



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

USO DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y ÁCIDOS BILIARES OBTENIDOS DE  
*OREOCHROMIS SP* APLICADOS EN CULTIVOS DE *PENAEUS*  
*VANNAMEI* A BAJA SALINIDAD

GRANDA CORDOVA ALEXANDER ESTUARDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

USO DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y ÁCIDOS BILIARES  
OBTENIDOS DE *Oreochromis sp* APLICADOS EN CULTIVOS DE  
*Penaeus vannamei* A BAJA SALINIDAD

GRANDA CORDOVA ALEXANDER ESTUARDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

MACHALA  
2022



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA ACUÍCOLA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

USO DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y ÁCIDOS BILIARES OBTENIDOS DE *Oreochromis*  
*sp* APLICADOS EN CULTIVOS DE *Penaus vannamei* A BAJA SALINIDAD

GRANDA CORDOVA ALEXANDER ESTUARDO  
INGENIERO ACUÍCULTOR

SORROZA OCHOA LITA SCARLETT

MACHALA, 23 DE FEBRERO DE 2022

MACHALA  
2022

# Trabajo de titulación

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

3%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

1 Submitted to Universidad Técnica de Machala <1 %  
Trabajo del estudiante

---

2 Submitted to Universidad Científica del Sur <1 %  
Trabajo del estudiante

---

3 hdl.handle.net <1 %  
Fuente de Internet

---

4 www.insulab.es <1 %  
Fuente de Internet

---

5 rraae.cedia.edu.ec <1 %  
Fuente de Internet

---

6 www.coursehero.com <1 %  
Fuente de Internet

---

7 aveporcnutri.wixsite.com <1 %  
Fuente de Internet

---

8 moam.info <1 %  
Fuente de Internet

---

9 L Díaz-Pérez, E Carpizo-Ituarte. "Effect of thermal stress on survival and delay of <1 %

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, GRANDA CORDOVA ALEXANDER ESTUARDO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado USO DE ENZIMAS DIGESTIVAS Y ÁCIDOS BILIARES OBTENIDOS DE *Oreochromis sp* APLICADOS EN CULTIVOS DE *Penaeus vannamei* A BAJA SALINIDAD, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 23 de febrero de 2022



GRANDA CORDOVA ALEXANDER ESTUARDO  
0704402908

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mis agradecimientos a todos quienes me brindaron su apoyo, principalmente dar gracias a Dios que es el pilar fundamental en mi vida al igual que el apoyo de mis padres y hermanos ya sea para el ámbito académico como para el profesional.

También agradecer a los docentes por los conocimientos impartidos dentro y fuera del aula de clase, por la vocación para enseñar e incentivar a los alumnos a realizar investigaciones que innoven el sector acuícola.

Así mismo agradecer a mi tutora Dra. Lita Sorroza y al Ing. Irán Rodríguez por su dedicación y confianza, además de las enseñanzas en el proceso de investigación para que los resultados sean claros y los más precisos posibles. De igual manera reconocer la participación del Ing. Wilmer Galarza responsable de la estación de Maricultura de la FCA, y de la camaronera “San Nicolás” quienes fueron los proveedores de los ejemplares para realizar este trabajo.

## **DEDICATORIA**

En primera instancia agradecer a Dios por darme la sabiduría y fortaleza para lograr una meta más planteada en mi vida, y superar los obstáculos que se me presenten en el proceso.

Dedicado a mis padres por el esfuerzo y los consejos brindados durante todo este tiempo, y de igual manera a mis hermanos, que en conjunto, han sido un apoyo indispensable en cada momento para cumplir este objetivo.

## RESUMEN

La acuicultura es una industria que se desarrolla a gran escala dentro el país, principalmente dedicada a los cultivos de camarón blanco *Penaeus vannamei*, debido a la demanda del mercado la producción de camarón crece de manera exponencial, con la finalidad de satisfacer dicha demanda, es necesario realizar diferentes investigaciones para encontrar procedimientos capaces de mejorar el rendimiento de las granjas acuícolas, al igual que innovaciones o estrategias para lograr estimular el crecimiento del camarón y la resistencia a enfermedades que pueden provocar altas tasas de mortalidad, obteniendo pérdidas significativas para el productor.

En los últimos años se han comenzado a desarrollar cultivos de camarón en bajas salinidades, debido a la economía de los terrenos, y a su accesibilidad, además que en aguas con salinidades baja el desarrollo de patógenos es menor a comparación de aguas con salinidades por encima de 25 ppt, evitando así pérdidas en la producción. Por otro lado este tipo de cultivos tienen un desfase iónico, que si no es controlado puede perjudicar el desarrollo de los animales, pero es algo que se puede corregir mediante la aplicación de iones Ca, K y Mg, que son los más importantes para los procesos fisiológicos de los organismos. Cabe destacar que estos sistemas permiten mantener una densidad mayor de camarones por m<sup>2</sup>, siempre que los parámetros fisicoquímicos del agua sean estables; se puede decir que en la mayoría de camaroneras con aguas menos salinas, practican un sistema semi-intensivo o intensivo de cultivo, que les permite obtener una producción mayor en un espacio reducido.

El uso de diferentes sustancias naturales o químicas con la finalidad de promover el crecimiento y a su vez reducir la carga bacteriana dentro de camarones en periodos de tiempo más cortos, es el objetivo de muchas investigaciones realizadas por empresas dedicadas a la producción y venta de insumos acuícolas. Entre algunas de ellas, están los ácidos biliares y las enzimas digestivas que intervienen en la digestibilidad del camarón y se cree que mejoran la asimilación de nutrientes dentro del organismo, estimulando el proceso de crecimiento.

Debido a estos argumentos el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de enzimas digestivas naturales y ácidos biliares extraídos de tilapia *Oreochromis ssp*, sobre el crecimiento y la cantidad de bacterias totales de camarón blanco.

Para la experimentación se puso a prueba 3 tratamientos en la alimentación de camarones: T1 (ácidos biliares), T2 (enzimas digestivas) y un tratamiento control sin aditivos, con una dosificación de 1g/Kg de alimento, cada una con tres repeticiones durante un periodo de 28 días con dos aplicaciones diarias, para ello se utilizó 135 ejemplares de *P. vannamei* con un peso



promedio de 3 g, distribuidos homogéneamente en 9 gavetas con un volumen de 30 L cada una con aireación constante y manteniendo los parámetros del agua iguales en todos los tratamientos, haciendo recambios de agua periódicamente cada 48 horas y aplicando bacterias y sales minerales diariamente. Finalizado este periodo se realizaron los análisis microbiológicos en Agar Nutritivo, para determinar la cantidad de bacterias totales (UFC/ml) en el organismo. Por medio del análisis de varianza inter-grupos (ANOVA) se determinó que entre tratamientos no hay diferencias significativas en cuanto al crecimiento, mientras que las enzimas digestivas tuvieron un mayor efecto sobre la carga bacteriana en comparación con el tratamiento control, y una similitud con los ácidos biliares.

En conclusión la mezcla de enzimas digestivas tiene un mayor efecto sobre la biomasa y la carga bacteriana en relación a los ácidos biliares y al control, sin embargo, no presentan diferencias significativas con respecto a la biomasa final de los tratamientos T1 y control.

**Palabras claves:** ácidos biliares, enzimas digestivas, biomasa, carga bacteriana, camarón.

## ABSTRAC

Aquaculture is an industry that is developed on a large scale within the country, mainly it dedicated to the white shrimp *Penaeus vannamei* cultivation. Due to market demand, shrimp production has exponential growth, in order to satisfy it. These are the reasons that different investigations are carried out, to find procedures capable of improving the performance of the producing farms, as well as innovations or strategies to stimulate shrimp growth and resistance to diseases that can cause high mortality rates, obtaining significant losses to the producer.

In the last years, shrimp farming has begun to be developed in low salinity, due to the economic lands prices, and its accessibility. In addition, the water with low salinity exhibits less growth of pathogens in compared with water with salinity above 25 ppt. To produce on low salinity, the producers avoid elevated losses in production. However, these crops suffer an ionic imbalance, which if it was not controlled it can harm the development of the animals. The ionic imbalance can be corrected by Ca, K and Mg ions application, which are the most important for the development animals. And physiological processes of organisms. It is relevant to noted that the systems allowed to maintain a higher density of shrimp per m<sup>2</sup> if the physicochemical parameters of the water are stable. It could say that in most shrimp farms with less salinity waters, it is possible to practice a semi-intensive or intensive farming system, which allows them to obtain a higher production in a reduced space.

The use of different substances, natural or chemical, in order to promote growth and reduce the bacterial load within shrimp in shorter periods of time, is the objective of several investigations carried out by companies dedicated to the production and sale of aquaculture supplies. Examples of these substances are bile acids and digestive enzymes that are involved in the shrimp digestibility, and it is possible that they can also improve the assimilation of nutrients within the body, stimulating the growth process.

