimulante en ambos periodos experimentales. Por otro lado, y ante la premisa que T3 es un fortalecedor del hepatopáncreas y T1 del intestino, surge la duda de la efectividad de estos tratamientos en estas áreas de acuerdo a lo encontrado en los análisis histológicos. Sin embargo no se descarta su efecto inmunoestimulante en estas estructuras, por lo que haría falta más investigación específica para cada producto.
 6. Los tratamientos mostraron halos de inhibición cuando se realizó la prueba de disco de sensibilidad, siendo el producto conformado por extractos de plantas el mejor. Sin embargo, se debe realizar con más detalle, tratando de obtener valores numéricos que confirmen lo observado.
 7. Se podrían considerar a partir de los datos numéricos, los tratamientos compuestos por T1 y T2 como los mejores inmunomoduladores, si se comparan entre sí todos los resultados obtenidos de esta investigación preliminar. Se recomienda a partir de la información obtenida que para episodios repentinos de infección bacteriana se aplique manano-oligosacáridos en el alimento en periodos menores a una semana. Por otro lado, cuando se den problemas críticos de infección y con mayor duración, se utilice ajo en la ración de forma constante hasta lograr una disminución adecuada en los niveles de infección.
 8. Con respecto al producto compuesto por extractos de plantas y de acuerdo a lo mostrado en la investigación, no se descarta totalmente algún efecto a nivel inmunológico. Sin embargo, los resultados demuestran una mejor capacidad para favorecer variables como la ganancia de peso y la conversión alimenticia.

Ante lo anterior, se aconseja realizar pruebas más detalladas sobre posibles beneficios en la inmunología del camarón.

9. Para futuras investigaciones donde se utilicen aditivos iguales o parecidos a los agregados en las dietas se recomienda ampliar el tiempo de los ensayos, con la finalidad de que los animales logren asimilar los aditivos adecuadamente y esto pueda reflejarse en variables como la ganancia de peso y la conversión alimenticia, que al final serán las determinantes del éxito del proceso productivo.
10. Fue evidente que una diferencia en la composición de la dieta convencional al agregar algún aditivo con características inmunológicas, ocasionará un cambio en la capacidad de respuesta del camarón ante una situación que pueda generar una alteración en su salud. Ante la presencia de enfermedades, la incorporación de aditivos naturales en la dieta de los camarones surge como una alternativa para minimizar su impacto e incrementar la productividad.
11. Este estudio abre la posibilidad de utilizar productos con un origen natural y que permitan incrementar la productividad siendo amigables con el medio ambiente. Se demuestra que la sustitución de productos químicos es posible y que la incorporación de los aditivos evaluados en la dieta traerá beneficios inmunológicos en los camarones.
12. Con base a lo obtenido en el proyecto de investigación, se recomienda para futuros análisis evaluar diferentes niveles de dosificaciones de las bacterias, periodos de tiempo de uso y los niveles de dosificación de los productos. A la vez, la metodología desarrollada servirá como modelo para realizar investigaciones relacionadas con los camarones de cultivo e incentivar la participación de entes privados y gubernamentales interesadas en el sector.

7. LITERATURA CITADA

ALDAY, V., FLEGEL, T.W. 1999. Diagnosis of shrimp diseases. with emphasis on the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). FAO & Multimedia Asia Co, Bangkok, Thailand. (Interactive CD-ROM format).

ALFARO, J. 2004. Introducción al cultivo de camarones marinos. EUNA. Heredia, Costa Rica. 92 p.

ÁLVAREZ, J., AUSTIN, B., ALVÁREZ, A., AGURTO, C. 2000. Especies de *Vibrio* y *Aeromonas* aisladas del intestino de camarones marinos sanos silvestres y cultivados en Venezuela. *Veterinaria Tropical* 25(1): 5-27.

BALCÁZAR, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. *In*: I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 877-881 pp. (en línea). Consultado: 17 de julio del 2010. Disponible en: <http://www.civa2002.org>.

BARRACCO, M.A., PERAZZOLO, L.M., ROSA, R.D. 2008. Inmunología del camarón. *In*: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 p.

BENCHAAR, C., PETIT, H., BERTHIAUME, R., OUELLET, D., CHIQUETTE J., CHOUINARD P. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.* 90(2): 886-897.

