



DIAGNOSTICO Y PREVENCION DE LA ENFERMEDAD DEL PUNTO BLANCO

Dra. Victoria Alday de Graindarge

CSA / Directora del Proyecto Unidad de Diagnóstico financiado por la Unión Europea



La presencia del virus del Punto Blanco en Centro América es preocupante pero no necesariamente alarmante. Las mortalidades que se presentaron en Asia no tienen porque repetirse. A diferencia de ellos nosotros sabemos de antemano que este virus existe, sabemos como se transmite y tenemos las herramientas para detectarlo a niveles muy bajos, lo que nos permite implementar medidas de prevención que minimizarán el impacto de la enfermedad.

El primer brote de La Enfermedad del Punto Blanco se presentó en China en 1993 y de ahí se extendió a Japón a través de la importación de larva infectada. Fue Japón el primero que notificó la existencia de este síndrome. El virus siguió extendiéndose por el resto de Asia hasta la India, pero no de forma natural, sino por el movimiento de animales infectados. El único país en Asia que no sufrió la enfermedad del Punto Blanco y que sigue libre de él, es Filipinas, que cerró sus fronteras a la importación de animales vivos cuando empezó a extenderse la epidemia.

Las mortalidades masivas en Tailandia se presentaron en 1994, sin embargo sabemos que el virus ya estaba presente en 1993. Siempre existe un lapsus desde que se presenta el virus hasta que reconocemos su presencia por las altas mortalidades que causa. El virus necesita un tiempo para amplificarse e instalarse en el sistema de producción y durante este periodo las mortalidades son bajas y pasan desapercibidas.

En las Américas, la enfermedad del Punto Blanco había sido detectada en poblaciones de camarón silvestres y de cultivo en Texas y Carolina del Sur. Recientemente ha sido detectado en

Honduras y Nicaragua siendo ésta la primera vez que se detecta en la costa Pacífica del continente Americano. En una visita a Honduras detectamos niveles altos de infección en el 20% de las muestras, que coincidían con animales de origen silvestre.

El virus recibió el nombre de los signos externos que producía cuando



apareció. Sin embargo, estos signos no siempre están presentes, o pueden presentarse sin la presencia del virus. Los puntos blancos, son depósitos de calcio que también pueden ser provocados por causas ambientales relacionadas con la concentración de Ca^{++} y el pH del estanque. Para verlos más fácilmente, se arranca la cutícula de la cabeza y con la uña del pulgar se rasca hasta retirar la epidermis.

TRANSMISION

El virus del Punto Blanco se transmite horizontalmente. No hay transmisión vertical, del reproductor al interior del huevo a diferencia de IHHN. Se han detectado oocitos infectados pero éstos

no se desarrollan y degeneran. Sin embargo, en el momento del desove, se liberan partículas víricas que se adhieren a la superficie de los huevos y contaminarán al animal una vez que abre la boca.

Otra forma de transmisión de la enfermedad es a través del canibalismo de animales moribundos o muertos y de las mudas de animales infectados o por la ingestión de partículas virales libres.

Una de las características más importantes en la transmisión de este virus es el gran número de huéspedes que tiene. Se sabe que no sólo todas las especies cultivadas de peneidos son sensibles a este virus, sino además cangrejos y otros crustáceos, e incluso copépodos y larvas de insectos acuáticos pueden ser infectados. El mayor riesgo lo presentan los portadores asintomáticos que tienen fácil acceso al estanque, como los cangrejos o las especies de camarón plantónico, que van liberando partículas víricas o que transmiten la enfermedad al ser ingeridos.

DIAGNOSTICO

Las técnicas que pueden usarse para el diagnóstico del virus del Punto Blanco dependerán del propósito:

1. Para diagnosticar un brote epidémico, es decir, animales enfermos
2. Para certificaciones, animales que no muestran signos de enfermedad pero que podrían ser portadores del virus. Por ejemplo, sería necesario hacerlo a los animales que vayan a entrar en nuestra granja: los



Artículos

reproductores en los laboratorios o la larva que se va a sembrar en los estanques.

Es muy importante que las muestras que se tomen sean de animales vivos, pueden ser animales moribundos, pero no deben estar muertos ya que se producen cambios en los tejidos inmediatamente.

DIAGNOSTICO DE UN BROTE EPIDEMICO

- **Signos externos:** en este caso, los signos externos pueden ser de gran ayuda como indicativos de una anomalía. Pero, como ya se ha dicho, no puede usarse como único medio de diagnóstico, se necesita confirmación.
- **Técnica rápida:** La fijación rápida de branquias es una técnica que puede ser realizada por el personal de la camaronera y que da una respuesta en 2 horas aproximadamente. Esta técnica permite identificar la enfermedad del Punto Blanco, Cabeza Amarilla, IHNV, vibriosis generalizada, micosis y epibiontes.

El resultado positivo de esta técnica rápida confirma la presencia del virus, sin embargo, un resultado negativo no significa que el camarón no esté infectado, necesita confirmarse por medio de histología. En el caso de animales enfermos no es necesario recurrir a técnicas de biología molecular que aunque nos pueden dar una respuesta son mucho más costosas que la histología.

Protocolo para la fijación rápida de branquias:

Todo el procedimiento se realiza en un tubo eppendorf u otro contenedor pequeño para el ahorro de químicos.

Técnica:

1. Se toma una muestra de branquias

y se la coloca en el tubo con fijador Davidson-HCl (se sustituye el ácido acético glacial con HCl) durante 1h.

2. Se tiñe con Hematoxilina y eosina:
3. Se lava con agua corriente en movimiento durante 15min. (se cubre la boca del tubo con una gasa para que el tejido no flote y se sumerja en el tubo). Se vacía.
4. Se añade etanol 100% durante 1min., se vacía y se repite 2 veces más.
5. Se añade etanol 95% durante 1min., se vacía y se repite 2 veces más.
6. Se lava con agua corriente en movimiento durante 10 min.
7. Se añade hematoxilina durante 10 min y se vacía.
8. Se lava con agua corriente en movimiento durante 15 min.
9. Se añade eosina durante 2 min y se vacía.
10. Se añade etanol 95% durante 1min., se vacía y se repite 2 veces más.
11. Se añade etanol 100% durante 1min., se vacía y se repite 2 veces más.
12. Añadir xileno durante 30 segundos, se vacía y se repite 2 veces más
13. Montarlo en una placa microscópica y cubrir.

Una vez preparado se observa al microscopio y pueden detectarse los cuerpos de inclusión característicos producidos por una infección del virus del Punto Blanco.

- **Histología:** Es una de las técnicas que da mas información, sin embargo tiene como inconvenientes que es lenta (36 horas) y no es tan sensible como las técnicas de biología molecular. Los animales (vivos) se inyectan con fijador Davidson, primero directamente en el hepatopáncreas y cabeza y luego en la cola. Es importante inyectar suficiente cantidad, hasta que no queden

signos de vida y haya cambiado de color. Es un problema común el que no se inyecta suficiente fijador, sobretodo en el hepatopáncreas, y ésto en muchas ocasiones imposibilita el diagnóstico, sin embargo no hay ningún problema si se inyecta demasiado fijador. Hay que usar guantes y tener precaución de que el fijador no entra en contacto con nuestra piel. Después de 24-72h dependiendo del tamaño del camarón, se transfiere a 50% etanol y puede enviarse para procesar.

Las células infectadas con LA ENFERMEDAD DEL PUNTO BLANCO tienen inclusiones intranucleares de color rosado a azul pálido en los tejidos epiteliales (estómago y subcutícula) y sobretodo en tejido conectivo.

CERTIFICACIONES

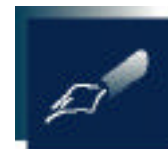
Si el animal no presenta signos externos de la enfermedad, no significa que no pueda estar infectado.

En este caso tenemos que detectar niveles muy bajos de infección para lo que necesitamos técnicas de biología molecular que detectan y amplifican el DNA del virus. La técnica más adecuada es el PCR. Existe otra técnica llamada Nested PCR que equivale a un doble PCR, haciéndola muchísimo más sensible.

Los inconvenientes de estas técnicas son:

- el elevado costo
- requieren personal y equipo altamente especializado
- existen inhibiciones y contaminaciones que pueden dar resultados falsos positivos y negativos

Las muestras para estas técnicas pueden ser hemolinfa, tejido congelado, tejido fijado en 70-95% etanol y también podría usarse tejido fijado para histología, pero éste último requiere un



paso adicional de extracción de DNA.

TRATAMIENTO

Como para cualquier enfermedad vírica, no existe tratamiento.

Tampoco existen vacunas ya que el sistema inmune del camarón no está capacitado para dar esa respuesta.

Los antibióticos no tienen efecto contra los virus, estos pudieran tratar la infección bacteriana que podría presentarse como consecuencia de una infección vírica pero la enfermedad vírica seguiría presente.

La única forma de evitar o amortiguar el impacto de la enfermedad del Punto Blanco o cualquier otra enfermedad vírica es con la prevención.

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN

Obviamente las medidas de prevención estarán destinadas a evitar que estos virus entren en nuestro sistema de producción. Lo primero que necesitamos saber es la extensión del problema en Ecuador y en los países fronterizos. Necesitamos hacer un muestreo a lo largo de la costa tanto de camarón silvestre y de cultivo, como de cangrejos y otros crustáceos. El resultado de este muestreo podría ser (1) que el virus esté ampliamente extendido en el ecosistema o (2) que éste haya sido un brote aislado. Como no tenemos la respuesta, vamos a considerar las medidas necesarias en ambos casos:

- Medidas globales para evitar la introducción del virus en la región y su extensión en el caso de que sea un brote aislado
- Medidas a nivel individual que cada camaronero deberá seguir para evitar que el virus entre en su sistema de producción, en caso de estar ya éste presente en el área.

LA ENFERMEDAD DEL PUNTO BLANCO AMENAZA AL ECUADOR???

Comentario del Dr. James Brock experto en diagnóstico de enfermedades de camarón

El Virus del punto blanco (white spot, WSSV) y de la cabeza amarilla (yellow head, YHV) son transmitidos a los nauplios por medio de reproductores infectados a través de la adhesión de partículas víricas que se adhieren a la superficie de los huevos. Generalmente los nauplios y las postlarvas se mantienen asintomáticas y la enfermedad no se desarrolla sino hasta que el camarón sea mayor. Por lo tanto, los nauplios, las postlarvas y los reproductores son portadores de éstas enfermedades. Estos virus pueden esparcirse rápidamente a regiones camaroneras distantes de un área infectada via la transferencia de camarones vivos

Una vez que un área está contaminada, el WSSV y el YHV infecta a los camarones silvestres, y en el caso del WSSV, la infección puede extenderse a una gran variedad de crustáceos.

En la actualidad, el WSSV es residente en camarones silvestres (juveniles) del Golfo de Fonseca. La generación actual, crecerá y migrará fuera del Golfo como reproductores, cuando éstos sean capturados y desoven, las larvas que provengan de hembras infectadas portarán la infección.

En Asia, se han hecho muchos esfuerzos para la aplicación de pruebas de PCR especialmente para el chequeo de WSSV en reproductores, nauplios y postlarvas. Cuando se encuentran lotes infectados, no se los utiliza para sembrar los estanques. Esto ha ayudado a disminuir la cantidad de camarones infectados en las camaroneras y la frecuencia de

ocurrencia de altas mortalidades en los estanques a causa de esta enfermedad.