For the aforementioned, this investigation aims to evaluate the effect of natural digestive enzymes and bile acids extracted from tilapia *Oreochromis sp*, on the growth and amount of white shrimp total bacteria.

For the experimentation, 3 treatments were tested in shrimp feeding: T1 (bile acids), T2 (digestive enzymes) and a control treatment with a dosage of 1g/Kg of food. Each treatments had three repetitions during a period of 28 days with two daily applications. For the experimentation, it was used 135 specimens of *P. vannamei*, which were produced with an average weight of 3gr, and were distributed homogeneously in 9 drawers with a volume of 30

L with constant aeration. The water parameters were constant and the same for all treatments, replacing of water periodically each 48 hours and applying bacteria and mineral salts daily. At the end of this period, microbiological analyzes were carried out in Nutrient Agar, to determine the number of total bacteria (CFU/ml) in the organism. Through of the inter-group analysis of variance (ANOVA), it was determined that there were not significant differences between treatments in terms of growth, however, digestive enzymes had a greater effect on bacterial load compared to the control treatment, and a similarity with billiard acids.

In conclusion, the mixture of digestive enzymes has a greater effect on biomass and bacterial load in relation to bile acids and control, however, they do not present significant differences with respect to the final biomass of T1 and control treatments.

**Key words:** bile acids, digestive enzymes, biomass, bacterial load, shrimp.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTO.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRAC .....	V
ÍNDICE .....	VII
1. Introducción .....	11
2. Planteamiento del problema .....	13
3. Justificación.....	14
4. Objetivos .....	15
4.1. Objetivo general .....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	16
5.1. Cultivo de camarón a baja salinidad.....	16
5.1.1. Reducción Gradual y Drástica de la Salinidad.....	16
5.1.2. Balance Iónico.....	16
5.1.3. Importancia del balance Iónico .....	17
5.2. Crecimiento del camarón.....	18
5.2.1. Requerimientos nutricionales .....	18
5.2.2. Digestibilidad de nutrientes.....	20
5.3. Carga bacteriana .....	20
5.4. Ácidos biliares .....	21
5.5. Enzimas digestivas .....	21
5.5.1. Actividad enzimática.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1. Materiales Y Equipos .....	24
6.2. Metodología.....	25
6.2.1. Ubicación de área experimental .....	25
6.2.2. Obtención de ejemplares .....	26
6.2.3. Tratamiento de agua .....	26
6.2.4. Aclimatación de juveniles .....	26
6.2.5. Extracción de ácidos biliares.....	26
6.2.6. Preparación de unidades experimentales.....	27

6.2.7.	Manejo de unidades experimentales.....	27
6.2.8.	Preparación de dietas alimenticias .....	27
6.2.9.	Alimentación .....	28
6.2.10.	Biomasa .....	28
6.2.11.	Microbiología .....	28
6.2.12.	Diluciones sucesivas.....	28
6.2.13.	Preparación del medio de cultivo .....	29
6.2.14.	Siembra en placa.....	29
6.2.15.	Diseño experimental .....	29
6.2.16.	Procesamiento estadístico.....	30
7.	RESULTADOS .....	31
7.1.	Biomasa (g).....	31
7.2.	Microbiología (UFC/ml).....	33
8.	DISCUSIÓN.....	36
9.	CONCLUSIONES .....	38
10.	RECOMENDACIONES .....	39
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	40
12.	ANEXOS.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Concentración de iones en el agua de mar. (Ching, 2014) .....	17
<b>Tabla 2:</b> Preparación de alimentos de acuerdo con los tratamientos.....	28
<b>Tabla 3:</b> Comparación del efecto de los tratamientos sobre la biomasa de camarones <i>P. vanamei</i> cultivados a bajas salinidades.....	32
<b>Tabla 4:</b> Pruebas de efecto inter-grupos para biomasa (g) de camarones cultivados a bajas salinidades en función de los aditivos utilizados .....	32
<b>Tabla 5:</b> Comparación del efecto de los tratamientos sobre la carga bacteriana de camarones <i>P. vanamei</i> cultivados a bajas salinidades. ....	34
<b>Tabla 6:</b> Pruebas de efecto inter-grupos para la carga bacteriana (UFC/ml) de camarones cultivados a bajas salinidades en función de los aditivos utilizados. ....	34

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Crecimiento semanal de la biomasa de <i>P. vannamei</i> en cada tratamiento.....	31
<b>Gráfico 2:</b> Efecto de los suplementos aditivos sobre la biomasa de camarón cultivado a bajas salinidades. ....	33
<b>Gráfico 3:</b> Efecto de los suplementos aditivos sobre la carga bacteriana en camarón cultivado a bajas salinidades. ....	35

## 1. Introducción

En el Ecuador los cultivos de camarón blanco *Penaeus vannamei* cada vez van ganando mayor cantidad de tierras, llegándose a convertir en la primera actividad no petrolera de exportación, por ello al consolidarse como una gran industria los estándares de calidad del producto son más exigentes dentro del mercado, debido a esto la demanda de camarón sube y los productores buscan la manera de satisfacer al mercado, por lo cual buscan nuevas tecnologías capaces de producir más animales por m<sup>2</sup> o a su vez aprovechar terrenos que ya no son aptos para la agricultura y convertirlos en granjas productoras con una fuente de agua dulce o salobre, más conocidos como cultivos de camarón a bajas salinidades.

Los cultivos a baja salinidad están tomando un realce debido a que las tierras son más accesibles y económicas, además que cuentan con una mayor fuente de agua y no tienen que ser dependientes de zonas cercanas al mar, que es una de las principales problemáticas de los cultivos tradicionales. Las ventajas de introducirse en este tipo de cultivos es, que debido a las bajas salinidades el riesgo a enfermedades por patógenos del medio es muy bajo en comparación con el agua de mar, sin embargo existe un factor limitante dentro estos sistemas, que es, el balance iónico, ya que el agua dulce o salobre tienen iones bajos en Ca, Mg y K, los cuales son fundamentales para el desarrollo y crecimiento de estos crustáceos, por ende al no tener un balance adecuado las funciones biológicas se alteraran y el animal puede verse afectado en el nulo crecimiento o incluso presentar altas tasas de mortalidad si no se corrige a tiempo dicho desajuste (Ching, 2014).

También se han buscado innovaciones que ayuden al desarrollo del camarón especialmente en crecimiento y mejora de la microbiota intestinal, en el último año se ha escuchado hablar sobre la aplicación de enzimas digestivas (ED) y ácidos biliares (AB) como suplementos alimenticios en las dietas de *P. vannamei*. Según las últimas investigaciones de (Zhao, A., 2021), han considerado a los AB como un método profiláctico para la salud del hepatopáncreas (HP), ya que dichas sustancias ayudan a digerir de mejor manera las grasas y aumentar la cantidad de lípidos dentro de esta glándula, aunque en las primeras investigaciones realizadas se formuló la hipótesis de que estos ácidos eran capaces de acelerar el metabolismo de los camarones y hacerlos crecer de manera más rápida y eficiente, lo cual solo quedó como una suposición y se mantienen en que mejoran la salud del HP y estimulan la generación de enzimas digestivas para un mejor desarrollo metabólico y mantener buena salud de los animales.



En cuanto nos referimos a las enzimas digestivas y su incidencia dentro del desarrollo metabólico del camarón como en muchos otros organismos la función de las ED es hacer más fácil la digestión de los alimentos descomponiéndolos en formas más sencillas de asimilar para el organismo, así aumentando la cantidad de energía que los animales necesitan para realizar sus funciones biológicas (García & Carillo, 2015).

El sector acuícola se ve afectado muchas veces por el desarrollo del crecimiento del camarón, es por ello que se han realizado diferentes investigaciones con el propósito de encontrar una solución factible, con la finalidad de estimular el crecimiento de dicho organismo. Actualmente se está hablando del uso de ácidos biliares y enzimas digestivas en los cultivos de camarón con la finalidad de obtener un mejor crecimiento.

Debido a los argumentos anteriores, el principal objetivo de este proyecto esta direccionado a determinar y comparar el efecto de enzimas digestivas y bilis de tilapia en el crecimiento del camarón y su carga bacteriana.

## **2. Planteamiento del problema**

La demanda de productos acuícolas nacional o internacionalmente aumenta a un ritmo considerable, por ende los productores buscan la manera más efectiva de suplir con la demanda del mercado. Ecuador siendo uno de los principales países productores de camarón (*P. vannamei*) se ve en la obligación de ofrecer cantidad y calidad de productos para compensar dicha demanda, por lo cual diferentes empresas enfocadas al desarrollo del sector camaronero buscan soluciones y mejoras dentro de los cultivos con la finalidad de obtener una mayor producción en el menor tiempo posible, manteniendo los estándares de calidad. Por tal razón diferentes centros de investigación desarrollan productos, dietas o suplementos alimenticios con el objetivo de mejorar el crecimiento y la salud del camarón.