BENCHAAR, C., CALSAMIGLIA, S., CHAVES, A.V., FRASER G.R., COLOMBATTO, D., MCALLISTER, T.A., BEAUCHEMIN, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 209-228.

BURGE E.J., MADIGAN D.J., BURNETT L.E., BURNETT K.G. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. Fish Shellfish Immunol. 22: 327-339.

BURGENTS J.E., BURNETT L.E., STABB E.V., BURNETT K.G. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* introduced into Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. 29: 681-691.

BURT, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. Int. J. Food Microbiol. 94:223–253.

CASTILLEJOS, L. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis doctoral. Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra. Holanda. 159 p.

CEDANO T.Y., OLMOS J. 2003. Identificación de respuesta inmunológica en *Litopenaeus vannamei* por inoculación con *Vibrio harvey*. In: X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México (en línea). Consultado: 27 de julio del 2010. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VIII/CARTEL/CVIII-14.pdf

CERENIUS L., SÖDERHÄLL K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 198: 116-126.

CHANG C.F., CHEN Y.H., SU M.S, LIAO I.C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 10: 505-514.

CITARASU T.,SIVARAM V., IMMANUEL G., ROUT N., MURUGAN V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish Shellfish Immunol.21(4): 372-84.

CUÉLLAR J. 2008. Métodos de diagnósticos de enfermedades en camarones marinos de cultivo. pp 1-54. *In*: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá. 270 p.

CUÉLLAR-ÁNJEL, J., C. LARA, V. MORALES, A. DE GRACIA Y O. GARCÍA SUÁREZ. 2010. Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*. OIRSA- OSPESCA, C.A. pp. 132.

CURIQUÉN E., GONZÁLEZ H. 2006. Uso de Manano oligosacáridos como una alternativa a los antibióticos. Circular de extensión técnico ganadera. 32: 41-50.

DABANCH J., HERRERO D., PAVÉZ C. 2009. Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. Rev. Chil. Infect. 26(4): 360-362.

DANTAS D., ALVES E., REGO M., SOARES R., PEIXOTO S., GÁLVEZ A. 2009. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. Rev. Bras. Cienc. Agrar. 4(1): 85-90.

DECAMP O., MORIARTY D.J., LEVENS P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. Aquacult. Res. 39: 334-338.

DORMAN, H., DEANS, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308-316.

ESTEVE M., HERRERA F. 2000. Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) (Crustacea: Penaeidae) experimentalmente infectados con *Vibrio alginolyticus*. *Saber.* 12(1): 14-20.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). Programa de información de especies acuáticas. Departamento de Pesca y Acuicultura (en línea). Consultado: 30 de julio del 2010. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es.

GANESH E.A., DAS S., CHANDRASEKAR K., ARUN G., BALAMURUGAN S. 2010. Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 2(1): 48-52.

GÓMEZ B., TRON-MAYEN L., ROQUE A., TURNBULL J.F., INGLIS V., GUERRA A.L. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeusvannamei*. *Aquaculture.* 163: 1-9.

GÓMEZ B., ROQUE A., GUERRA A.L. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto de uso de antimicrobianos. *In: Páez Osuna F. (ed.). Camaronicultura y Medio Ambiente. UNAM. Mazatlán, Sinaloa México. p. 315-346.*

GULLIAN M., RODRÍGUEZ J. 2002. Estudio de las cualidades inmunoestimulantes de nuevas bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Litopenaeus vannamei*. *In: Contribuciones del CENAIM durante el VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 8(1): 47-49.*

HART, K.J., YÁÑEZ-RUIZ, D.R., DUVAL, S.M., MCEWAN, N.R., NEWBOLD, C.J. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147: 8-35.

HAWS M. C., BOYD C. E., GREEN B. W. 2001. Buenas prácticas de manejo en el cultivo de camarón en Honduras. Coastal Resources Center. University of Rhode Island. 96 p.

HEIDARIEH M., AFSHARNASAB M., SOLTANI M., DASHTYANNASAB A., RAJABIFAR S., SHEIKHZADEH N., TAMIMI A.H. 2010. Effects of Ergosan and Vibromax to prevent Vibriosis and WSSV in *Litopenaeus vannamei*. *J. Fish. Aqua. Sci.* 5(2): 120-125.

HSU S.W., CHEN J.C. 2007. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture* 271: 61-69.