Adicionalmente, el WSSV y el YHV, pueden ingresar a los estanques a través de camarones infectados u otros crustáceos huéspedes que se encuentren en la camaronera y en el estuario, de ahí que una vez que una camaronera u área camaronera ha sido infectada, la enfermedad se mantiene en huéspedes alrededor de ese ambiente. El manejo de estas fuentes de contaminación requiere de cambios drásticos en las estrategias de manejo de agua para evitar la entrada de los huéspedes al estanque o al sistema de distribución de agua.

El WSSV y el YHV pueden ingresar al Ecuador muy rápidamente a través de la importación de reproductores, nauplios y postlarvas infectadas y asintomáticas. Para reducir el riesgo de esto, se debe evitar la importación de estos animales desde la región infectada e incluso sus áreas adyacentes.

La prueba de PCR para WSSV y YHV debería implementarse rápidamente en el Ecuador y adicionalmente establecer un programa de monitoreo para el chequeo de estos agentes en camarones.

Otra forma de esparcimiento de estos virus puede ser los procesos naturales (sin la intervención del hombre), esto pudiera ser la diseminación en poblaciones naturales de camarones de la costa baja del Pacífico de América Central alcanzando el Ecuador; no sé si este proceso podría ocurrir o cuál pudiera ser la tasa de movimiento de estos virus. ■



Artículos

1. Medidas globales:

- La ruta más común de transmisión del virus es la introducción de animales vivos: reproductores, nauplios y postlarvas. El movimiento de camarones vivos debe restringirse y exigirse certificaciones sanitarias. En el caso de aparecer un brote epidémico, la zona afectada debe aislarse y no sólo prohibir todo movimiento de camarón sino también de otros crustáceos. Debe existir un acuerdo a nivel regional ya que la continuidad del agua costera no reconoce fronteras y lo que se introduce en los países vecinos nos llegará con relativa facilidad.
- Otra posible ruta de introducción de estos virus es con productos de camarón de zonas afectadas: tales como el camarón congelado, camarón procesado o balanceado producido con cabeza de camarón.
 - a) El camarón crudo congelado proveniente de áreas infectadas por la enfermedad del Punto Blanco puede presentar un riesgo importante de introducción del virus, dependiendo del uso que se le va a dar:
 - Si se usa para cebo de pesca o para alimentación de camarón sin más procesamiento, el riesgo es alto.
 - Si se usa para procesar, existe la posibilidad de que haya virus activos en el camarón congelado y sea liberado al exterior con los desperdicios. Esta es la hipótesis que se ha manejado para explicar los brotes de la enfermedad del Punto Blanco en Texas y Carolina del Sur. Debe existir una legislación que obligue a las empacadoras:
 - Al tratamiento de los desperdicios sólidos y líquidos aún cuando sólo procese camarón local.
 - Los camiones de transporte deben ser desinfectados (interior, y exterior incluidas las ruedas) después de cada transporte.
 - Las empacadoras deberían estar alejadas de las camaroneras y del origen de su agua. La enfermedad del Punto Blanco es inactivada con hipoclorito sódico a 5ppm durante 10 min o 1 ppm durante 30 min. El yodo lo inactiva con 10ppm durante 30min, o ClNa 12.5% en 24h a 25°C
 - Cualquier empacadora que trate con muestras de crustáceos debe seguir las mismas precauciones
- Si el uso del camarón congelado es para consumo humano directo, es difícil imaginar algún riesgo.
 - b) Con la importación de camarón procesado ya sea cocido, desecado o salado, no existe riesgo de introducción de la enfermedad del Punto Blanco.
 - c) La cabeza de camarón que se desecha en las procesadoras es en ocasiones usado para balanceado. Se ha demostrado que no hay riesgo de transmisión de la enfermedad del Punto Blanco con balanceado hecho con cabeza de camarón aunque haya estado infectado. Experimentos han mostrado que la enfermedad del Punto Blanco en agua marina estéril era inactivada al calentar el agua a 50°C durante 20 min y por desecación a 30°C durante 1h. Lo cual haría imposible que el virus mantuviera su actividad después del procesamiento de balanceado.
- Agua de lastre de los barcos ha resultado en introducciones accidentales de nuevas especies y patógenos a lo largo de los años. Los barcos de carga rellenan y vacían sus tanque de agua de forma rutinaria para dar estabilidad al barco. Un barco grande de carga

puede llevar entre 2 y 14 billones de galones de agua de lastre y en este agua puede transportar animales infectados. El aumento del comercio y de los viajes, y el mayor tamaño y velocidad de los barcos, hace que esta posibilidad aumente día a día. Se han sugerido soluciones como calentar el agua de lastre, pero la temperatura necesaria para que fuera efectiva lo hace económicamente inviable. También se ha sugerido usar químicos, sin embargo, eso requeriría el acuerdo a nivel intergubernamental y podría ser además un riesgo para la tripulación y el medio ambiente. La mejor solución que se ha ofrecido hasta ahora es el cambio de agua de lastre cuando el barco llega a alta mar. Los organismos recogidos en la costa perecerían al ser liberados en alta mar por el choque osmótico. Así mismo los recogidos en alta mar, perecerían al ser liberados en la costa. Sin embargo los barcos viajando a lo largo de la costa dirección Norte/Sur, no podrían llevar a cabo esta medida. Esta sería una medida sólo temporal hasta que mejorara la tecnología y el diseño de los barcos para reducir el riesgo de invasiones, pero debería hacerse obligatoria para barcos moviéndose entre ciertas regiones.

2. Medidas a nivel individual

A nivel de laboratorio:

El virus del Punto Blanco no provoca patología en etapas larvarias aunque estén infectados. Las mortalidades se presentan únicamente en reproductores y camaroneras.

- La medida más importante es que los animales que ingresen en la granja estén libres de la enfermedad del Punto Blanco, para ello hay que examinarlos con PCR. Para reproductores se pueden tomar muestras que no dañen al animal (un pleópodo).



- No alimentar los reproductores con alimento fresco sobre todo camarón u otros crustáceos. Cuando un animal muere no darle de comer a los otros.
- Los huevos o nauplios deben ser lavados con agua estéril o añadiendo un desinfectante como el iodo.
- Para que el agua sea segura y excluya posibles portadores del virus, debe ser filtrada a 10 micrones.

La gran duda en este momento es si la *Artemia* es capaz de transmitir el virus. En el caso del camarón no hay transmisión vertical, así que es posible que ahí tampoco la haya, sin embargo existe la posibilidad y se está estudiando.

A nivel de camaronera:

- La larva que sembramos tiene que estar libre de estos virus. Nosotros recomendamos que se tome una muestra de unos 1000 animales de diferentes puntos de las tinajas y juntarlos en un pozo. Hacer girar el agua y tomar 150 animales del centro para examinarlos por PCR.
- Antes de sembrar, el estanque ha tenido que ser tratado para que no existan animales portadores del virus. Pueden usarse mallas para filtrar el agua de entrada e incluso podría usarse pesticidas de corta vida. Es importante el uso de redes anti-cangrejos en donde exista el riesgo de que puedan introducirse en los estanques.
- En el caso de que aparezca un brote epidémico, lo más recomendable es hacer una cosecha de emergencia sin vaciar el estanque. El estanque tiene que ser cerrado y el agua tratada con químicos hasta que todo el camarón restante y otros habitantes del estanque perezcan. Sólo entonces se puede liberar el agua. Los estanques y las instalaciones de las camaroneras afectadas deben ser aislados y desinfectados. 

¿CALIDAD LARVAL Y POSTLARVAL: MITO O REALIDAD?

Jef Peeters

VVOB / CENAIM / San Pedro de Manglaralto, Ecuador



Según el Pequeño Larousse Ilustrado, la palabra 'calidad', femenina, proveniente de la palabra latina *qualitas*, puede referirse tanto al 'conjunto de cualidades (=propiedades) de una cosa' como a la 'superioridad, excelencia de una cosa'. Una distinción sutil, pero importante en una palabra, que puede tener consecuencias económicas.

Porque, ¿Qué es lo que esperamos de los métodos que determinan la calidad en (post)larvas? ¿Qué nos la describan? Como indica la primera definición, o que nos confirmen la superioridad, según la segunda explicación.

Hay, entonces, una necesidad de delimitar este término. De otra manera, ¿Cómo vamos a investigar o discutir sobre algo de lo cual ni siquiera disponemos de una definición unívoca?

Llamemos calidad al conjunto de cualidades de la larva o postlarva, y utilicemos los adjetivos (mala, regular,

bueno, ...) para describir tal calidad o cualidad.

Ahora, la aproximación semántica que utilizamos para el análisis, nos revela también otro aspecto de la problemática: ¿Son pruebas de calidad, las que utilizamos, o son solamente pruebas de cualidad? Si la larva presenta una buena resistencia frente a un estrés osmótico, indudablemente demostramos que su sistema osmorregulador está funcionando bien. ¿Hasta qué punto podemos extrapolar tal buena cualidad a todos los sistemas y aparatos del animal, a su calidad? Estoy pensando, por ejemplo, en la cualidad 'resistencia a enfermedades'.

Pero no sólo está el hecho de 'cuál' es la calidad. Para enfocar bien los resultados que queremos obtener hay que saber también el 'por qué' de la investigación, el 'por qué' de la calidad larval.

En el fondo hay únicamente una razón.



Artículos

Si yo compro nauplios, quiero estar seguro que se muere el menor número posible durante una larvicultura, porque estoy considerando las implicaciones económicas que esta mortalidad conlleva. Pero hay una asunción importante contenida en este razonamiento: que la calidad de mi protocolo es buena. Porque la cantidad de postlarvas que voy a obtener, no sólo depende de la buena calidad de los nauplios, sino también de cómo los manejo durante la larvicultura. Y ¿Cuál de estas dos calidades es más importante?

¿Es, por ejemplo, razonable hipotetizar que si dispongo de una buena técnica de larvicultura, no es tan importante la calidad de los animales, ya que la buena calidad de mi manejo contrarrestaría la mayoría de las desventajas que supone una larva mala? Mientras tanto, los costos de producción ejercen una gran presión para desviarnos de los procedimientos óptimos.

Sea como sea, existe la necesidad de investigar (y recopilar información acerca de) tanto la calidad del tratamiento como la calidad del animal y cómo interactúan, porque en la práctica estos dos conceptos están íntimamente entrelazados.

¿Por qué dar tantas vueltas al asunto? ¿No es así que ya hay pruebas para determinar la calidad? Echemos un vistazo a la reina de las pruebas actuales.

En la literatura encontramos varios artículos (Tackaert, 1989, Rees, 1994, Dhert, 1992) que tratan sobre la determinación de la calidad de postlarvas por medio de una prueba de estrés - en este caso, osmótico.

El diseño de sus experimentos es muy similar: alimentan larvas con dietas que contienen cantidades diferentes de HUFA, y, al final de la larvicultura miden la resistencia de estos animales frente a un choque osmótico. Hay dos

elementos importantes en estos diseños: 1) las pruebas fueron ejecutadas por las mismas personas, bajo condiciones iguales y con réplicas por cada tanque y 2) se decidió que un tratamiento fue mejor que otro, basándose en la comparación de los resultados de la prueba de estrés, y no en un valor absoluto.

En el Ecuador las pruebas de estrés no se hacen: ni por el mismo observador, ni al mismo tiempo, ni bajo las mismas condiciones estándar, ni con réplicas, y se utiliza un límite arbitrario de 90% de sobrevivencia, origen del cual, aparte de mencionarlo Brock (1994), queda completamente oscuro. Estadísticamente, si en la prueba de estrés, obtenemos 90% de sobrevivencia en una muestra de 100 animales, el verdadero valor del tanque va estar comprendido entre 95 y 82% (con 95% de confiabilidad). Sin tener en cuenta que podemos haber cometido un error en el procedimiento, porque aquél estaría cubierto por las réplicas que no tenemos. ¿Usted mandaría larvas a la camaronera que tienen menos de 90%? Pues, lo está haciendo.