### **3. Justificación**

En los últimos años se ha escuchado sobre el uso de productos a base de ácidos biliares y enzimas digestivas como un aditivo para el balanceado, mejorando la digestibilidad del mismo. Debido a las recientes propuestas de las empresas expendedoras de insumos acuícolas, es que se realiza la investigación sobre el efecto de suplementos alimenticios aditivos (ácidos biliares y las enzimas digestivas), en el crecimiento y carga bacteriana de camarón (*P. vannamei*) en cultivos a bajas salinidades. Este trabajo dará a conocer si dichas sustancias influyen de manera directa en el crecimiento o en la salud del animal, en cultivos de camarón a bajas salinidades, de ser así podrían mejorar el FCA de una producción haciéndola más rentable. La necesidad de implementar nuevas soluciones para mejorar el crecimiento y la salud del camarón hacen que investigadores realicen más experimentos como este, con el propósito de poder amplificar sus sistemas de producción. Finalmente esta investigación va dirigido hacia el sector productivo de camarón con la finalidad de brindar una solución en cuanto se refiere al desarrollo y crecimientos de los organismos y proyectar una mejor cosecha.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general**

- Evidenciar el efecto de enzimas y bilis de tilapia en el crecimiento y salud del camarón (*P. vannamei*) en un cultivo a baja salinidad.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar la influencia de suplementos alimenticios (enzimas digestivas y ácidos biliares) en la biomasa de camarón cultivados a bajas salinidades
- Determinar la carga bacteriana de los camarones en cultivos a bajas salinidades suplementados con enzimas y bilis de tilapia.

## **5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **5.1. Cultivo de camarón a baja salinidad**

El camarón blanco tiene acciones hiper-osmorreguladoras es decir que puede soportar amplios intervalos de salinidades, principalmente en las etapas de postlarvas y juveniles, haciendo capaz los cultivos en aguas de bajas salinidades y a su vez aumentando la densidad de cultivo, si los parámetros son adecuados (Barreto, 2020).

Los cultivos de camarón a bajas salinidades empiezan en el Ecuador con la finalidad de crear emprendimientos para comunidades y familias que se encuentren en sectores donde las tierras no son aptas para la agricultura, teniendo suelos completamente arcillosos que son muy factibles en los estanques de acuicultura. Para este tipo de cultivos las principales fuentes de agua son provenientes de pozos subterráneos o de estuarios, con salinidades de 0,5 a 10 ppt. La metodología para este tipo de cultivos parte desde la larva que viene del laboratorio, tiene que ser de buena calidad para evitar proliferación de patógenos, otro factor importante es el proceso de aclimatación, debido a que los laboratorios de larvas trabajan con salinidades superiores a 25 ppt, y muchos de estos, con fines comerciales la suelen ofrecer a la misma salinidad de las piscinas donde van a ser sembradas, de no ser el caso debe existir un periodo de aclimatación mínimo de 5 días para bajar la salinidad y evitar el estrés en los animales, para luego sembrarlos en raceways o a sus vez en piscinas de pre-engorde, aumentando la funcionalidad del crecimiento (Aguirre, Maridueña, Ching, & Pérez, 2019).

#### **5.1.1. Reducción Gradual y Drástica de la Salinidad**

Cuando se realizan aclimataciones en cuanto a la salinidad existen dos formas de hacerlo, una de ellos es hacerlo de manera gradual, es decir, ir bajando las salinidades progresivamente hasta llegar a la salinidad deseada, por otro lado, también se practican reducciones de salinidad de manera drástica, pero de acuerdo con (Saraswathy, y otros, 2020) el bajar las salinidades de esta forma ocasiona estrés en los organismos haciendo que la tasa de supervivencia se vea reducida.

#### **5.1.2. Balance Iónico**

Es el equilibrio de diversos minerales, los cuales al mantener una relación adecuada entre ellos, aportan diferentes beneficios los camarones, entre ellos el desarrollo y supervivencia de los mismos dentro de los estanques de producción. El calcio, potasio, sodio y magnesio, son los iones que se deben tener más en cuenta en los cultivos, debido a que de estos tienen gran

incidencia sobre el crecimiento y la supervivencia de estos crustáceos, y a su vez cumplen con funciones específicas dentro de los organismos. De acuerdo con (Molinos Champion S.A.S, 2020) los iones más esenciales para un buen desarrollo de los crustáceos son:

- Magnesio (Mg): ion mineral esencial en la composición del exoesqueleto de crustáceos
- Potasio (K): Se encarga de regular la presión osmótica del organismo, además se lo encuentra en los fluidos y tejidos blandos del mismo.
- Calcio (Ca): Indispensable en la formación del nuevo exoesqueleto después del proceso de ecdisis, y también muy importante para el crecimiento del animal.

### 5.1.3. Importancia del balance Iónico

Tener proporciones de los iones esenciales similares a los del agua de mar, es más eficiente que tratar de mantener los mismos valores que en el agua de mar, esto está relacionado proporcionalmente con la salinidad y el factor en el agua de mar (Ching, 2014)

*Tabla 1: Concentración de iones en el agua de mar. (Ching, 2014)*

Ion	Factor en agua de mar (Lo que debe haber en 1‰)	Concentración en agua de mar (mg/lit.)
Calcio	11.6	400
Magnesio	39.1	1,350
Potasio	10.7	380
Sodio	304.5	10,500
Cloruro	551	19,000
Sulfato	78.3	2,700

Para tener una producción rentable en cultivos a bajas salinidades, es muy importante determinar la forma en la que se va a mantener el balance iónico antes de empezar con el cultivo, esto nos ayudara a prevenir desajustes en la relación de los iones incidentes en el desarrollo del camarón. Cabe mencionar que en los RAS o sistemas semi-cerrados, la cantidad de iones necesarios pueden mantener en niveles óptimos (Ching, 2014).

Una de las razones más importantes de mantener una relación adecuada entre los iones minerales, es que ayudan a mantener estables ciertos parámetros fisicoquímicos, así como el pH, ya que al haber un desfase, las aguas pueden volverse más acidas o alcalinas dependiendo de las proporciones de los iones, de tal manera que se verá reflejado en el crecimiento de los animales (Gadelha, Dos Santos, Cavalcante, & Do Carmo, 2020).

## 5.2. Crecimiento del camarón

El crecimiento del camarón blanco (*P. vannamei*) se ve influenciado por diferentes factores, tales como los parámetros físico-químicos del agua, la productividad primaria dentro del estanque y principalmente por la adición de alimentos comerciales con un perfil nutricional adecuado, constituidos esencialmente por fuentes importantes de lípidos, carbohidratos, enzimas, astaxantina, proteínas, siendo este último el de mayor importancia, ya que conforma la mayor parte de las dietas comerciales, suplementados con diversas fuentes de vitaminas y minerales, cuyas proporciones van a depender de la especie (Senmache & Reyes, 2020). Para una buena formulación de alimentos, no solo es necesario controlar las cantidades de los nutrientes, si no, que también es necesario verificar la calidad de los mismos, ya que este será el punto clave para la disponibilidad de los nutrientes dentro de los piensos (Ruvalcaba, 2021).

La alimentación es uno de los principales factores con más importancia, debido a que aporta valor nutricional para el crecimiento de los organismos, y también representa el 30 y 60 % de los costos operativos de producción, por lo cual se busca implementar diferentes técnicas para mejorar el manejo del alimento, y a su vez tener en cuenta el FCA (Factor de Conversión Alimenticia), que nos indica la eficiencia de los nutrientes en el alimento. La calidad de los nutrientes, hidro-estabilidad, cantidad, frecuencia y forma de adicionar el alimento, son factores que intervienen directamente con el aumento o disminución del FCA (Cota, 2020).

### 5.2.1. Requerimientos nutricionales

Para el desarrollo y crecimiento de los camarones *P. vannamei*, la ingesta de nutrientes es un factor indispensable, por lo general esos nutrientes suelen encontrarse en el propio medio donde se desarrollan, provenientes principalmente de organismos planctónicos (fito y zooplancton), que aportan ciertas cantidades de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, muy importantes para los procesos metabólicos de los crustáceos. Al tener un cultivo de camarones con densidades por encima de las del hábitat normal, es claro que la disponibilidad de nutrientes no será suficiente para obtener un buen desarrollo de los animales, por eso las empresas de insumos acuícolas, se han visto en la necesidad de desarrollar dietas basadas en el perfil nutricional de los camarones, con la finalidad de suplir la falta de nutrientes en el medio y mejorar así el crecimiento de los organismos cultivados.