IBARRA J.C., REYES J., GALAVÍZ L., MOLINA Z., LUNA C. 2003. Vibriosis asociadas al cultivo de camarón *Litopenaeus vannamei*. In: IX Congreso de ciencia de los alimentos y V Foro de ciencia y tecnología los alimentos. Guanajuato, México. p. 426-430.

INTARAPRASONG A., KHEMAYAN K., PASHARAWIPAS T., FLEGEL T.W. 2009. Species-specific virulence of *Vibrio harveyi* for black tiger shrimp is associated with bacteriophage-mediated hemocyte agglutination. *Aquaculture*. 296: 185-192.

JIRAVANICHPAISAL P., LEE B.L., SÖDERHÄLL K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211: 213-236.

JOHANSSON M.W., KEYSER P., SRITUNYALUCKSANA K., SÖDERHÄLL. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.

KANNAPIRAN E., RAVINDRAN J., CHANDRASEKAR R., KALAIARASI A. 2009. Studies on luminous, *Vibrio harveyi* associated with shrimp culture system rearing *Penaeus monodon*. *J. Environ. Biol.* 30(5): 791-795.

LAVILLA-PITOGO C.R., LEAÑO E.M., PANER M.G. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture* 164: 337-349.

LEE S.Y., SÖDERHÄLL K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 12: 421-437.

LEYTON Y., RIQUELME C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43(3): 441-456.

LÓPEZ O. 2010. Técnicas de producción de camarón marino (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica. *Ecag Informa.* 52: 30-32.

MALDONADO M. 2003. Respuesta inmunitaria en familias de *Litopenaeus vannamei*, bajo condiciones de infección con WSSV y el efecto de la adición de β -1,3 glucanos. Tesis de grado previa a la obtención del título de Magíster en Ciencias. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil, Ecuador. 31 p.

MAYER E. 2010. Evaluation of *Vibrio* control with a multi-species probiotic in shrimp aquaculture. *Internat. AQUAFEED.* 13(4): 16-20.

MONTSERRAT E., HERRERA F. 2000. Alteraciones histológicas del hepatopáncreas en juveniles de *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817)

(Crustacea: Penaeidae) experimentalmente infectados con *Vibrio Alginolyticus*. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela 12(1): 14-20.

MORALES M.S. 2008. Enfermedades bacterianas. pp 117-134. *In*: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 p.

OH, H.K., JONES, M.B., LONGHURST, W.M. 1968. Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Appl. Microbiol.* 16: 39–44.

PANTOJA C.R. 2005. Kona line SPF shrimp, *Vibrio penaeicida* candidates for bacterial challenge model. *Global Aquacul. Advocate* 8(3): 82-83.

PEÑA N. 2009. Práctica laboral y profesional realizada en producciones de engorde de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en la zona de San Buenaventura de Colorado de Abangares, Guanacaste, Costa Rica. Práctica presentada para optar por el título de bachiller en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia. Universidad de Costa Rica. 84 p.

PEREZ FARFANTE, I., KENSLEY B. 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memories du Museum National D'Histoire Naturelle, Paris, France.* 233 p.

PRIETO A., AURO A., FERNÁNDEZ A., PÉREZ M.B. 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Tip Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 8(1): 38-49.

PROCOMER (PROMOTORA DEL COMERCIO EXTERIOR DE COSTA RICA). 2012. Portal estadístico de comercio exterior (en línea). Consultado: 2 de marzo del 2012. Disponible en: <http://www.procomer.com/contenido.html>

RENDÓN L., BALCÁZAR J.L. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Rev. AquaTIC* 19: 27-33.

REUTER, H., KOCH, J., LAWSON, L. 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. *In* Garlic: The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. H. P. Koch, and L. D. Lawson. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. p. 135-212.

RODRÍGUEZ J., CEDEÑO R., MOLINA C., OTERO., VALENZUELA E., SOTOMAYOR M.A. 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. *In*: Cruz L.E., Ricque D., Tapia M., Olvera M., Civera R. (Eds.). Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México. p. 57-71.

RODRÍGUEZ J., LE MOULLAC G. 2000. State of the art immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-119.

ROJLORSAKUL P., BOONSAENG V., PANBANGRED W., SUTHIENKUL O., PASHARAWIPAS T., FLEGEL T.W. 1998. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp haemolymph by DNA hybridization and PCR amplification. *In*: Flegel T.W. (Ed.) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 227-234.