Sin embargo, es una de las pruebas más utilizadas para determinar la calidad postlarval.

Cautelosamente, se podría afirmar que por el momento pruebas de estrés igual tienen una aplicabilidad en experimentos científicos (prueba comparativa), pero que es dudosa su aplicación en la práctica (prueba absoluta), hasta que no se haya hecho un ejercicio de intercalibración y uno de correlación con los resultados obtenidos en la camaronera.

¿Es entonces un mito, la calidad larval?

Puede ser que en la práctica resulta imposible descomponer la producción final en la calidad de tratamiento y en la calidad del animal. O que, para determinar la calidad, hay que servirse de tantas pruebas de cualidad que la

totalidad resulta inejecutable en la práctica.

¿O es una realidad?

El proyecto 'calidad de nauplios y postlarvas' que se desarrolla en el CENAIM va a intentar despejar algunas dudas de los aspectos arriba mencionados. Llevando a cabo una larvicultura continua, organizada en varios ciclos, vamos a evaluar pruebas de calidad, utilizando como criterio la supervivencia y crecimiento al final del periodo. Para los nauplios esto significa que los resultados de la prueba tienen que estar correlacionados con el rendimiento al final de la larvicultura ($\pm$ PL10), para postlarvas con el rendimiento al final de un periodo de precría.

El diseño experimental permitirá evaluar también métodos de larvicultura, de aclimatación, de transporte y de precría. Es decir, investigando también la calidad del animal en función de la calidad del tratamiento.

Agradecemos de antemano sus reflexiones acerca de este texto y de la problemática en él expuesto.

BIBLIOGRAFIA

- Postlarval fitness: stress test, en appendix B de A guide to the common problems and diseases of cultured *P. vannamei*. J.A. Brock & K.L. Main. 1994. The Oceanic Institute. Honolulu.
- Tackaert, W., P. Abelin, P. Leger & P. Sorgeloos. 1989. Stress resistance as a criterium to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures. Proceedings III Simposio Brasileiro sobre cultivo de camarão vol. I.
- Dhert, P., P. Lavens, & P. Sorgeloos. 1992. A simple test for quality evaluation of cultured fry of marine fish. Med. Fac. Landbouww. U.G. 57/4b.
- Rees, J.F., K. Cure, S. Pyatiratitivorakul, P. Sorgeloos & P. Menasveta. Highly unsaturated fatty acid requirements of *P. monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. Aquaculture.



USO DEL DESECHO DE LA CERVECERÍA COMO SUSTITUTO PARCIAL DE LA PROTEÍNA ANIMAL MARINO EN DIETAS PARA JUVENILES *LITOPENAEUS VANNAMEI*

César Molina

CENAIM / Nutrición Acuícola / San Pedro de Manglaralto, Ecuador

INTRODUCCION

El incremento en la demanda de alimentos ha producido un constante crecimiento de la acuicultura a nivel mundial. Parte fundamental en la elaboración de los alimentos usados para el cultivo de especies acuáticas han sido las fuentes de proteína animal de origen marino. Sin embargo los costos y disponibilidad de estos insumos ha conducido a explorar nuevas fuentes alternativas de proteína y a usar más sustitutos proteicos vegetales o de otras especies de animales en los alimentos, los cuales deben ser de buena calidad proteica, estar disponibles en abundancia y tener un menor precio (D'Abramo y Lovell, 1991).

Los alimentos comerciales a nivel mundial para camarón contienen de 22 a 50 % de proteína, siendo la proteína marina, por su alto valor nutritivo y palatabilidad, uno de los componentes más caros del alimento. Una disminución del contenido de proteína marina hasta niveles que no afecten la tasa de crecimiento de la especie de cultivo, disminuiría el costo del alimento, y reduciría su explotación para consumo animal.

Como alternativa a la utilización de la harina de pescado en las dietas para camarón, se han formulado alimentos balanceados en donde se incluyen materias primas que reemplazan, la proteína de origen marino, tales como la harina de soya, harina de Girasol, harina de sangre, subproductos de la industria de procesamiento comercial de pescado y mariscos; y a nivel de ensayos harina de hojas de: camote,

papaya y leucaena (Lim y Dominy, 1988, Peñaflorida, 1995).

Los desechos que genera la industria cervecera podrían ser empleados como nuevas fuentes proteicas en dietas para acuicultura. Esto trae como beneficio adicional la disminución de la contaminación ambiental.

El proceso de elaboración de cerveza involucra dos pasos, la sacarización y posterior fermentación de los azúcares para la obtención del alcohol mediante la levadura de cerveza. Al final del proceso se obtiene un desecho compuesto principalmente por agua, cebada malteada y levadura de cerveza. Este desecho contiene 5% de sólidos lo que se conoce como extracto de afrecho de cerveza (EAC) compuesto de 30% de proteína, 11% de lípidos, 4% de fibra, 5% cenizas y 50% de carbohidratos solubles, aproximadamente.

A la fecha, no hay ningún trabajo que evalúe el uso del EAC como sustituto para una mezcla de harina de pescado, camarón y calamar. Por lo tanto el presente estudio fue conducido para comparar el crecimiento, supervivencia, digestibilidad, tasa de conversión de alimento (TCA), tasa de eficiencia de proteína (TEP) y tasa de ingestión del juvenil *Litopenaeus vannamei* alimentado con dietas conteniendo varios niveles de EAC.

MATERIALES Y METODOS

Bioensayo de crecimiento

Camarones juveniles *L. vannamei*, de

origen de laboratorio, fueron aclimatados a las condiciones experimentales y alimentados con una dieta de 44% de proteína por 5 días. Los camarones con un peso promedio de 2.14 ± 0.21 g fueron colocados en acuarios de 55 l a una densidad de 5 por acuario. Cada tratamiento tuvo cinco réplicas. Los acuarios, fueron continuamente suplidos con agua de mar con una tasa de recambio diario de 1000%. Las dietas, distribuidas aleatoriamente, fueron suministradas diariamente en una cantidad equivalente al 10% de la biomasa de cada acuario, dividida en dos raciones iguales (09h00 y 16h00) y ajustadas cada 14 días, después del pesaje de los animales. El alimento sobrante fue removido por sifoneo todas las mañanas junto con restos de mudas y heces.





Artículos

El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura del agua fue mantenida a 26.8 ± 0.8 °C mediante un calentador general. El oxígeno disuelto, pH y la salinidad del agua de mar usado en el experimento se mantuvieron a 7.3 ± 1.0 mg/l; 8.2 ± 0.6 ; 33 ± 1 ups, respectivamente.

Dietas experimentales

Cuatro dietas experimentales fueron preparadas reemplazando la proteína animal de origen marino con 0% (Dieta A, control) 16% (Dieta B), 32% (Dieta C) y 48% (Dieta D) de EAC. La formulación y el análisis proximal de las dietas experimentales se describen en la Tabla 1. El contenido de proteína fue ajustado con gluten de trigo para proveer aproximadamente

44% de proteína. Tierra de diatomea fue suplementada para balancear la fórmula al 100%. El óxido de cromo fue incluido como un indicador para el análisis de digestibilidad aparente de proteína y materia seca. Todos estos ingredientes fueron mezclados, humedecidos y pelletizados en un molino de carne Oster®. Los fideos de 2 cm de diámetro fueron secados en una estufa a 50 °C por 2 horas, luego fueron transferidos a fundas plásticas y mantenidos a 10 °C hasta su uso. Proteína cruda, extracto etéreo, cenizas, humedad, fibra cruda y energía fueron determinados a las dietas (Molina y Paredes, 1997).

Bioensayo de digestibilidad de proteína y materia seca

Al final del bioensayo de crecimiento que duró 45 días se empezó a coleccionar las heces, sobre una malla, cada 2 horas durante una semana. Las heces separadas del alimento sobrante fueron lavadas con agua destilada para remover las sales del agua, e inmediatamente mantenidas en un baño de hielo para disminuir la lixiviación de la proteína soluble. El material fecal fue centrifugado a 13500 rpm por 5 min a 4 °C, para descartar el exceso de agua, congelado a -80 °C y posteriormente liofilizado. La aparente digestibilidad de la proteína (ADP) y de la materia seca (ADM) fue calculada mediante las

siguientes ecuaciones:

$$\% ADP = \left[1 - \frac{[\% \text{proteína} / \% \text{Cr}_2\text{O}_3]_{\text{heces}}}{[\% \text{proteína} / \% \text{Cr}_2\text{O}_3]_{\text{dietas}}} \right] \times 100$$

$$\% ADM = \left[1 - \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{dietas}}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3_{\text{heces}}} \right] \times 100$$

Bioensayo para determinar la tasa de ingestión

Durante 3 días, se colectó de cada acuario el alimento no consumido dentro de las 3 horas desde su suministro. El alimento, colectado en una malla previamente pesada, fue lavado con agua destilada, secado a 60 °C por 24 horas y pesado con una exactitud de 0.01g. Cada mañana se removió restos de mudas y heces previo a la primera alimentación.

Análisis estadístico

Los resultados fueron ensayados para normalidad por el método de Anderson-Darling y para homogeneidad de varianza por la prueba de Levin. Análisis de varianza ANOVA fue empleado para establecer diferencias significativas ($p < 0.05$). Cuando se observó un efecto significativo del tratamiento, un análisis de comparación de pares por LSD (Least Significant Difference) fue ensayado. Correlaciones entre parámetros fueron determinadas por análisis de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSION

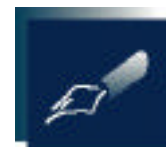
Crecimiento y supervivencia

Al término de los 45 días de cultivo, los camarones en todos los tratamientos tuvieron una supervivencia superior al 95% sin diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos (Tabla 2).

No se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) en términos de peso al final del ensayo entre los camarones alimentados con las dietas A y B, pero estos presentaron un peso promedio significativamente superior a las dietas C y D (Tabla 2). Con los

Tabla 1. Composición y análisis proximal de las dietas ensayadas.

Ingredientes (%)	A	B	C	D
Proteína Animal Marina	48.4	32.4	16.4	0
EAC	0	16	32	48.4
Harina de Soya	20	20	20	20
Lecitina	1	1	1	1
Colesterol	0.5	0.5	0.5	0.5
Mezcla Vitamínica	4.5	4.5	4.5	4.5
Mezcla Mineral	2.00	2.00	2.00	2.00
Aglutinantes	1.00	1.00	1.00	1.00
Etotoquin	0.02	0.02	0.02	0.02
Oxido de cromo Cr ₂ O ₃	1	1	1	1
Maicena	13.66	6.71	0.00	0.00
Gluten de trigo	2.95	7.56	12.18	16.91
Aceite de Pescado	4.98	5.24	5.26	2.43
Tierra de diatomea	0.00	2.08	4.15	2.25
	100.0	100.0	100.0	100.0
Análisis (% en base seca)				
Humedad	10.32	11.41	10.52	13.62
Proteína	44.32	43.85	44.16	44.95
Lípidos	12.44	13.05	12.16	8.02
Fibra	6.91	5.20	3.30	1.02
Oxido crómico, Cr ₂ O ₃	1.11	1.45	1.33	1.20
Energía bruta (Kcal/100g)	340.0	381.9	393.3	399.5



aumentos graduales de EAC se observó una disminución significativa ($p<0.05$) en el peso final siendo la dieta D la que dio el más pobre rendimiento. Se ha reportado que los granos de destilería con solubles son un buen sustituto para la harina de pescado y soya en la dieta para el pez gato *Ictalurus punctatus*, sin efecto adverso en el crecimiento y supervivencia (Webster *et al.*, 1992). La reducción en crecimiento observada en experimentos donde fuentes alternativas de proteína reemplazaron a la harina de pescado u otros suplementos de proteína animal marina en dietas formuladas, han sido atribuidos al pobre perfil de aminoácidos de las fuentes alternativas (Lim y Dominy, 1988). Aunque en *L. vannamei*, no han sido determinados los requerimientos dietéticos para la mayoría de aminoácidos, es razonable asumir que el reemplazo total de proteína animal marina con EAC bajo condiciones isonitrogenadas e isocalóricas redujeron el crecimiento

hoja de papaya a dietas para *P. monodon*. Al igual que en este estudio, en niveles por encima del 16% el crecimiento fue significativamente inferior que en el control.

no se incrementó por que la harina de cabeza de camarón que contiene altos niveles de quitina (carbohidrato pobremente digestible) fue reducida en la dieta.