La **proteína** debido a que es el punto inicial del cultivo de cualquier especie, tiene relación directamente con el crecimiento de los organismos (García & Carillo, 2010). La cantidad necesaria para estos crustáceos va a depender de la etapa de crecimiento en la que se encuentre,

ya que (García, 2021) menciona que en diferentes experimentos que se realizaron el porcentaje de proteína va a variar de acuerdo con el animal, concluyendo que mientras el animal se encuentre en una etapa inicial de post larva, la cantidad de proteínas necesarias va a ser mayor que en camarones juveniles y adultos, siendo así que en dichos experimentos se define que una dieta con el 33-35% de proteínas va a tener un mejor efecto sobre el crecimiento en camarones con un peso de 0,3 – 11 g, por otra parte las dietas con el 25% de proteínas resultan más eficientes para el crecimiento de camarones adultos.

Los **lípidos** al ser compuestos orgánicos hidrófobos poseen una diversidad de funciones biológicas, en general los fosfolípidos y esteroides son elementos estructurales de las membranas celulares, y a su vez ayudan a mantener la integridad fisiológica de las mismas. Para que los organismos realicen los procesos anabólicos, es necesaria la presencia de lípidos, quienes proveen de energía y fuentes de reserva energética para llevar a cabo estos procesos, además que ayudan a los animales a realizar funciones estructurales y reguladoras (Montiel, 2018).

Dentro del cultivo de camarón los lípidos como los esteroides, ácidos grasos, aceites, triglicéridos y fosfolípidos desempeñan un papel fundamental en cuanto a la alimentación, ya que funcionan como una fuente de energía para realizar diferentes funciones biológicas (Hanna, 2020),

Los **carbohidratos** (almidones y azúcares) son las fuentes de energía menos costosa para la elaboración de alimentos balanceados para peces y camarones. Estas sustancias no son un factor indispensable para una adecuada nutrición, pero son muy utilizados como soluciones pegantes para unir todos los ingredientes de una dieta, por eso se usan en proporciones más pequeñas, lo que ayuda a reducir costos de producción. Para piensos comerciales de peces se suelen usar almidones dietéticos para elaborar por medio de extrusión alimentos flotantes (Craig, 2017).

Las **vitaminas** son responsables de precautelar la integridad funcional y estructural de los componentes celulares del sistema inmunológico, y su deficiencia puede conducir a un mayor desarrollo de enfermedades virales y bacterianas. Algunas de las más usadas en acuicultura son las vitaminas E y C, que debido a su actividad antioxidante suelen ser aplicadas como inmunoestimulantes, creando una resistencia sobre las proliferaciones de patógenos (Rueda, 2018). La cantidad de vitaminas necesarias va a depender del tamaño de la especie, factores ambientales y también nutrientes asociados al medio, por otro lado en peces la vitamina C influye sobre diversos procesos metabólicos como la síntesis de colágeno, absorción de metales, entre otros (Alanes, 2020).



Los **minerales** son elementos inorgánicos en la dieta de camarones, muy necesarios para el correcto funcionamiento de los organismos. Dependiendo de la cantidad requerida en la dieta y la cantidad contenida en el organismo, se pueden dividir en dos grupos: macro y micro-minerales. Las mayorías de especies acuáticas pueden absorber estos minerales por medio de las branquias y de procesos como la regulación osmótica (Craig, 2017). En los cultivos a bajas salinidades estas sustancias juegan un papel muy importante dentro de las dietas alimenticias, ya que compensan los iones necesarios, que no están disponibles en el agua de cultivo, para un buen desarrollo y supervivencia de los animales,

### **5.2.2. Digestibilidad de nutrientes**

La digestibilidad se define como una medida de la disponibilidad de alimentos, es decir, la cantidad de alimentos que no se elimina por medio de procesos metabólicos como la excreción y se considera digerible, es decir, la porción de ese alimento que se convierte fácilmente en nutrientes en el sistema digestivo. En cuanto a la digestibilidad, ésta involucra dos procesos: la hidrólisis de moléculas complejas del alimento, y la absorción de moléculas pequeñas (aminoácidos, ácidos grasos) en el intestino (Párraga & Parrales, 2020).

La calidad de los ingredientes de una dieta se puede evaluar en función de la digestibilidad de la materia seca, proteína y energía. Por tanto, el análisis de los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes en las materias primas permite formular dietas basadas en la actividad enzimática de las especies, priorizando aquellas con mejor digestibilidad y maximizar el uso de diferentes ingredientes en la dieta, evitando así la eutrofización del agua en las granjas de producción (Parra, 2020).

### **5.3. Carga bacteriana**

Cuando nos referimos a la carga bacteriana, estamos hablando de forma general de la cantidad de bacterias totales sean estas gram (+) o gram (-) que se encuentran dentro de los animales. Los principales patógenos que afectan a las larvas y los cultivos de engorde son las bacterias gram (-), que atacan de forma oportunista al huésped cuando su sistema inmunológico está debilitado o bajo estrés (López, 2020).

Muchos tipos de bacterias oportunistas, incluido *Vibrio sp.*, pueden crecer en estos sistemas. Especies de este género son agentes causantes del síndrome de mortalidad temprana (EMS) o síndrome de necrosis pancreática aguda (AHPNS) en el camarón blanco *Penaeus vannamei*. Para el control de estos patógenos, la tendencia actual es encontrar probióticos que, además de

biorremediar la calidad del agua, brinden una herramienta útil para tratar estas enfermedades y evitar el uso de fármacos en las camaronas, para este último propósito también se han estado practicando otras alternativas como la estimulación de enzimas por medio de bacterias específicas o a su vez adicionando mezclas de enzimas digestivas (Pacheco, y otros, 2018).

#### **5.4. Ácidos biliares**

Los AB pueden favorecer al crecimiento de los peces, reducir el almacenamiento de grasa e influir en la respuesta inflamatoria de los peces (Jin, y otros, 2019). Se ha demostrado que la suplementación dietética de estas sustancias provoca la disminución de la función digestiva y el crecimiento de los peces, causado por dietas bajas en harina de pescado. También se ha identificado que tienen gran influencia sobre el metabolismo de los lípidos, ya que se sintetizan exclusivamente a partir del colesterol en el hígado. En los intestinos, los ácidos biliares actúan como detergentes, creando emulsiones y facilitando la absorción de vitaminas y grasas dietéticas liposolubles (Liao, y otros, 2020).

Los ácidos biliares son emulsionantes para la síntesis de colesterol en vertebrados, y las interacciones entre los ácidos biliares y el colesterol se han descrito ampliamente en vertebrados. Estudios revelan que los ácidos biliares podrían tener efectos beneficiosos en peces, que incluyen un mejor rendimiento del crecimiento y la función hepática, una respuesta reducida al estrés y la regulación del metabolismo de los lípidos y la microbiota intestinal. En el estudio realizado demuestran que tanto los colesteroles dietéticos como los ácidos biliares tuvieron efectos beneficiosos sobre el rendimiento del crecimiento del camarón y el metabolismo de los lípidos. Además los ácidos biliares pueden inducir el mantenimiento de colesterol en las dietas de los camarones y mejorar las respuestas inmunitarias de los camarones (Su, y otros, 2022).

#### **5.5. Enzimas digestivas**

Las enzimas digestivas se producen en muchos órganos diferentes, como el estómago, el páncreas, la vesícula biliar las paredes intestinales. Sin embargo, las enzimas pueden provenir del alimento vivo o de las bacterias que forman la microbiota intestinal (Mercado, 2016).

Una de las formas para identificar la capacidad de los organismos para sintetizar nutrientes provenientes de los alimentos, es por medio del análisis de composición de sus enzimas y de su actividad para digerir los alimentos. Estas sustancias se encuentran presentes en el medio, en los alimentos y muchas de estas pueden ser producidas por diferentes bacterias probióticas. Para

el proceso de digestión se necesitan de procesos físicos, químicos y enzimáticos, que empiezan a ser ingeridos por la boca y finaliza por medio de la excreción (Benitez, 2018).

### 5.5.1. Actividad enzimática

El sistema de cultivo afecta la actividad de las enzimas digestivas cuando el organismo se cría en agua de estanque rica en nutrientes, y la actividad de serina, proteasa, colagenasa, amilasa, lipasa, celulasa y fosfatasa ácida es mayor que en agua de pozo, posiblemente debido al rendimiento natural como fuente de materia orgánica (Barreto, 2020).

Uno de los factores que influyen sobre la actividad enzimática son los probióticos, debido a su capacidad para estimular la producción de nuevas enzimas dentro de los organismos y facilita el proceso de asimilación de nutrientes, mejorando el sistema inmune y la supervivencia de los animales (Toledo, Castillo, Carrillo, & Arenal, 2018).