ROQUE A., TURNBULL J.F., ESCALANTE G., GÓMEZ B., ALDAY M.V. 1998a. Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquaculture* 169: 283-290.

ROQUE A., GÓMEZ B., GUERRA A.L. 1998b. Standardisation of three techniques for experimental *Vibrio* infections in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. In: Flegel T.W. (Ed.) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. p. 199-203.

RUSAINI, OWENS L. 2010. Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns: A review. Fish Shellfish Immunol. 29: 367-377.

SABORÍO A., ALMANZA M.J. 2008. Buenas prácticas de manejo en la camaronicultura. pp. 225-243. In: Morales, V. y J. Cuéllar- Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá. 270 p.

SACSAQUISPE R., VELÁSQUEZ J. 2002. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco de Difusión. Serie de Normas Técnicas. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. 68 p.

SANTOMÁ G. 1998. Estimuladores de la Inmunidad. Avances en nutrición y alimentación animal. In: XIV Curso de especialización, Expoaviga98. FEDNA. Barcelona, España. p. 117-140.

SAS (Statistical Analysis System). 2003. SAS User's Guide. SAS. Inst. Inc. Cary, NC, USA.

SCHOLZ U., GARCIA G., RICQUE D., CRUZ L.E., VARGAS F., LATCHFORD J. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. Aquaculture 176: 271-283.

SMITH V.J., BROWN J.H., HAUTON C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. Fish Shellfish Immunol. 15: 71-90.

SÖDERHÄLL K., CERENIUS L. 1992. Crustacean Immunity. Annu. Rev. Fish Dis. 2: 3-23.

SØGAARD M., NØRGAARD M., SCHØNHEYDER H. 2007. First notification of positive blood cultures: high accuracy of the Gram stain report (Epub ahead of publication). J. Clin. Microbiol.45: 1113.

SOONTHORNCHAI W., RUNGRASSAMEE W., KAROONUTHAISIRI N., JARAYABHAND P., KLINBUNGA S., SÖDERHÄLL K., JIRAVANICHPAISAL P. 2010. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. Dev. Comp. Immunol. 34: 19-28.

SOTOMAYOR M.A., BALCÁZAR J.L. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. Rev. AquaTIC. 19: 9-15.

TRUJILLO T., AGUIRRE G., SÁNCHEZ G., RABAGO J. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrios* sp. en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Cienc. Mar IX(27): 11-18.

VAN DE BRAAK C.B.T., BOTTERBLOM M.H.A., TAVERNE N., VAN MUISWINKEL W.B., ROMBOUT J.H.W.M., VAN DER KNAAP W.P.W. 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. Fish Shellfish Immunol. 13: 293–309.

VANKATESWORA A. 2009. Vibriosis en la acuicultura del camarón. Panorama acuícola magazine (en línea). Consultado: 16 de julio del 2010. Disponible en:http://www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2009/03/23/vibriosis_en_la_acuicultura_del_camaron.html

VILLAMAR C.A. 2000. Acuicultura orgánica-ecológica: Aplicación de productos naturales en sustitución de químicos en los procesos de cría de camarones en cautiverio. Rev. AquaTIC. 10: 27-30.

VILLAMIL L., MARTÍNEZ M.A. 2009. Probióticos como herramienta biotecnológica en el cultivo de camarón: Reseña. Biol. Invest. Mar. Cost. 38(2): 165-187.

VILLEGAS M. 2004. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos contra *Vibrio parahaemolyticus* obtenidos de acuicultura de camarones. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica. 29 p.

YANG, W., BENCHAAR, C., AMETAJ, B., CHAVES, A., HE, M., MCALLISTER, T. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. J. Dairy. Sci. 90(12): 5671–5681.

YEH S.T., CHEN J.C. 2008. Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 276: 22-28.

8. ANEXOS

Anexo 1. Reporte del estado de salud general de los camarones extraídos de la finca Cerro Mar y utilizados en el Bioensayo 1, donde se inyectó 1×10^6 UFC/camarón.



COONAPROSAL R.L.