Tasa de ingestión, conversión alimenticia (TCA) y eficiencia proteica (TEP)

La cantidad de alimento no consumido por la biomasa estuvo positivamente correlacionado ($r^2=0.99$, $p<0.001$) con el nivel de inclusión de EAC en las dietas (Figura 1). El alimento no consumido empezó a incrementarse cuando se incorporó el EAC en la dieta lo que pareció ser relacionado a la palatabilidad. Ha sido reportado que la harina de malta, obtenida del subproducto de la destilación de cerveza, no es agradable para la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Yamamoto *et al.*, 1994). En tanto que Kohler y Krueger (1985) aplicando EAC a piscinas de cultivo de *Macrobrachium rosenbergii* reportaron que EAC mostró ser una fuente de alimento para este crustáceo así como también para los organismos planctónicos. Aunque la causa de la reducida palatabilidad es desconocida, estudios adicionales deberán resolver estos problemas para la incorporación de EAC en mayores niveles.

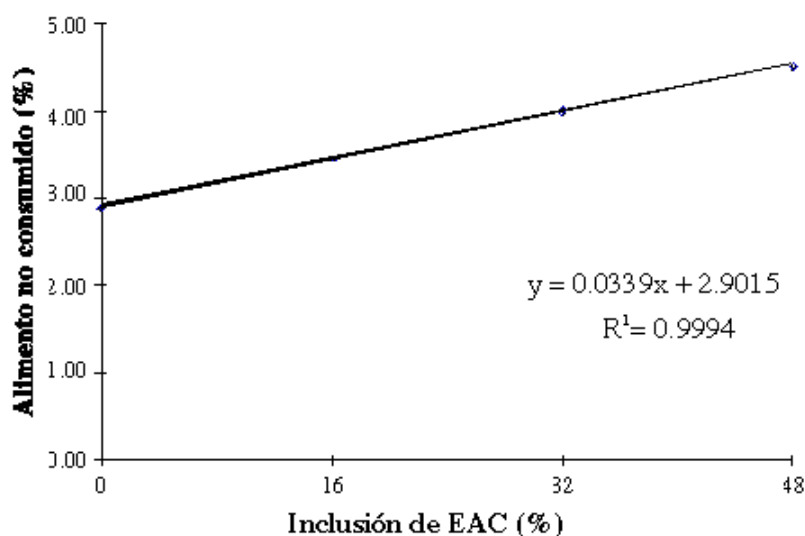


Fig. 1.- Alimento no consumido, conteniendo varios niveles de EAC, por el *L. vannamei*.

Tabla 2. Supervivencia, crecimiento y biomasa del *L. vannamei* alimentados por 6 semanas. n=5, Media $\pm$ desviación estándar (*)

	A	B	C	D
Peso inicial	2.13 $\pm$ 0.23a	2.13 $\pm$ 0.24a	2.12 $\pm$ 0.21a	2.18 $\pm$ 0.24a
Peso final	7.62 $\pm$ 1.45a	7.16 $\pm$ 1.41a	6.27 $\pm$ 0.91b	4.64 $\pm$ 0.78b
Biomasa final	182.9a	174.9a	154.7b	113.4b
Supervivencia	96a	96a	100a	96a

* Letras iguales en la misma fila no son diferentes significativamente ($p>0.05$)

como resultado de una deficiencia de aminoácidos en las dietas con EAC.

En el presente estudio, EAC fue capaz de reemplazar 16% de la mezcla de proteína marina sin afectar el peso ganado comparado al grupo control. Esto está de acuerdo a los resultados obtenidos por Peñaflorida (1995) de incorporar 16% de una fuente de proteína alternativa, como la harina de

Por otro lado Wee (1991) indicó que con un reemplazo bajo, el crecimiento obtenido no difiere del tratamiento control, porque los demás ingredientes en la dieta pueden suplir nutrientes adecuados. Así también, es conocido que a medida que se incrementan los niveles de fuentes de proteína de origen vegetal, aumenta el contenido de fibra en la dieta. En el presente estudio, sin embargo, el contenido general de fibra



Artículos

Tabla 3. Rendimiento de las dietas experimentales conteniendo varios niveles de EAC. n=5, Media $\pm$ desviación estándar (*)

Dietas	TEP	TCA	Digestibilidad	
			Materia Seca	Proteína
A	1.0 $\pm$ 0.3a	2.3 $\pm$ 0.6a	70.92 $\pm$ 1.62a	83.33 $\pm$ 0.34a
B	0.9 $\pm$ 0.2a	2.5 $\pm$ 0.4a	72.35 $\pm$ 1.09a	83.08 $\pm$ 1.01a
C	0.8 $\pm$ 0.1a	3.0 $\pm$ 0.6a	69.05 $\pm$ 4.74a	82.51 $\pm$ 3.17a
D	0.5 $\pm$ 0.1b	4.6 $\pm$ 0.8b	78.77 $\pm$ 2.59b	90.07 $\pm$ 1.11b

* Letras iguales en la misma columna no son diferentes significativamente ($p > 0.05$)

La TCA y la TEP fueron iguales para las dietas A, B y C (Tabla 3) pero en estas dietas los resultados fueron significativamente ($p < 0.05$) mejores que en la dieta D. Lim y Dominy (1988) notaron que niveles de inclusión mayores a 16% de fuentes alternativas de proteína pueden resultar en crecimiento reducido y pobre eficiencia del alimento, debido a un inadecuado balance de amino ácidos y minerales, presencia de factores antinutricionales y decrecimiento de la palatabilidad.

ENSAYO DE DIGESTIBILIDAD

La aparente digestibilidad de proteína varió entre 82.5 y 90.0% y la aparente digestibilidad de materia seca entre 69.1 y 78.8% (Tabla 3). La dieta D conteniendo 48% de EAC presentó una digestibilidad significativamente ($p < 0.05$) mayor en términos de proteína y de materia seca en comparación a las demás dietas ensayadas. Estos resultados son superiores a los reportados por Fenucci *et al.* (1982) quienes al alimentar con una dieta con 12.5% de levadura de cerveza a *P. stylirostris* de 1 y 10g obtuvieron digestibilidades de proteína de 58 y 71%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la digestibilidad de proteína varía para diferentes especies y probablemente

refleja los diferentes patrones nutricionales naturales.

CONCLUSIONES

Basados en los resultados de crecimiento, supervivencia, alimento no consumido y digestibilidad para juvenil *L. vannamei*, 16% de la mezcla proteína animal marina puede ser reemplazada por EAC en dietas de 44%. Sin embargo, la TCA, la TEP y la digestibilidad de proteína fueron estadísticamente iguales en las dietas conteniendo 0%, 16% y 32% de EAC. Esto sugiere que si el balance de aminoácidos y la palatabilidad pueden ser mejorados, el nivel dietético del EAC podría ser incrementado hasta un 32%.

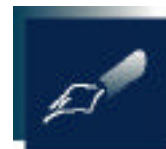
Considerando que solo la Cervecería Nacional desecha diariamente alrededor de 50 m³ conteniendo 750 kg de proteína, podría sugerirse que si se elabora cerveza durante 330 días al año habría suficiente proteína para producir aproximadamente 5000 TM de balanceado de 44% de proteína con 16% de EAC. Por lo tanto, es importante desarrollar un proceso que permita obtener el EAC como un subproducto de bajo costo, lo cual permitiría incorporarlo fácilmente en el balanceado empleado por la industria camaronera.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a la Cervecería Nacional por suplir con el extracto de afrecho de cerveza para la elaboración de las dietas experimentales y a la Srta. María Elena Solórzano por su asistencia técnica durante el desarrollo de la parte experimental.

BIBLIOGRAFIA

- D'Abramo, L. R. y Lovell, R. T. 1991. Aquaculture research needs for the year 2000: fish and crustacean nutrition. *World Aquaculture* 22: 57-62.
- Fenucci, J. L., Fenucci, C., Lawrence, A. L. y Zein-Eldin, Z. P. 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp, *Penaeus stylirostris*. *Journal World Mariculture Society*
- Kohler, C. y Krueger, S. 1985. Use of pressed brewer's grain as feed for freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal World Mariculture Society* 16: 181-182.
- Lim, C. y Dominy, W. 1988. Utilization of plant proteins by warm water fish. *AOCS World Congress Vegetable Protein Utilization in Human Food and Animal Feedstuffs*, Singapore, October 2-7, 1988.
- Molina, C. y Paredes Y. 1997. Técnicas Analíticas para Nutrición Acuicola. En *Manual de Técnicas para Nutrición Acuicola*. Escuela Superior Politécnica del Litoral y Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. 1-53.
- Peñaflorida V. D. 1995. Growth and survival of juvenile tiger shrimp fed diets where fish meal is partially replaced with papaya (*Carica papaya*) or camote (*Ipomea batatas lam*) leaf meal. *The Israeli journal of Aquaculture-Bamidgeh* 47: 25-33.
- Webster, C. D., Tidwell, J. H. and Goodgame, D. H. and Mackey, L. 1992. Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 106: 301-309.
- Wee, K. L. 1991. Use of non-conventional feedstuffs of plant origin as fish feeds - Is it practical and economically feasible? pp. 13-32. In: S.S. de Silva (ed.). *Fish Nutrition Research in Asia Proc. 4th Asian Fish Nutr. Workshop*. Asian Fish. Soc. Spec. Publ. 5p. Asian Fish. Soc., Manila, Philippines.
- Yamamoto, T., Marcouli, P. A., Unuma, T. and Akiyama, T. 1994. Utilization of mal protein flour in fingerling rainbow trout diets. *Fisheries Science* 60: 455-460. 



PROBLEMAS BACTERIANOS EN LA INDUSTRIA CAMARONERA ECUATORIANA, PRACTICAS DE MANEJO Y ALTERNATIVAS DE CONTROL.

Marina Peeters y Jenny Rodríguez
CENAIM / Microbiología e Inmunología / San Pedro de Manglaralto, Ecuador

PROCESOS INFECCIOSOS QUE AFECTAN EL CULTIVO DEL CAMARÓN EN EL ECUADOR.

El acelerado crecimiento de la industria camaronera en el Ecuador ha sido acompañado del aumento del impacto de las enfermedades, resultando en pérdidas económicas para esta industria. Existen dos tipos principales de enfermedades: las no infecciosas, causadas por factores abióticos y las infecciosas, causadas por una gran variedad de organismos patógenos, virus, bacterias, parásitos y hongos.