Algunas de las enzimas naturales que influyen en el sistema digestivo de los organismos acuáticos son:

La **betaína** es un producto con beneficios osmorreguladoras que al momento de agregar en la alimentación de salmones y camarones, nos permite una mejor y rápida adaptación a medios con altas salinidades. Hoy en día esta enzima es de uso muy común en la industria acuícola para su alimentación y mejoramiento del desarrollo de las especies (Barrandeguy, 2009).

La **pepsina**, es una de las más importantes proteasas encontradas en las vísceras de varios peces, estas pertenecen a la familia de las endopeptidasas aspárticas. Estas enzimas pueden estar presente en forma de isoenzimas. Estas sustancias se van extrayendo de las diferentes glándulas digestivas de los animales marinos. El pH de la pepsina es muy estable en un intervalo de aproximadamente de pH como el 2 y 6, sin embargo estas rápidamente pierde actividad de pH superior de 6 debido a que se desnaturaliza (Guerrero, Rosmini, & Amenta, 2018).

La **papaína** es una enzima proteolítica que se encuentra presente en látex de las hojas y ciertos frutos, la misma que contiene una alta actividad biológica (bactericida, bacteriostático), por esto podemos decir que es un componente ampliamente utilizado en la medicina, textiles, cosméticos, etc. Esta enzima digestiva ocasionalmente se la puede encontrar y extraer de ciertos frutos como la papaya. Su función y control principal es en el proceso digestivo al tener que estar presente en la descomposición de las fuertes fibras de proteína (Muñoz, Zambrano, Párraga, & Verduga, 2019).

La **pancreatina** también forma parte de las enzimas proteolíticas, su procedencia generalmente es de origen animal, se consigue a partir de tejidos de varios órganos como el estómago o el páncreas. Como sabemos las enzimas que se derivan de los tejidos mencionados anteriormente suelen tener un pH ácido. Su composición se centra en la mezcla de: amilasa, tripsina, lipasa, proteasa y ribonucleasa (Lera Santín, 2011).

El uso de esta enzima en las dietas de las larvas de *Litopenaeus vannamei* demostró un gran beneficio entre su peso inicial y final de las larvas, podríamos decir que el rendimiento mejora notablemente cuando se utiliza un suplemento a base de pancreatina. (Sirvas, Jones, & Latchford, 2005)

La **bromelina** es una enzima proteolítica que en un principio estuvo presente en las hojas y tallos de plantas, específicamente en la piña (*Ananas comosus*), posterior a esto se dio a conocer su presencia en el mismo fruto de la planta y en otras especies de la familia de las *Bromeliaceae* (Alvarado, 2021).

Son enzimas de origen vegetal y sobre todo microbiológico, que actúa como enzimas exopeptidasas y endopeptidasas, las cuales rompen enlaces peptídicos para convertirlos en péptidos más pequeñas, además contienen combinaciones de aminoácidos libres. Dentro de las industrias alimentarias es muy común el uso de este tipo de enzimas con la finalidad de obtener extractos de proteína de diferentes mariscos, por medio de estos catalizados reducen el contenido de lípidos y cenizas de los organismos, mejorando el producto final y obteniendo estándares altos de calidad. Entonces, podemos decir que básicamente la enzima bromelina mejora el sabor del alimento y color, con frecuencia es más utilizado en camarones, cangrejos y langostas (Carranza, Velásquez, & Rivas, 2018).

**Lipasa** es una enzima de origen microbiano que se encarga de hidrolizar el enlace éster de triglicéridos con la finalidad de liberar ácidos grasos y glicerol. Para que el sustrato sea hidrolizado, debe realizarse un proceso de emulsión entre los lípidos y el agua, y por medio del dominio hidrofóbico desplazarse fácilmente para adherirse al sustrato hidrolizando el enlace éster por medio de la activación inter-facial. Después de describir este proceso entendemos que, las lipasas digestivas del camarón del pacífico *Penaeus vannamei* nos permiten la hidrólisis de triglicéridos ya sea de cadena corta o larga, basándose de sustratos con instauraciones (Maytorena, 2011).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Materiales Y Equipos**

#### **Materiales**

- Gavetas (Unidad experimental)
- Balanceado
- Tanque 1000 L
- Tanques 250 L
- Piedras difusoras
- Mangueras de acuario
- Red de acuario
- Jeringas
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Tubos eppendorf
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Material de disección
- Gradillas
- Cajas Petri
- Asa de Drigalski
- Mechero
- Papel aluminio
- Marcadores

#### **Sustancias**

- Ácidos biliares
- Enzimas digestivas
- Pegante
- Muriato de potasio
- Cloruro de magnesio
- Carbonato de calcio
- Vitamina C

- Azúcar
- Probióticos
- Cloruro de sodio
- Agua de mar (30 ppt)
- Medio de cultivo: AGAR NUTRITIVO
- Agua destilada
- Alcohol

### **Equipos**

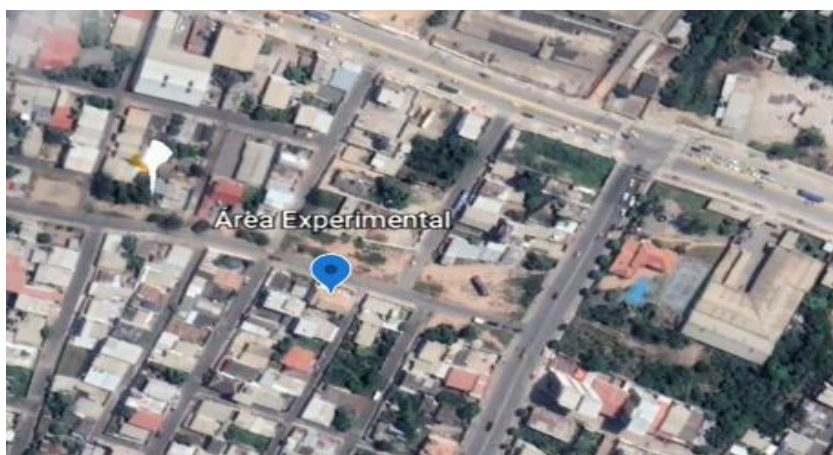
- Aireadores
- pHmetro
- TDS
- Gramera
- Estufa
- Autoclave
- Cámara de flujo-laminar

## **6.2. Metodología**

Para la presente investigación se llevó a cabo la siguiente metodología:

### **6.2.1. Ubicación de área experimental**

El ensayo se realizó en la propiedad del Sr. Wilman Granda ubicada en la ciudad de Machala en la provincia de El Oro las coordenadas  $3^{\circ}16'18''S$   $79^{\circ}6'02''W$  (Figura1).



*Figura 1: Ubicación del lugar donde se realizó la experimentación*

### **6.2.2. Obtención de ejemplares**

Se obtuvieron 135 juveniles de *P. vannamei* de la camaronera “San Nicolás” ubicada en el cantón de arenillas de la provincia de El Oro en las siguientes coordenadas 3°31'32.2"S 80°10'37.8"W.

Los juveniles fueron transportados desde la granja acuícola hasta el área experimental en tanques de 250 L con aireación constante, y al llegar a lugar de experimentación se los colocó en un tanque de 1000 L, solo con el agua que fue transportada y se tomó los parámetros del agua los cuales fueron: salinidad de 1 ppt, T°C: 28°C, pH: 7,98, conductividad: 1800 us/cm

### **6.2.3. Tratamiento de agua**

La fuente de agua de la investigación va ser extraída del grifo, es decir que se utilizara agua potable previamente desinfectada con máquinas de ozono, aun así esta agua contiene cierto porcentaje de cloro para lo cual se aplicó vitamina C para desclorinar el agua, este proceso se lo realiza 24 horas antes de utilizar el agua, de igual manera se midió los parámetros del agua que dieron como resultado: Salinidad de 0,5 ppt, T°C: 22-23°C, pH: 7,5 – 8,5 y conductividad: 400-700 us.

Se almacenaban 250 litros de agua en un tanque para realizar el tratamiento y mantenerlo como reservorio para realizar los recambios de agua.

### **6.2.4. Aclimatación de juveniles**

La adaptación a los cambios físico-químicos del agua fue realizada de manera cuidadosa y en varios días para evitar el estrés de los animales y a su vez la mortalidad. Para la aclimatación en el segundo día de haber obtenidos las muestras se le añadió un porcentaje de agua del que vamos a utilizar para el ensayo, se le añadió bacterias probióticas para controlar los niveles de amonio y se les adiciono una pequeña ración de alimento, durante 7 días se repitió este procedimiento hasta igualar las condiciones del agua.

### **6.2.5. Extracción de ácidos biliares**

Los ácidos biliares fueron extraídos de la bilis de los ejemplares de tilapias (*Oreochromis sp.*) cultivadas en la estación de maricultura con peso promedio de 150 a 300 g, en total se utilizaron 6 peces para toda la experimentación.