Reporte de prueba

Reporte de Laboratorio de Patologías y Microbiología

Fecha: 19 de julio 2011

Finca/Cliente: Cerro Mar

Resultado Análisis Camarón:

Pisc #	Peso	Revisión del Hepatopáncreas						Parásitos		Comentarios
		G0	G1	G2	G3	G4	Total	Intern	Extern	
3	6,5	4	1	0	0	0	5	2	2	Camarones blandos

Observaciones: Animales del estanque que será utilizado en el segundo experimento de inmunoestimulación

Resultado Análisis Agua:

Pisc #	Salinidad	Conteo de Algas por Tipo (células/ml)				Comentarios
		Diatomeas	Clorófitas	Cianóbact	Flagelados	
1	23	190	220 000	2 890 000	410	Cianobacterias bajas
Rangos Deseables		> 1,000	200,000 a 250,000	3,000,000 a 4,000,000	< 1,000	---

Observaciones:



Laboratorista: _____

Anexo 2. Reporte del estado de salud general de los camarones extraídos de la finca Caraito 2 y utilizados en el Bioensayo 2, donde se inyectó 3×10^6 UFC/camarón.



COONAPROSAL R.L.

Reporte de Laboratorio de Patologías y Microbiología

Fecha: 17 junio 2011

Análisis de camarones destinados al proyecto de inmunoestimulación, CIMAR

Resultado Análisis Camarón:

Peso	Revisión del Hepatopáncreas						Parásitos		Comentarios
	G0	G1	G2	G3	G4	Total	Intern	Extern	
7,3	5	0	0	0	0	0	1-4	2	Gregarinas

Observaciones:

- Gregarinas en prevalencia variable entre animales desde G1 hasta G4.
- Ectoparasitosis leve en lámelas branquiales – *Zoothamnium* sp. y *Epistylis* sp, sin melanosis o necrosis asociada.
- Túbulos hepatopancreáticos en buen estado y con reservas de lípidos altas
- Tiempo de coagulación de hemolinfa normal (< 1 minuto)
- No se detectan lesiones asociables a etiologías virales o bacteriales.
- Los animales presentan un estado sanitario general adecuado para la prueba de inmunoestimulación.



Laboratorista: 

Anexo 3. Medias de los parámetros inmunológicos obtenidos de *Litopenaeus vannamei* desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* y después de ser alimentados con una dieta control (T0), manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y extractos de plantas (T3). I) Desafío de seis días donde se inyectaron 1×10^6 UFC/camarón. II) Desafío de catorce días donde se inyectaron 3×10^6 UFC/camarón.

Parámetro Inmunológico	Tratamiento	Bioensayo					
		I: 6 días			II: 14 días		
		Rango	Media	D.E	Rango	Media	D.E
Hemograma ($\times 10^5$ cel/ml)	T0	27,50 – 47,25	39,01	7,24	14,80 – 55,70	40,10	18,24
	T1	28,65 – 47,80	41,07	7,56	28,10 – 48,60	36,55	9,10
	T2	24,55 – 49,55	35,29	9,25	20,70 – 85,40	55,76	24,08
	T3	21,55 – 45,05	37,19	9,27	20,90 – 51,20	36,84	12,65
Coagulación (s)	T0	28,00 – 47,00	38,20	6,90	15,00 – 60,00	35,25	18,63
	T1	21,00 – 46,50	34,40	9,73	20,00 – 70,00	48,50	25,01
	T2	21,50 – 70,50	39,00	21,17	20,00 – 65,00	34,20	18,14
	T3	30,00 – 53,00	39,10	8,73	20,00 – 52,00	39,00	13,11
UFC ($\times 10^3$ /ml)	T0	0,04 – 4,90	1,74	2,01	0,13 – 34,30	9,62	16,50
	T1	0,10 – 16,58	4,44	8,10	0,42 – 33,88	11,58	19,31
	T2	0,02 – 8,23	2,05	3,50	0,06 – 50,18	15,40	20,65
	T3	0,03 – 11,48	2,50	5,03	0,20 – 5,04	3,40	2,77

UFC: Unidades Formadoras de Colonia.

D.E: Desviación Estándar

Anexo 4. Imágenes del proceso de experimentación realizada en los bioensayos donde se desafió a *Litopenaeus vannamei* con *Vibrio parahaemolyticus*. A) Aclimatización de camarones. B) Medición de oxígeno. C) Preparación de dietas. D) Alimentación de camarones. E) Pesaje de camarones. F) Fijación con Davidson. G) Distribución de peceras. H) Daño muscular por infección en camarones.