Se conocen once enfermedades causadas por virus que pueden afectar el cultivo de camarón. En el Ecuador, hasta al momento, se han diagnosticado dos virus como patógenos serios para *Penaues vannamei*, el virus causante del síndrome de Taura (TSV) y el Virus de la infección hipodermal y necrosis hematopoiética (IHNN) encontrado en animales adultos y posiblemente transmitido de manera ovárica a los descendientes.

Desde los inicios de esta industria, las bacterias han sido implicadas en enfermedades y mortalidades de peneidos cultivados, especialmente en los estadios de larva, postlarva y juvenil (Lightner, 1983). Las especies Gram negativas que causan septicemias o enfermedades del sistema digestivo en crustáceos marinos, son predominantemente miembros de la familia Vibrionaceae y principalmente del género *Vibrio* (Krantz *et al.*, 1969). En el Ecuador se ha reportado a los vibrios como agentes causales del

síndrome de las Bolitas y del síndrome de las Gaviotas.

En 1987, se presentó en los laboratorios de larvas, una enfermedad denominada "Síndrome de Bolitas" (Morales I., 1992) que se caracterizó por la descamación de las células del epitelio intestinal y que fue atribuida a las cepa S2 de *Vibrio harveyi* (Morales I., 1992., Zherdmant M., 1996). Esta bacteria fue posteriormente identificada como *Vibrio vulnificus* (Solís, 1996).

El síndrome de las Gaviotas apareció a finales de 1989 en camaroneras aledañas al estero salado, la población de las piscinas colapsaba en su totalidad en el transcurso de unos pocos días o una semana. Estudios en los camarones moribundos demostraron que estaban afectados por una septicemia extendida, relacionada probablemente con *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Monhey, L.L., *et al.*, 1994).

En 1995, los laboratorios de larvas comenzaron a reportar problemas de mortalidades en las larvas que se hallaban en el estadio de Zoea II. Las larvas presentaban anorexia, letargia, rápida evacuación de heces fecales, reabsorción, atrofia del hepatopáncreas y muerte por inanición. Intriago (1998) reportó que esta enfermedad estaría asociada a bacterias con dificultades de crecimiento en medios de cultivo comerciales.

En las piscinas camaroneras ha sido reportada otra enfermedad de etiología bacteriana, como causante de grandes mortalidades en las piscinas de

cultivo, se trata de la hepatopancreatitis necrotizante (NHP). Bacterias Gram negativas intracelulares han sido asociadas con esta afección (Krol *et al.*, 1991., Frelie *et al.*, 1992).

PRÁCTICAS DE MANEJO EMPLEADAS POR EL SECTOR CAMARONERO ANTE PROCESOS INFECCIOSOS.

A pesar de los importantes avances zootécnicos que ha implicado el desarrollo de la industria camaronera, este sector cuenta con pocas armas para identificar y enfrentar los problemas epidemiológicos que lo afectan, recurriendo por lo general a intentar soluciones de emergencia cuando los problemas ya están presentes o a prácticas de manejo preventivas, las mismas que, en su mayoría, no están sustentadas por bases científicas que garanticen su eficacia.

Se podría asegurar que los problemas de enfermedades que afectan al camarón de cultivo, están estrechamente relacionados a las prácticas de manejo de esta industria y al mismo tiempo que el ciclo de producción. Los progenitores capturados del medio o criados en piscinas camaroneras pasan muy raras veces por controles microbiológicos. La mayoría de productores de larvas no cuentan con departamentos de maduración y compran los nauplios en naupliaras, sin controles de la calidad de huevos y nauplios, incluso algunos son traídos del exterior, con el consiguiente riesgo de introducción de enfermedades. Los nauplios son desinfectados con diferentes sustancias que van desde el Argentine® hasta el



Artículos

cloranfenicol a 1ppm, sin embargo por lo general, no se realizan controles microbiológicos para verificar la eficacia de tales procedimientos.

En los laboratorios de producción de larvas, los problemas infecciosos requieren decisiones rápidas debido a la velocidad con la que se desarrollan las patologías. Los resultados de los análisis toman de 24 a 36 horas, lo que se considera un tiempo de espera excesivo para tomar decisiones. Ante esta situación, los laboratorios de cría larvaria no realizan controles microbiológicos y utilizan rutinariamente antibióticos como preventivos, en especial la oxitetraciclina en dosis que se sitúan alrededor de 1ppm.

Si se detecta luminiscencia o los animales dejan de alimentarse y/o las observaciones microscópicas revelan síntomas de Bolitas o Zoea II, las dosis aplicadas de oxitetraciclina son de hasta 5 ppm por varios días. Otros antibióticos alternativos muy utilizados son, cloranfenicol a 3-5 ppm, eritromicina y furazolidone, y con menor frecuencia sulfonamides, además de los antifúngicos Treflan y verde malaquita. La utilización de probióticos ha ido cayendo en desuso, debido fundamentalmente a los riesgos de utilizar como único criterio de identificación y control de las bacterias probióticas, el color amarillo de las colonias sobre agar TCBS. Esta última práctica está asociada con la variabilidad observada en los resultados.

Es necesario destacar los esfuerzos realizados por los larvicultores para tratar de controlar las patologías empleando otro tipo de estrategia. Esta consiste en modificar las condiciones ambientales del cultivo, descendiendo la salinidad de 33 a 22 ups y bajando el pH adicionando ácido ascórbico, el cual además neutralizaría residuos de cloro.

Por otra parte, la estructura del

mercado obliga a los productores de larvas a mantener fuertemente controlados sus costos de producción. Los incrementos de los insumos no siempre guardan una relación directa con el precio de la larva. Esta situación redundante con frecuencia en la calidad de la dieta suministrada, lo que a su vez tendría repercusiones en el comportamiento de los animales en las piscinas de las camaroneras.

La situación de los grupos verticalmente integrados, es un tanto diferente. En efecto, los mayores recursos económicos de estas empresas, así como la necesidad de asegurar una buena calidad de la larva que será sembrada en sus propias piscinas, los ha llevado a implementar otras estrategias. Por una parte ellos cuentan, por lo general con departamentos de maduración, lo que permite un mejor control de la calidad de huevos y nauplios y por otra parte se realizan controles microbiológicos rutinariamente, además de la exploración y aplicación de métodos alternativos de prevención y control de enfermedades tales como desinfecciones rigurosas de nauplios, el uso de probióticos y un buen régimen de alimentación.

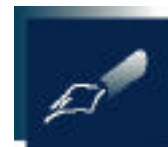
Los controles microbiológicos que realizan las camaroneras, consisten en conteos de bacterias totales en Agar Marino (unidades formadoras de colonias) y para la detección de vibrios, cultivos en agar TCBS, tomando como criterio de identificación de vibrios patógenos, el color verde de las colonias, no se emplea como un procedimiento de rutina la histopatología. El NHP, muy reportado en las camaroneras ecuatorianas, es comúnmente diagnosticado por observaciones de muestras frescas al microscopio óptico.

Ante la detección de problemas se recurre a los alimentos medicados, siendo la oxitetraciclina, en concentraciones que varían entre 1.000 y 5.000 ppm, el antibiótico más

empleado, especialmente ante la sospecha de NHP. Este antibiótico es por lo general utilizado en su forma Hcl, muy soluble en el agua, en alimento no recubierto y sin utilizar comederos. Otros antibióticos en uso son cloranfenicol y furazolidone, empleados en sus formas genéricas, en tanto que quinolonas, sulfonamides y algunas tetraciclinas son comercializados bajo diferentes marcas. Considerando que en el país no existen regulaciones para el uso de antibióticos en acuicultura, la medicación se realiza, con algunas excepciones, sin tener la certeza de la naturaleza del problema y sin realizar estudios microbiológicos y antibiogramas. Debemos anotar que existe una tendencia a utilizar antibióticos como preventivos.

En parte la sostenibilidad de la industria, depende a mediano y largo plazo del manejo que se le dé a los problemas epidemiológicos. Existen problemas de diagnóstico y manejo de la salud del camarón a todos los niveles de producción. En primer lugar es necesario determinar la naturaleza y causa de las patologías, considerando que éstas pueden ser, al origen, de naturaleza no infecciosa, tratándose de la manifestación de desajustes ambientales (calidad del agua, suelos), nutricionales o inclusive calidad de progenitores, nauplios y larvas. Este tipo de desarreglos se traducirán más temprano que tarde, en problemas de naturaleza infecciosa. Por otra parte, es necesario considerar que las infecciones no son forzosamente de etiología bacteriana, pudiendo tratarse de otro tipo de patologías, especialmente virales o provocadas por hongos y parásitos.

En general la industria camaronera ecuatoriana, no ha incorporado en sus estrategias de manejo rutinario de laboratorios y camaroneras, el control de virus, a pesar de que comercialmente están disponibles kits para su detección. En lo que concierne a bacterias, la cuantificación del



número de UFC no proporciona suficiente información. La práctica de identificar vibrios patógenos, utilizando como criterio la luminiscencia o el color de las colonias sobre agar TCBS, no es exacta. En primer lugar el agar TCBS es un medio demasiado selectivo, existiendo vibrios de camarón incapaces de crecer en él (Calero G. 1998, Griffith D. com.personal), por otra parte la asimilación de la glucosa o la luminiscencia no son caracteres que deban ir forzosamente ligados a la toxicidad de las bacterias, si bien la luminiscencia puede ser un mecanismo de transmisión (larvas moribundas luminiscentes serían una presa muy atractiva para animales sanos).

Sin embargo, es necesario resaltar que grupos de empresas, pequeñas y grandes, no utilizan antibióticos, prefiriendo el uso rutinario de inmunoestimulantes, tales como β -glucanos, o compuestos de ajo, limón y ácido láctico, productos de eficacia a ser probada, pero en todo caso más amigables para los animales y el ambiente. Existen por otra parte, un grupo de empresas que combinan prevención, diagnóstico y tratamiento, controlando la calidad del medio, suministrando dietas adecuadas e inmunomoduladores, aplicando, técnicas de diagnóstico acompañadas de histopatología y antibiogramas, antes de proceder a medicar con antibióticos.

MANIFESTACIONES DE RESISTENCIA BACTERIANA, UN PROBLEMA CAUSADO POR EL USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS

La utilización de antibióticos como estrategia de manejo rutinario, sin haber determinado el agente causal de los problemas, el tipo de antibiótico, así como la dosis y el modo de administración que brindarán resultados más eficaces, conducirá con

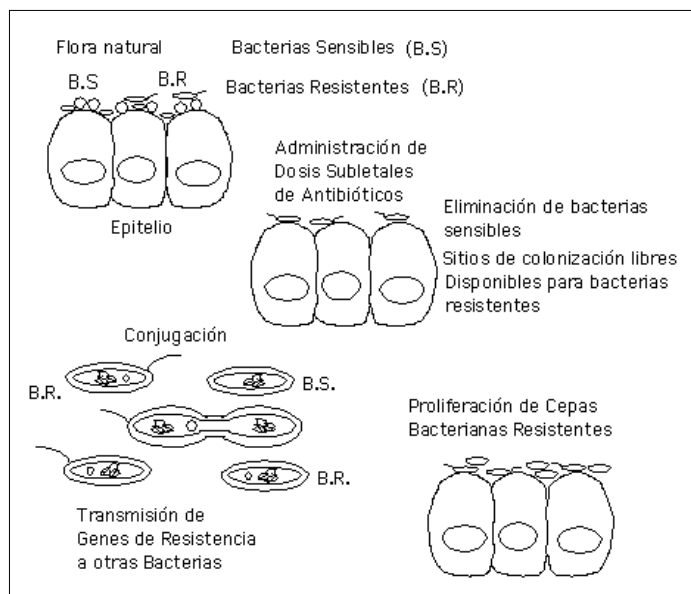


Fig. 1.- El uso de antibióticos a dosis subletales conduce a la selección de bacterias resistentes. Esta resistencia puede ser transferida a otras cepas de la misma especie o a otras especies del mismo género, conduciendo a la proliferación de cepas bacterianas resistentes.

seguridad, a la selección de bacterias resistentes a estos fármacos.