### **6.2.6. Preparación de unidades experimentales**

Se utilizaron 9 unidades experimentales de las cuales 3 fueron empleadas para cada tratamiento con sus respectivas replicas, ya que la investigación cuenta con un tratamiento control, y dos tratamientos y cada uno con 3 réplicas.

Cada unidad fue llenada con 30 L de agua y 15 ejemplares provenientes del tanque de aclimatación y a su vez se efectuó el respectivo gramaje, el cual fue realizado cada lunes durante 4 semanas, por otro lado, se aplicó bacterias en el agua para controlar la calidad de la misma.

### **6.2.7. Manejo de unidades experimentales**

Para mantener las condiciones óptimas del medio se tomó agua de los reservorios previamente desclorinadas y se efectuó los recambios de agua del 30% y al inicio de cada semana se hacía recambios del 50% con la finalidad de mantener los niveles de TAN menores a 0,5 ppm. Previo a cada recambio los niveles de TAN eran medidos por medio del kit API, y posteriormente a los recambios se aplicaban las sales necesarias para el balance iónico. Por otro lado también se aplicó bacterias probióticas en el agua con el fin de mantener la calidad del agua en estado óptimo, estas bacterias eran aplicadas diariamente en todas las unidades de experimentales.

### **6.2.8. Preparación de dietas alimenticias**

Para preparar las dietas alimenticia, se aplicara los productos a una dosificación de 1g/kg de alimento o a su vez 1ml/kg de alimento.



**Tabla 2:** Preparación de alimentos de acuerdo con los tratamientos

<b>Tratamientos</b> <b>Preparado</b>	<b>Tratamiento control</b>	<b>Tratamiento 1</b>	<b>Tratamiento 2</b>
Balanceado	7,5 g	7,5 g	7,5 g
Agua de mar pegante	1,25 g	1,25 g	1,25 g
Probiótico	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Azúcar	0,03 g	0,03 g	0,03 g
MgCl	0,1 g	0,1 g	0,1 g
KCl	0,05 g	0,05 g	0,05 g
Ácidos biliares		150 ul	
Mezcla de enzimas digestivas (betaína, papaína, bromelina, lipasa, pancreatina y pepsina)			0,05 g

### **6.2.9. Alimentación**

Las dietas fueron preparadas al 4,5 % de la biomasa inicial y al llegar a la última semana se dosifico al 3,5 % de la biomasa, con dos raciones al día durante las 4 semanas.

### **6.2.10. Biomasa**

Para determinar la biomasa se pesaban todos los organismos sobrevivientes de cada unidad experimental, y este procedimiento se lo realizaba al inicio de cada semana.

### **6.2.11. Microbiología**

Para el análisis microbiológico se utilizó el método de siembra en placa por medio de diluciones seriadas, el cual consiste en hacer diluciones sucesivas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) y luego ser sembradas en el medio de cultivo que se haya decidido con antelación.

### **6.2.12. Diluciones sucesivas**

Para las diluciones primero se preparó solución salina al 0,9 % debido a que los camarones fueron cultivados a bajas salinidades, se prepararon 9 tubos de ensayo con 9 ml de solución salina, 3 tubos para cada tratamiento y hacer las diluciones correspondientes ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Posterior a esto se hace un pool de hepatopáncreas por cada tratamiento, para ello se tomó

aleatoriamente 3 camarones de cada unidad experimental se las maceró y del macerado se pesa 1g de HP y se coloca en el primer tubo y se hacen las diluciones sucesivas.

### 6.2.13. Preparación del medio de cultivo

Se preparó 270 ml de agar Nutritivo, se lo esterilizo durante 15 minutos a una temperatura de 121°C. Posteriormente se distribuyó en 18 cajas Petri, las mismas que se dejaron 24 horas en la cámara de flujo laminar con aire constante y rayos UV.

### 6.2.14. Siembra en placa

Se colocaron 100 ul de cada dilución utilizando el método de siembra en superficie, se realizaron 2 siembras por cada dilución de cada tratamiento y se las dejo en un lugar oscuro y libre de contaminación a temperatura ambiente durante un periodo de 24 horas para después realizar el conteo de las colonias bacterianas.

### 6.2.15. Diseño experimental

El presente estudio realizado es de tipo experimental, cuya investigación se llevó a cabo durante 39 días. Que se dividió en 3 etapas, la primera etapa fue el proceso de aclimatación de los juveniles, en la segunda fase se cuantifico el aumento de la biomasa, y por último fue el análisis microbiológico.

El diseño experimental utilizado fue un DCA (Diseño Completamente al Azar), en el cual el factor de estudio fueron los suplementos alimenticios que consistieron en tres tratamientos (T1: Ácidos biliarés, T2: Enzimas digestivas y TC: Control) que fueron adicionados en el alimento del camarón. Los animales fueron alimentados con balanceado al 35% proteínas y con un pellet de 1.8 mm.

Réplicas	Tratamientos: T1 (ácidos biliarés), T2 (enzimas digestivas)		
1	Control	T1	T2
2	T1	T2	Control
3	T2	Control	T1

### **6.2.16. Procesamiento estadístico**

Los datos obtenidos, relativos al crecimiento y al conteo de bacterias en el hepatopáncreas de camarón en función de cada tratamiento, fueron comparados con un análisis de varianza (ANOVA) de un factor inter-grupos, con la finalidad de detectar la presencia o no de diferencias estadísticas significativas entre ellas. Antes de aplicar el ANOVA de un factor inter-grupos, se procedió a verificar la normalidad de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y para la homogeneidad de varianzas se aplicó la prueba de Levene. En caso de presentarse diferencias estadísticas significativas entre tratamientos se aplicó la prueba de rango y comparaciones múltiples de Duncan (Pruebas Post Hoc). El análisis estadístico de datos fue realizado con el programa estadístico SPSS Statistics versión 22 de prueba para Windows, con un nivel de confiabilidad del 95 % de estimación.

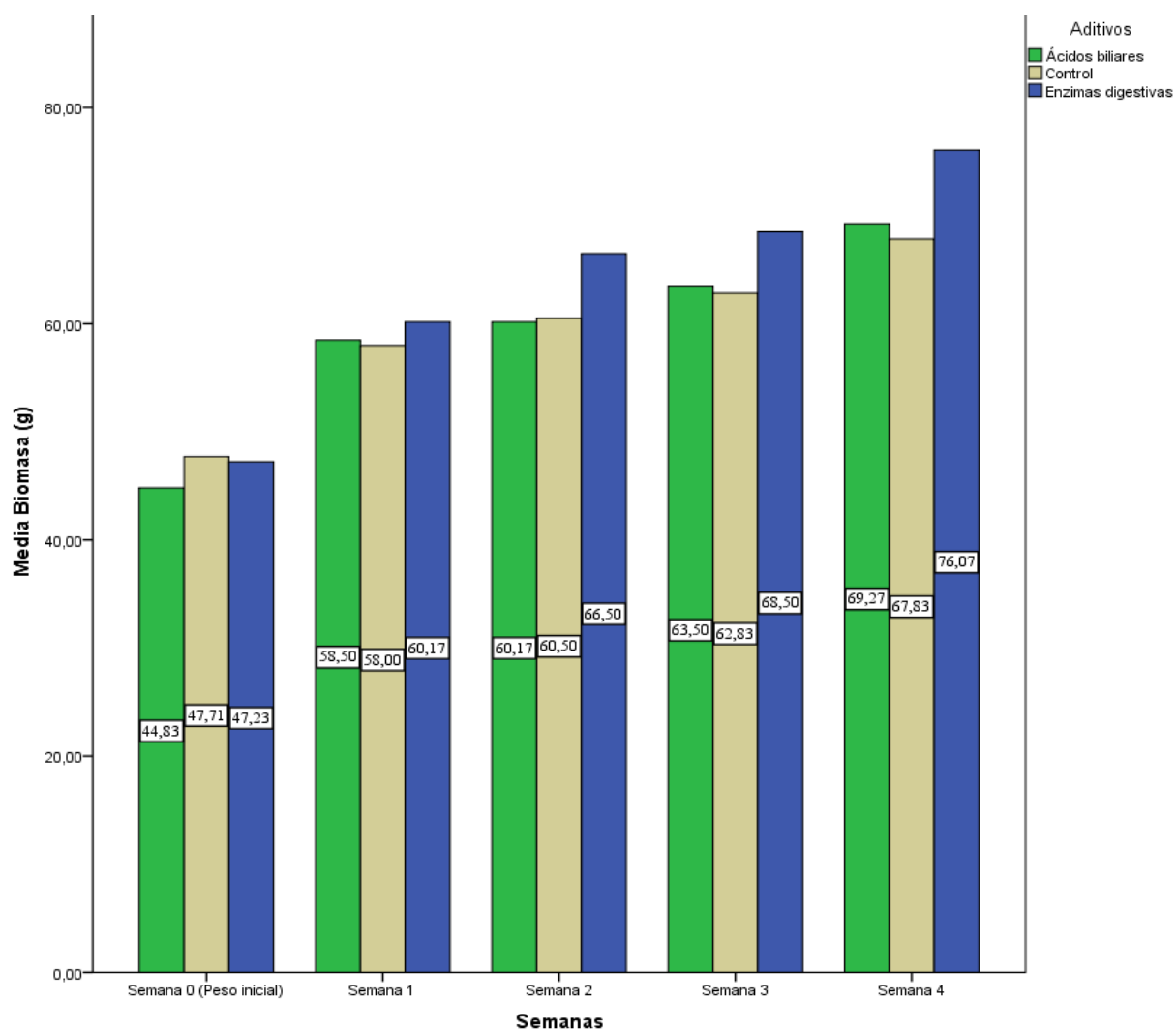
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Biomasa (g)