El uso excesivo de un solo tipo de antibiótico en dosis subletales provoca por una parte la destrucción de la flora natural de los camarones. Esta situación estaría a la base de desórdenes fisiológicos y además, brindaría ventajas de crecimiento a bacterias resistentes, al eliminar bacterias sensibles competidoras (Figura 1). Esto conlleva al riesgo latente de que algunas cepas resistentes sean patógenos oportunistas (Figura 2) o que esta resistencia sea transmitida a bacterias patógenas, por medio de la transferencia de genes de resistencia a través de mecanismos tales como la conjugación (Figura 1). Como consecuencia, esta situación conducirá a la selección y proliferación de cepas bacterianas resistentes. La proliferación de cepas

resistentes, es favorecida por la ventaja selectiva que tienen éstas, sobre las sensibles, en sitios de producción con alto uso de antibióticos y alta concentración de residuos de los mismos.

En varios análisis realizados en CENAIM, se han observado ya, indicios del surgimiento y proliferación de bacterias resistentes a antibióticos: así, Intriago (1998),

debió incrementar la concentración de oxitetraciclina a 40 ppm, para lograr una desinfección del 100 % de los nauplios, por él utilizados.

Muñoz (com. pers.), observó en el mismo año, niveles de resistencia de hasta 60ppm a la oxitetraciclina, en vibrios asociados a camarones juveniles, muestreados en el golfo de Guayaquil.

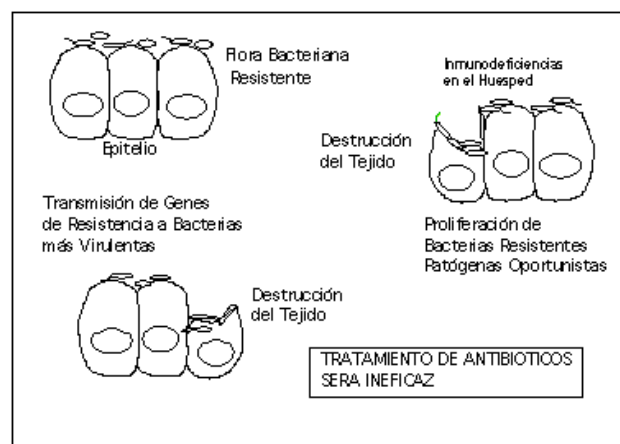


Fig. 2.- Una flora bacteriana compuesta de cepas resistentes acarrea dos tipos riesgos. En primer lugar, alguna de estas cepas resistentes, podría tratarse de un microorganismo oportunista que aprovechará alguna deficiencia inmunitaria del huésped, para provocar un estado patológico. En segundo lugar, esta resistencia puede ser transferida a bacterias patógenas. En ambos casos el tratamiento antibiótico resultará ineficaz para controlar el problema.



Artículos

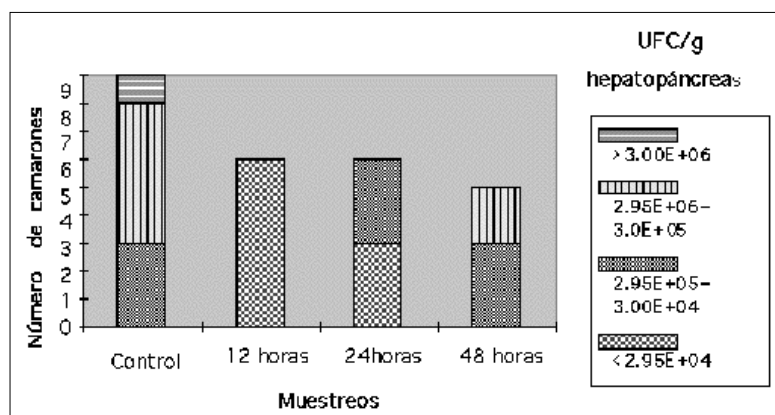


Fig. 3.- Crecimiento bacteriano (expresado en UFC /g de hepatopáncreas), en hepatopáncreas de camarones de 6 g, después 12, 24 y 48 horas de una desinfección con dos antibióticos, oxitetraciclina a 40 ppm y cloranfenicol a 40 ppm. Una segunda inoculación de los antibióticos, se realizó inmediatamente después de realizar el muestreo de hepatopáncreas correspondiente a las 24 horas. El control corresponde a la población bacteriana de animales no desinfectados. (Autorizado por Sotomayor).

El número de cepas resistentes al antibiótico llegó a representar el 70% de los aislados analizados, estas cepas fueron identificadas en su mayoría como *Vibrio fluvialis*.

Por otra parte Mendoza y Sotomayor (com. pers.), necesitaron utilizar hasta 40 ppm de oxitetraciclina y 40 ppm de cloranfenicol, para disminuir la flora bacteriana de una población de camarones juveniles de 6 g, recuperados de una piscina camaronera, hasta obtener niveles menores de 30.000 UFC por gramo de hepatopáncreas (UFC/g) (Figura.3). Sin embargo, una segunda inoculación del antibiótico a las 24 horas, provocó un incremento del número de UFC/g a las 48 horas, como se puede observar en la Figura 3, demostrando en la práctica, que el uso de dosis subletales en administraciones repetidas, provoca en primer lugar la eliminación de las bacterias sensibles, una vez eliminada esta comunidad bacteriana, las bacterias resistentes crecen con mayor eficacia en un medio que se ha tornado altamente selectivo a su favor, a causa de la presencia constante del antibiótico, que elimina la competencia de bacterias más sensibles.

Estas observaciones confirman el aumento de los niveles de resistencia,

con los riesgos a corto y mediano plazo de la aparición y propagación de patologías bacterianas incontrolables, debido a que los antibióticos se están volviendo ineficaces para combatir bacterias resistentes

Por otra parte, no se debe olvidar los efectos secundarios y tóxicos de este tipo de medicamentos. Cedeño observó en 1997 efectos inmunodepresivos de la oxitetraciclina y el cloranfenicol en *L. vannamei*. Estos antibióticos inhibieron *in vitro* el choque respiratorio, importante mecanismo microbicida de las células inmunitarias, a partir de concentraciones de 1 ppm, para ambos antibióticos (Cedeño, com. pers.)

ALTERNATIVAS DE CONTROL DE ENFERMEDADES

Algunos autores opinan que el control de las enfermedades depende de tres factores: medidas preventivas, un diagnóstico correcto, y un tratamiento adecuado, siendo quizás la prevención el aspecto más importante de este enunciado.

Prevención

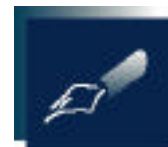
Una estrategia de control de

enfermedades basada solamente en el diagnóstico y el tratamiento, es análoga a una estrategia militar basada en la repulsión de los atacantes, sólo cuando ellos ya están en una ciudad y han tomado parte de ella. Cuando una enfermedad bacteriana ha progresado al punto en que los síntomas son evidentes, el microorganismo ya se ha establecido, y ha causado daños. En este punto los antibióticos pueden eliminarlos del área afectada, pero no restablecerán plenamente la salud del individuo si se han producido daños irreversibles en el tejido (Salysers A. A. y D. Whitt D., 1994).

Un aspecto importante en lo que a medidas preventivas se refiere, está relacionado en primer lugar con el manejo. Un manejo adecuado, controlando las condiciones ambientales, la calidad de agua y suelos, así como una nutrición adecuada, evitarán situaciones de estrés en los animales, disminuyendo así, la aparición, propagación y acción de patógenos oportunistas.

Una alternativa de control biológico muy interesante y que ha brindado resultados prometedores tiene que ver con la utilización de probióticos. El sector productor de larvas de camarón, viene utilizando estos conceptos desde fines de la década pasada, sin embargo su adopción ha sido limitada, debido a la carencia de un protocolo que disminuya la variabilidad de los resultados.

En el CENAIM se desarrolló un modelo de control de colonización de la bacteria patógena *Vibrio vulnificus* S2, (San Miguel, L. 1996., Serrano J. 1996), utilizando la bacteria probiótica *Vibrio alginolyticus* cepa Ili, aislada por Ileana Morales (1994) y caracterizada por San Miguel (1996). Este modelo fue aplicado exitosamente en cultivos comerciales (Donoso E. com. pers), inoculando el probiótico en los tanques a una concentración de 10^5 bact/ml desde nauplio 5 hasta mysis 3, y controlando regularmente la presencia



del probiótico. Se encontró una buena correlación entre la ausencia de síntomas en las larvas y la colonización con *Ili*. Las características innovadoras de este modelo se basaron, primero en una rigurosa desinfección de los nauplios, segundo, en la inoculación del probiótico en el estadio de nauplio 5, antes de la apertura de la boca y tercero, en la aplicación del Colony Blot y la AP-PCR para la detección e identificación del probiótico. El tema probióticos amerita mayores estudios, es necesario identificar nuevas cepas, estudiar sus interacciones con las bacterias consideradas patógenas y realizar estudios clínicos sobre su calidad preventiva en tanques y piscinas de producción.

Un hecho que ayudará sin duda en la prevención de patologías de toda índole, es la domesticación de la especie. En efecto, la utilización del ciclo cerrado para la producción de progenitores, no está generalizada y aún dependemos en gran medida, de reproductores y nauplios silvestres. El empleo de animales seleccionados genéticamente permitirá contar con cepas que entre otras características, presenten una mayor resistencia a las enfermedades.

Por otra parte, son interesantes y ameritan mayores estudios, las iniciativas que el sector camaronero ha tomado para modificar parámetros ambientales en los tanques de cría larvaria, con la finalidad de transformarlos en ambientes poco propicios, para la proliferación de microorganismos considerados patógenos o suministrando aditivos nutricionales de pH ácido a las dietas de los juveniles en las piscinas. Un aspecto que puede ser explorado para el control de patologías es la inmunomodulación, es decir la aplicación de prácticas de manejo o de sustancias, sean estas aditivos nutricionales o los llamados inmunoestimulantes, capaces de estimular a animales

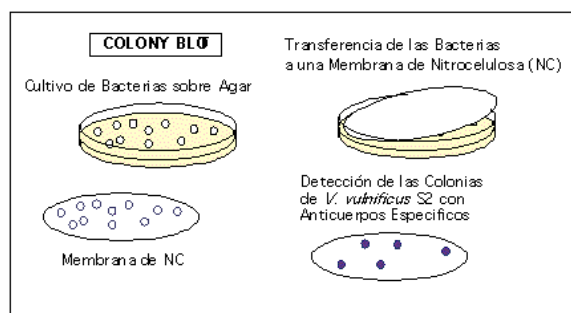


Fig. 4.- La técnica Colony blot se basa en el reconocimiento específico de cepas bacterianas utilizando anticuerpos como sondas. Por simple contacto, se transfiere las colonias de bacterias que crecen sobre agar a una membrana de nitrocelulosa, en la nitrocelulosa las improntas de estas colonias serán sometidas a anticuerpos específicos para la bacteria *V. vulnificus* S2, al final de la reacción, las improntas positivas para *V. vulnificus* S2 se tornarán azules.

inmunoderprimidos o de provocar un estado de excitación inmunitaria durante brotes epidémicos.

Diagnóstico

Si bien actualmente se dispone de métodos mejorados de identificación bioquímica para vibrios (Solís, 1997), los cuales han constituido una alternativa a la galería API y Biolog, existen otras técnicas más específicas y sobre todo sensibles y rápidas para detectar bacterias patógenas. La técnica Colony Blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Mendoza com. Pers.) permite identificar en 12 horas, tanto la presencia como el porcentaje de la bacteria *V. Vulnificus* S2 causante del síndrome de Bolitas (Fig. 4). Por otra parte la biología molecular ha puesto al servicio del diagnóstico de patologías de camarón una serie de herramientas, marcadores moleculares y sondas ADN, para la detección específica, sensible y rápida de una serie de patógenos (Ver Conceptos básicos sobre el diagnóstico de enfermedades de camarón, Mundo Acuícola, Vol 4, N° 2). Por ejemplo la AP-PCR, una técnica basada en la amplificación de secuencias de ADN, permite obtener marcadores moleculares para cualquier tipo de organismos que se quiera identificar. La AP-PCR se ha

empleado para la identificación de *V. vulnificus* S2 (Motte E., 1996) y ha sido utilizada para realizar estudios epidemiológicos, sobre la implicación de esta bacteria en el síndrome de las Bolitas y el síndrome de la Zoea. (Siavichay K., 1996., Intriago W., 1998).

Existen muchas patologías durante la cría del camarón, para las cuales no existe diagnóstico del agente etiológico o de la causa que origina el

problema. La tecnología para avanzar en el diagnóstico y la comprensión de los procesos infecciosos está disponible. Esta debe combinarse con estudios epidemiológicos que permitan identificar a los agente etiológicos de las principales enfermedades bacterianas o virales del camarón, su modo de transmisión y sobre todo cómo prevenir y controlar los brotes epidémicos y qué tratamientos emplear ante los problema ya presentes.

Tratamiento

El descubrimiento y utilización de los antibióticos, ha sido uno de los hechos más importantes para el tratamiento de infecciones bacterianas tanto en salud humana como en veterinaria. El buen manejo de los antibióticos es vital para el mantenimiento de una industria camaronera sostenible. Por lo tanto, la administración de estos fármacos debe ser cuidadosamente estudiada, a fin de evitar resistencias indeseadas que compliquen el tratamiento de enfermedades de etiología bacteriana.

En primer lugar, es necesario determinar si el problema es realmente bacteriano. En segundo lugar es necesario determinar si se utilizará un producto bactericida o bacteriostático. Estos últimos (tetraciclinas, cloranfenicol) son ineficaces en animales inmunodeprimidos, de tal



Artículos

manera que no funcionarán correctamente cuando la infección sea producida por bacterias oportunistas que han ganado terreno a causa de estrés fisiológico en los animales. La sensibilidad de las bacterias y la dosis de antibiótico a aplicar son fundamentales a fin de prevenir resistencias. En este sentido es necesario realizar antibiogramas y determinar el MIC (Concentración Mínima Inhibitoria). Conociendo los resultados de estas pruebas, estos fármacos deberán ser administrados a dosis letales, no está demás insistir que los llamados tratamientos preventivos, sólo contribuyen a la selección y proliferación de cepas resistentes. Además, es preferible utilizar más de un antibiótico a la vez, las bacterias difícilmente adquieren resistencia contra dos antibióticos utilizados simultáneamente.

Por otra parte, es necesario optimizar el modo de aplicación, si se administra con el alimento, es preferible utilizar formas insolubles con la finalidad de minimizar las pérdidas en el agua, por lixiviación. Además, es recomendable el uso de comederos a fin de controlar el consumo del alimento medicado (Griffith D. com. pers), esto es de vital importancia ya que por regla general los organismos enfermos dejan de alimentarse. En los laboratorios donde el factor limitante es la rapidez con la que se presentan los problemas, se hacen imprescindibles estudios epidemiológicos más profundos a fin de identificar sin error los agentes causantes, si éstos son bacterianos, antibiogramas realizados en rutina, ofrecerán una base de datos que ayudarán a seleccionar y dosificar la administración de estos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

Calero G., 1998. Enriquecimiento de agar marino y TCBS con caldos de músculo y hepatopáncreas de camarón *Pennaeus vannamei*. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Frelier P. F., Sis R. F., Bell T. A., Lewis D. H., 1992. Microscopic and ultrastructural features of necrotizing hepatopancreatitis in Texas cultured shrimp (*Pennaeus vannamei*). Vet. Pathol 29: 269-277.

Intriago W., 1998. Problemas de aislamiento y caracterización de bacterias asociadas al síndrome de Zoea II y demostración experimental de su patogenicidad. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Krantz G. E., Colwell R.R., Lovelace E., 1969. *Vibrio parahaemolyticus* from blue crab, *Callinectes sapidus* in Chesapeake Bay. Science, N.Y. 164: 1286-1287.

Krol R. M., Hawkins W. E., Overstreet R. M., 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Pennaeus vannamei*). Journal of invertebrate pathology 57: 3622-360.

Lightner D. V., 1983. Diseases of cultured shrimp. In J.R. Moore (Ed.-in-chief), CRC Handbook of Mariculture. J. P. Mc. Vey (Ed). Crustacean Aquaculture. CRC Press, Boca Ratón, Florida. I: 289-320

Mohney L. L., Lightner D. V., Bell T.A., 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Pennaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). J. World Aquaculture Soc. 25: 116-125.

Morales I., 1992. Observaciones sobre el síndrome de descamación del epitelio digestivo "Bolitas" en larvas de *Pennaeus vannamei* en Ecuador. Memorias del Primer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. pp 203-207.

Motte E., 1997. Apports des techniques de biologie moleculaire pour le controle des

maladies en *Pennaeus vannamei*. Diplome de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Paris, pp1-1104.

Salzer A., D. Whitt D., 1994. Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach. ASM Press, Washington, D.C..418pp.

San Miguel L., 1996. Caracterización de una bacteria probiótica en larvas de *Pennaeus vannamei* y estudio *in vitro* de la interacción con una bacteria patógena. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Serrano J., 1996. Optimización de un modelo experimental en larvas de camarón *Pennaeus vannamei* para el control de infecciones por *Vibrio harveyi* (cepa E22) mediante la utilización de *Vibrio alginolyticus* (Cepa Ili). Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Siavichay K., 1997. Aplicación de nuevas técnicas para el seguimiento bacteriológico en un laboratorio de larvas de camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Solis A., 1996. Miniaturización y simplificación de pruebas bioquímicas de bacterias marinas asociadas al camarón. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador.

Zherdmant M. T., 1996. Caracterización de una cepa de *Vibrio harveyi* considerada agente causal del "Síndrome de bolitas" en larvas de *Pennaeus vannamei* y estudio de su interacción con una cepa de *Vibrio alginolyticus* utilizada como probiótico. Tesis de Acuicultor, ESPOL, Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil-Ecuador. 

PROTOCOLOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA CEPAS AISLADAS DE CULTIVOS ACUÍCOLAS: ESFUERZOS EN ESTANDARIZACIÓN INTERNACIONAL

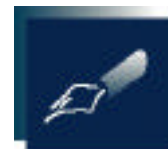
Thomas A. Bell, Ph.D.

Tomado de American Fisheries Society, Fish Health Newsletter 27 (2):6

Las bacterias son, económicamente hablando, patógenos importantes de las especies acuáticas. Por esta razón, los profesionales de la salud de animales acuáticos han desarrollado procedimientos clínicos y de laboratorio para mitigar los efectos de

las infecciones o para eliminar el (los) patógeno(s) del sistema de cultivo.

Los agentes antimicrobianos son herramientas importantes utilizadas para controlar las enfermedades mencionadas. Un paso esencial en la administración de una terapia



antimicrobiana exitosa y prudente es la selección de la droga apropiada, que sea efectiva contra el patógeno aislado asociado a la enfermedad. A pesar de que los procedimientos de laboratorio utilizados para determinar la sensibilidad de bacterias aisladas y asociadas a enfermedades de especies acuáticas están bien entendidos, no están internacionalmente estandarizados. Consecuentemente, no existe una completa comprensión de las enfermedades bacterianas de los peces de importancia a nivel mundial ya que el conocimiento existente se basa en datos obtenidos por medio de procedimientos de laboratorio que pueden ser excelentes para la aplicación local, pero no necesariamente a nivel global. Actualmente, se están realizando esfuerzos internacionales para estandarizar los procedimientos de laboratorio para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana.

Un grupo internacional, compuesto principalmente por miembros de la Asociación Europea de Patólogos de Peces (EAFP), se reunieron en Weymouth, Inglaterra en noviembre de 1998 en el Centro de Pesca y Alimentación para la Ciencia Ambiental, Pesquera y Acuicola (CEFAS). El taller fue llamado "MIC Metodologías en Acuicultura" y fue auspiciado por la Comisión Europea, Directorio General XIV. Hubo aproximadamente 25 participantes (del grupo de trabajo de la Unión Europea), representando a Francia, Irlanda, Inglaterra, España, Grecia, Dinamarca, Escocia, Alemania, Noruega, Italia, Bélgica, Canadá y los EEUU, involucrados en la sesión de cuatro días.

Los participantes del taller convinieron en unir cuatro series de protocolos provisionales, una para cada procedimiento: disco de difusión, dilución en agar, dilución en caldo (micro y macrodilución), junto a seis anexos para dirigir desviaciones

potenciales. Cada protocolo provisional incluye procedimientos estandarizados para los siguientes componentes (según su aplicación): preparación media, inóculo, discos de difusión, incubación, lectura de placas, control de calidad, criterios de rechazo, stock de soluciones antimicrobianas y réplicas de procedimientos. Los anexos incluyeron: cepas de control, modificaciones del medio de cultivo para organismos exigentes, zonas borrosas, contenidos de discos, ajustes de caldo Mueller-Hinton y suspensiones iniciales. Los participantes se basaron (en la medida de lo posible) en los documentos del Comité Nacional para los Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS), desarrollados para cepas veterinarias aisladas (de otras especies que no son acuáticas), así como estándares relacionados de Francia, Inglaterra, Alemania y Escandinavia para reunir los protocolos acuícolas estandarizados.

El objetivo del grupo de trabajo de la Unión Europea (UE) es examinar extensivamente los protocolos provisionales en los laboratorios participantes (y cualquier otro laboratorio que esté de acuerdo en usar los protocolos) y volverse a reunir en 10 meses en la reunión de la EAFP de 1999 en Rhodes, Grecia para evaluar protocolos y estándares microbianos.

En Norte América el Subcomité de NCCLS para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobianas Veterinarias (Subcom Vet) ha realizado esfuerzos para estandarizar internacionalmente los protocolos de cepas aisladas acuáticas desarrolladas en el taller de Weymouth. El Subcom Vet estuvo excepcionalmente impresionado con el progreso y el compromiso del grupo de trabajo de la UE y demostró gran interés en interactuar con él. Al final, el Subcom Vet ha recomendado la formación (con la asistencia del grupo de trabajo de la UE) de un Grupo Acuicultor de Trabajo (AqWG), que funcione bajo los

auspicios del Subcom Vet, para facilitar el proceso de desarrollo de protocolos NCCLS oficiales basados en los protocolos provisionales del grupo de trabajo de la UE. Como miembro de este grupo, he sido invitado por el Subcom Vet y he aceptado, para actuar como presidente interino del AqWG. El AqWG está en proceso de formación y se anticipa que será constituido por: 3 miembros del Subcom Vet de NCCLS, 3 miembros del grupo de trabajo de la UE y 8 miembros de Norte América (incluyendo expertos veterinarios y no veterinarios representantes de la salud de animales acuáticos, expertos de la costa oriental y occidental, expertos de laboratorio y de campo, expertos de especies marinas y de agua dulce, expertos de especies de agua caliente, templada y fría) y posiblemente un experto de Asia y un experto de otra región importante (i.e., Sudamérica, Australia, Africa).