Los resultados obtenidos, sobre la influencia de enzimas digestivas y ácidos biliares en el crecimiento del camarón cultivado a bajas salinidades fueron evaluados en relación a la biomasa total de cada tratamiento. En la tabla 3 se observa que al cabo de 4 semanas de estudio, el tratamiento con mayor ganancia de biomasa fue el T2 en comparación al tratamiento al T1 y a TC que tienen valores similares.

Los datos del grafico 1 indican el crecimiento semanal que ha tenido los objetos de estudio durante 4 semanas, determinando con que tratamiento los animales ganaron una mayor biomasa dentro de este periodo.

*Gráfico 1: Crecimiento semanal de la biomasa de P. vannamei en cada tratamiento.*



**Tabla 3:** Comparación del efecto de los tratamientos sobre la biomasa de camarones *P. vanamei* cultivados a bajas salinidades.

Tratamientos	N° camarones	Biomasa Inicial (g)	N° camarones	Biomasa Final (g)	Supervivencia (%)
<b>Control (Testigo)</b>	15	45,00	14	66	93,33
	15	49,14	14	62	93,33
	15	49,00	15	75,5	100,00
<b>T1 (Ácidos Biliares)</b>	15	44,31	15	72,3	100,00
	15	45,43	13	65,5	86,67
	15	44,74	15	70	100,00
<b>T2(Enzimas digestivas)</b>	15	49,00	15	77	100,00
	15	45,90	15	75,2	100,00
	15	46,80	15	76	100,00

El ANOVA de un factor inter-grupos realizado evidencia que no se presentan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos objetos de estudio (control, enzimas digestivas y ácidos biliares) en función de la biomasa del camarón, ya que el p-valor obtenido (0,306) es mayor a alfa; por lo cual, se concluye que los aditivos utilizados no van a presentar un efecto significativo sobre la biomasa del camarón en los cultivos a baja salinidad.

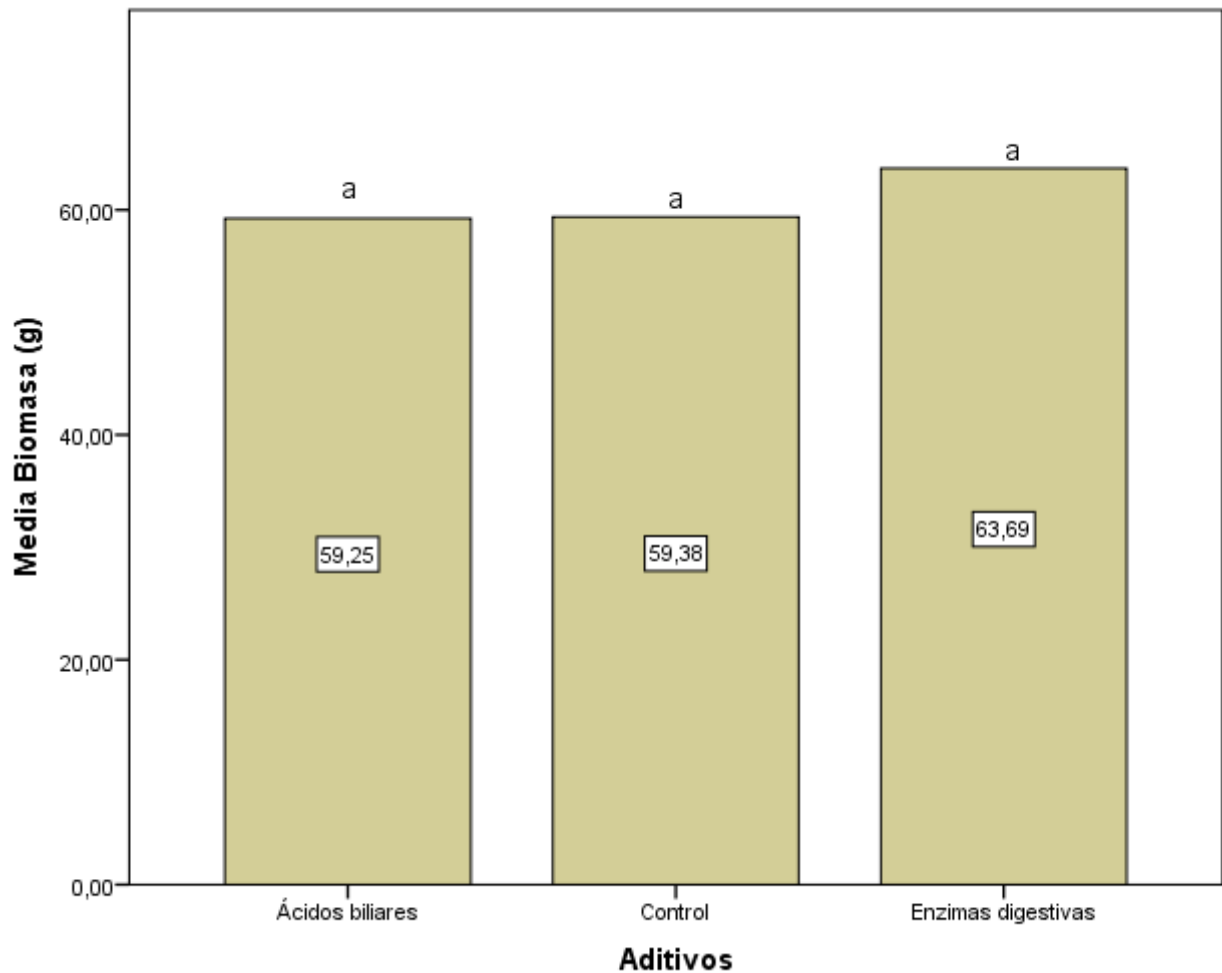
**Tabla 4:** Pruebas de efecto inter-grupos para biomasa (g) de camarones cultivados a bajas salinidades en función de los aditivos utilizados

Biomasa (g)

Fuentes de variabilidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	191,901	2	95,950	1,218	0,306
Dentro de grupos	3308,304	42	78,769		
<b>Total</b>	<b>3500,205</b>	<b>44</b>			

En el grafico 2 se observa que el tratamiento con mayor crecimiento en biomasa es el T2 (enzimas digestivas) con respecto al tratamiento testigo y al tratamiento con ácidos biliares. Por otro lado el T1 (ácidos biliares) obtuvo un crecimiento similar al tratamiento testigo. Aunque las enzimas digestivas resultaron tener un efecto mayor que los ácidos biliares en el crecimiento

de los animales, estadísticamente no presentan diferencias significativas, entre tratamientos, ni con el tratamiento control.



**Gráfico 2:** Efecto de los suplementos aditivos sobre la biomasa de camarón cultivado a bajas salinidades. Letras diferentes difieren estadísticamente para un p-valor menor a 0,05 (prueba de Duncan).

## 7.2. Microbiología (UFC/ml)

En cuanto a los resultados del análisis microbiológico de hepatopáncreas de los camarones, podemos observar en la tabla 5 que la cantidad de colonias es menor en el T2 con respecto al T1 y al TC, por ende las enzimas digestivas tienen un mayor efecto al momento de reducir la carga bacteriana en el HP del animal.

**Tabla 5:** Comparación del efecto de los tratamientos sobre la carga bacteriana de camarones *P. vanamei* cultivados a bajas salinidades.