El grupo de trabajo de la UE los urge para que prueben rigurosamente estos protocolos contra sus procedimientos "en casa", y para proveer críticas constructivas (comentarios de elogio también son bienvenidos) a los miembros del grupo de la UE.

Los protocolos provisionales, así como las instrucciones sobre los mecanismos de retroalimentación, están disponibles en la siguiente dirección de Internet:

<http://www.nuigalway.ie/mic/eusus>

El objetivo final de estas actividades es la publicación final de protocolos rigurosamente probados y validados para establecer la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de bacterias de especies acuáticas. Sin embargo, no es del todo final, el verdadero valor de estos protocolos será cuando se dé el último paso, i.e., el establecimiento de puntos claves internacionalmente aceptables y clínicamente relevantes para la administración de terapias antimicrobianas exitosas y prudentes.



RESPIRACION EN SUELOS DE PISCINAS CAMARONERAS: EVALUACION DE PRODUCTOS COMERCIALES PROMOCIONADOS PARA MEJORAR LA CONDICION DEL SUELO Y PRODUCCION

Stanislaus Sonnenholzner

CENAIM / Análisis Ambiental / San Pedro de Manglaralto, Ecuador

INTRODUCCIÓN

La condición química del suelo que probablemente más concierne a los productores de camarón es la acumulación de materia orgánica durante los ciclos de producción. Este aumento de materia orgánica genera una demanda de oxígeno en el fondo de las piscinas, el cual es ocasionado por la respiración aeróbica de las bacterias y otros micro-organismos. Como resultado de este proceso biológico, se generan condiciones anóxicas y ácidas. Además, en ausencia de oxígeno disuelto, las bacterias utilizan otros compuestos oxidados como agentes receptores de electrones (agentes oxidantes) tales como nitratos y sulfatos durante el proceso de respiración, creando condiciones de reducción y formación de compuestos químicos que pueden llegar a ser tóxicos para los camarones (p.ej. nitrito, amonio, gas sulfídrico, metano entre otros).

Las estrategias de manejo del suelo se han concentrado por lo tanto en mejorar algunos de los factores que afectan la actividad bacteriana, específicamente disponibilidad de oxígeno y pH. Estas condiciones han sido manejadas mediante las tradicionales prácticas de secado y encalado de las piscinas. Existen además otros factores que afectan la actividad bacteriana, de igual importancia, tales como la disponibilidad de nitrógeno para la síntesis de biomasa bacteriana, requerimiento que está siendo manejado mediante la aplicación de nitrógeno durante el secado. Los

métodos de manejo incluyen actualmente la aplicación de aditivos biológicos (suspensiones bacterianas y enzimas) y químicos que claman acelerar la descomposición bacteriana. Las suspensiones bacterianas son utilizadas bajo la hipótesis de que son más eficientes que las poblaciones bacterianas nativas presentes en el ecosistema de la cada piscina. A pesar de que la efectividad de estos últimos productos no ha sido evaluada en amplitud experimentalmente, existe una percepción positiva por parte de los camaroneros de su funcionamiento y mejoramiento en las producciones, lo cual también queda evidenciado por la proliferación de estos productos en el mercado.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la efectividad de varios productos (químicos y biológicos) en la descomposición de la materia orgánica durante el período de secado, utilizando como indicador el dióxido de carbono generado durante el proceso de descomposición. A mayor descomposición, mayor producción de dióxido de carbono.

METODOLOGÍA

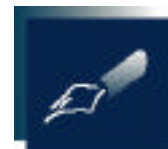
El presente estudio fue realizado entre junio y agosto de 1998 en dos camaroneras de la Provincia del Guayas con diferente textura de suelo. La primera camaronera (Experimento I)

estuvo localizada cerca de la población de Chongón (suelo limo arcilloso), y la segunda camaronera (Experimento II) estuvo localizada cerca de la población de Chanduy (suelo arenoso). Un tercer experimento (Experimento III) fue realizado en el laboratorio, con suelo proveniente de la camaronera de Chongón.



Figura 1. Sistema experimental dentro de una piscina camaronera

Los experimentos consistieron en medir el dióxido de carbono generado dentro de una cámara cerrada al ambiente, colocada sobre una parcela de sedimento de la piscina a la cual se aplicó un tratamiento predeterminado (Figura 1). Los tratamientos consistieron en: 1) control (testigo), 2) carbonato de calcio (500 kg ha^{-1}), 3) nitrógeno como nitrato de sodio y amonio (100 kg ha^{-1} , Nutrilake 20 - SQM del Ecuador), 4) Kilol (Experimento II - 10 kg ha^{-1} , Experimento III 0.8 kg ha^{-1} , Chemie Ecuador), 5) Kilomar DF-100 (Experimento I y III - 200 Kg^{-1} , Experimento II- 500 Kg ha^{-1} , Chemie Ecuador) 6) Biobac M (1 L ha^{-1} , Biobac S. A.), 7) Digest-54 (1 L ha^{-1} , Alltech, Inc.). Los tratamientos fueron asignados aleatoriamente a cada parcela bajo un diseño experimental completamente randomizado. Cada tratamiento fue replicado 4 veces. La



duración de los experimentos varió entre 7 a 9 días. Experimentos I y II iniciaron un día posterior a la cosecha. Las suspensiones bacterianas y enzimas fueron diluídas acorde a las recomendaciones de la casa comercial y rociadas con un atomizador sobre las parcelas experimentales. Las dosis de nitrógeno, Kilol y Kilomar fueron diluidas en agua para facilitar su aplicación sobre las parcelas. Se utilizó un rastrillo para mejorar el proceso de homogenización de los distintos productos una vez aplicados, facilitando además la incorporación y mezcla de los mismos en los primeros 2 cm de la columna de sedimento de cada parcela.

El método de medición del dióxido de carbono *in situ* y laboratorio se encuentra descrito en Boyd (1995) y consiste en fijar el dióxido de carbono en un recipiente que contiene una solución de hidróxido de sodio de normalidad y volumen conocido dentro de una cámara aislada al ambiente (Figura 2). El dióxido de carbono reacciona con el hidróxido de sodio produciendo carbonato de sodio. El carbonato de sodio formado puede ser precipitado con cloruro de bario, y el hidróxido de sodio remanente que no reaccionó puede ser determinado mediante titulación con un ácido. Por diferencia se puede determinar la cantidad de dióxido de carbono que se combinó con el hidróxido de sodio.

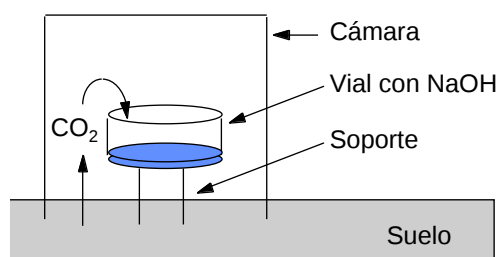


Figura 2. Medición *in situ* de dióxido de carbono.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en los 3 experimentos. Las suspensiones bacterianas y enzimáticas incrementaron ligeramente (3.5 - 5%)

Tabla 1. Respiración de suelos tratados con diferentes compuestos expresado en (g CO₂ m⁻²). Medias y desviación estándar en paréntesis.

Tratamiento	Experim. I 7 días	Experim. II 8 días	Experim. III 9 días
Control	7.7 (0.6)	11.4 (0.4)	7.1 (0.8)
CaCO ₃ (500 kg ha ⁻¹)	7.0 (0.3)	11.4 (0.4)	7.4 (0.2)
Nitrógeno (100 kg ha ⁻¹)*	7.1 (0.2)	11.4 (0.4)	7.0 (0.4)
Kilol **	-	11.6 (0.6)	6.2 (0.1)
Kilomar DF-100***	8.0 (0.8)	11.7 (0.8)	6.7 (0.8)
Biobac M (1 L ha ⁻¹)	7.7 (1.5)	12.0 (0.3)	6.4 (0.8)
Digest-54 (1L ha ⁻¹)	7.7 (0.8)	11.8 (0.4)	7.4 (0.1)

* Nitrógeno como nitrato de sodio y amonio (Nutrilake 20 - 20%N)

** Experimento II - 10 Kg ha⁻¹; Experimento III - 0.8 Kg ha⁻¹)

*** Experimento I y III - 200 kg⁻¹; Experimento II - 500 kg⁻¹

la respiración con respecto al control durante el Experimento II, sin embargo, no se observó la misma respuesta en los Experimentos I y III. En términos generales la respuesta de los distintos productos es variable bajo las diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, no se observa una contribución significativa en términos porcentuales de la respiración con respecto al control luego de una semana de medición.

Aunque las concentraciones de carbón orgánico no fueron determinadas *per se*, la metodología empleada en este estudio permite estimar en forma confiable la intensidad de la degradación de la materia orgánica, debido a que la generación de dióxido de carbono es el producto final de la actividad metabólica de respiración bacteriana, el cual es un proceso de oxidación de los compuestos orgánicos. Este método además posee la ventaja de ser de relativamente fácil determinación.

Las suspensiones bacterianas comerciales contienen por lo general bacterias comunes ya existentes en suelos de piscinas camaroneras tales como *Bacillus* spp. por lo cual su aplicación se presta a discusión. Las poblaciones bacterianas nativas existentes en las piscinas son producto de procesos de adaptación genética y fisiológica de varias generaciones en el medio sobre el cual se desarrollan.

La actividad de las bacterias en el suelo se encuentra regulada por varios factores abióticos ambientales (pH, temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno disuelto, concentraciones

de carbón:nitrógeno, entre otros). Las estrategias de manejo del suelo deberían estar enfocados por lo tanto en acondicionar los suelos a los rangos óptimos de estas variables para incrementar la actividad de las bacterias naturales.

Las enzimas se caracterizan por ser específicas y estar controladas por la ausencia o presencia de compuestos críticos, los cuales modulan la conformación tridimensional de cada enzima de tal forma que ésta pueda adherirse al sustrato. Estos compuestos pueden ser vitaminas, metales o compuestos orgánicos de distinta naturaleza. Por ejemplo, concentraciones excesivas de Na⁺ y Cl⁻ pueden destruir los enlaces iónicos que mantienen la estructura tridimensional de la enzima. Otras variables físico-químicas tales como pH y temperatura también afectan la actividad de las enzimas. Todos estos factores deben conjugarse simultáneamente para estimular la actividad de cada enzima. El simple hecho de la presencia de una enzima sobre un determinado sustrato no garantiza su funcionamiento. Las poblaciones bacterianas que se encuentran en el suelo de cada piscina, están equipadas probablemente con el set completo de enzimas para descomponer el sustrato específico del cual obtienen su energía.

El presente experimento sólo evaluó el efecto de éstos productos sobre la respiración del suelo bajo diferentes condiciones experimentales. Es necesario validar estos resultados durante ciclos de producción, para determinar el efecto de los distintos tratamientos no sólo sobre la condición del suelo, sino también correlacionarlo con la producción.

BIBLIOGRAFÍA

Boyd C. E. 1995. Bottom soils, sediment and pond aquaculture. Chapman and Hall, New York, NY 10003, USA.