TRATAMIENTOS	Concentración	UFC ml <sup>-1</sup>
Tratamiento control	10 <sup>-3</sup>	1,46E+06
Tratamiento 1	10 <sup>-3</sup>	1,11E+06
Tratamiento 2	10 <sup>-3</sup>	7,30E+05

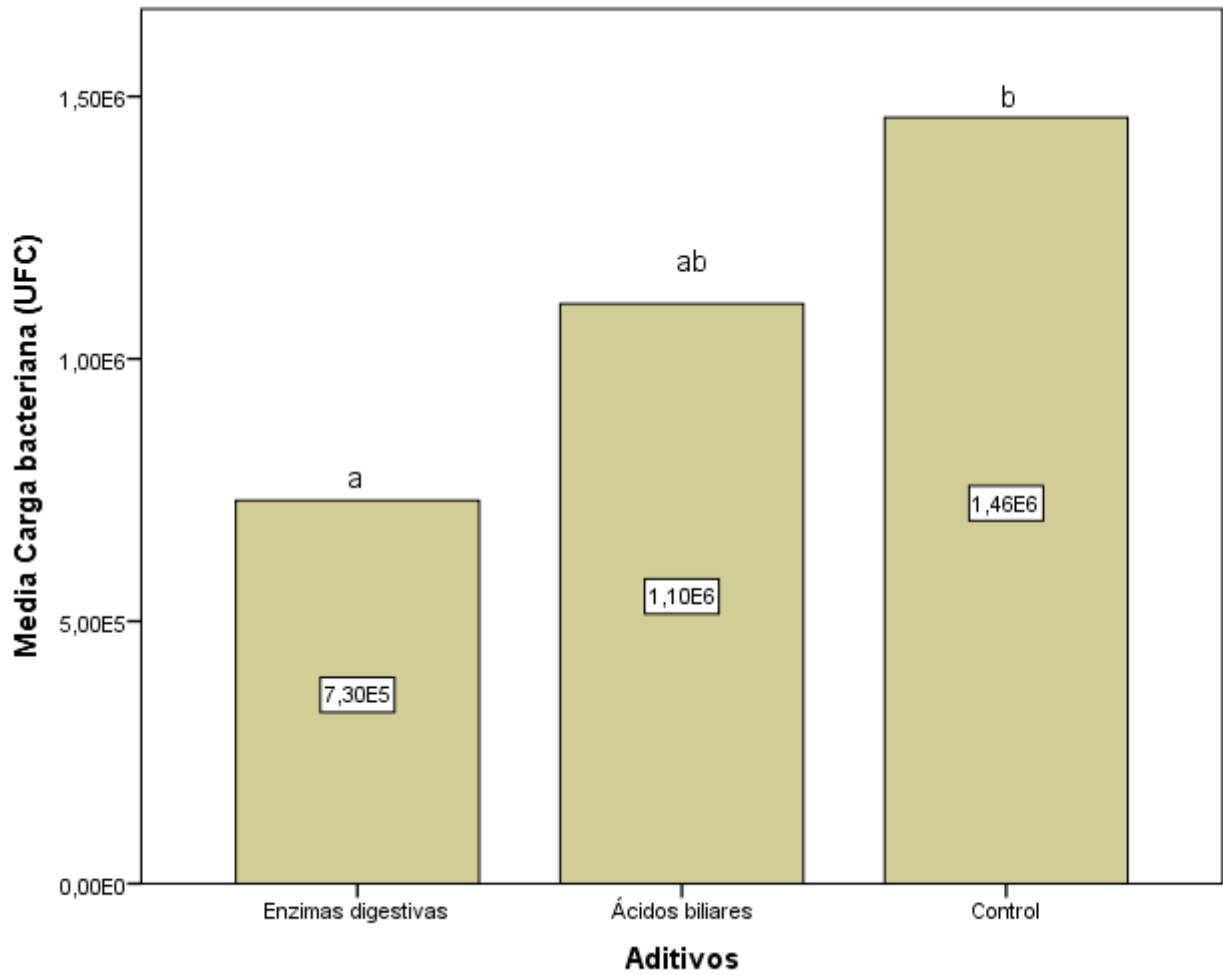
El ANOVA de un factor inter-grupos realizado evidencia que el tratamiento con enzimas digestivas no presenta diferencias estadísticas significativas ante el tratamiento con ácidos biliares, pero con el control estadísticamente existen diferencias significativas en función de la carga bacteriana en camarón, ya que el p-valor obtenido (0,042) es menor que alfa, se concluye, que el suplemento alimenticio (enzimas digestivas) va a tener un efecto mayor sobre la cantidad de bacterias totales en el organismo, con respecto a los otros tratamientos.

**Tabla 6:** Pruebas de efecto inter-grupos para la carga bacteriana (UFC/ml) de camarones cultivados a bajas salinidades en función de los aditivos utilizados.

Carga bacteriana (UFC/ml)

Fuentes de variabilidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Entre grupos	5,330 x10 <sup>11</sup>	2	2,665 x10 <sup>11</sup>	5,877	,042
Dentro de grupos	1,361 x10 <sup>11</sup>	3	4,535 x10 <sup>10</sup>		
<b>Total</b>	<b>6,691 x10<sup>11</sup></b>	<b>5</b>			

En el grafico 3 se puede observar que en los tratamientos con enzimas digestivas y ácidos biliares hay una disminución en el crecimiento de colonias bacterianas con respecto al control, sin embargo los ácidos biliares, estadísticamente no presenta diferencias significativas con el control, ni con el tratamiento con enzimas, mientras que las enzimas digestivas, difiere estadísticamente del tratamiento control, siendo el que tiene mayor efecto sobre el crecimiento de colonias bacterianas en el hepatopáncreas del camarón.



**Gráfico 3:** Efecto de los suplementos aditivos sobre la carga bacteriana en camarón cultivado a bajas salinidades.

Letras diferentes difieren estadísticamente para un p-valor menor a 0,05 (prueba de Duncan)



## 8. DISCUSIÓN

En la producción de camarón blanco (*P. vannamei*) suele ser muy frecuente los problemas con las dietas alimenticias y la capacidad de digestión por parte de los animales, en muchos casos grandes cantidades de balanceado no suelen ser ingeridos por los camarones, cuyo residuos se precipitan y se descomponen cargando el medio, de tal manera que aumenta la materia orgánica en los estanques, produciendo una alteración en los parámetros fisicoquímicos del agua, principalmente el Amonio, así mismo puede aumentar la carga bacteriana de los organismos, haciéndolos propensos a diferentes enfermedades, entre ellas las de origen bacteriana.

En el presente trabajo realizado se pudo observar que hay una ligera mejoría en el crecimiento del camarón cuando se utilizó una mezcla de enzimas digestivas en relación al uso de ácidos biliares y al control, debido a que al usar enzimas digestivas estas aceleran el proceso de la síntesis de proteínas haciendo que estas sean asimiladas de forma más eficiente. Así mismo (Merino, 2018) y (Ayala, 2014) coinciden en que mientras la actividad enzimática sea mayor los organismos acuáticos pueden mejorar la síntesis de proteínas, estimulando el proceso de crecimiento tanto de peces como de camarones, ya que describen a las enzimas como catalizadores biológicos capaz de acelerar una reacción química.

En cuanto a los ácidos biliares no se pudo evidenciar un crecimiento significativo, esto puede deberse a las dosificaciones utilizadas (1 g/Kg), que fue tomada como referencia de un producto comercial con un contenido de 30 % de ácidos biliares, contrario a lo que indica otro investigador en un estudio que realizó probando diferentes dosificaciones de bilis, recomienda usar una dosis de 0,2 g/kg en la dieta, ya que fue esta la que obtuvo un mejor resultado en cuanto a la mejora de respuestas inmunes y al crecimiento de los ejemplares, por otro lado, mencionan que al usar concentraciones mayores se puede producir un daño oxidativo en los camarones afectando el crecimiento del mismo (Su, y otros, 2021).

Los resultados del presente ensayo muestran que al adicionar una mezcla de enzimas digestivas naturales en el alimento disminuye la cantidad de bacterias totales en los camarones, esto puede deberse a que dichas enzimas estimulan la absorción de nutrientes en el organismo, haciendo que el sistema inmunológico del animal se fortifique evitando así la proliferación de bacterias patógenas, esto se puede ver reflejado en una investigación realizada por (Dai, y otros, 2018) donde mencionan que la comunidad bacteriana se encuentra relacionada directamente con la actividad de enzimas digestivas e inmunológicas, ya que en su investigación, midió la actividad de dichas enzimas en camarones sin alimentar y alimentados con estas sustancias. En el estudio

de este investigador se da a conocer que en los animales en ayuno, la actividad de enzimas digestivas fue baja, mientras que la actividad de enzimas inmunológicas aumenta debido a que el camarón comienza a tener reacciones fisiológicas causadas por el estrés de no estar alimentados.

En relación al crecimiento bacteriano en el tratamiento con ácidos biliares no se pudo diferenciar una disminución de la carga total de bacterias, al igual que el trabajo realizado por (Kumar, y otros, 2019) donde describen que los ácidos biliares aumentan de forma positiva la virulencia del *Vibrio. parahaemolyticus* en el camarón que es el causante de AHPND, aumentando de tal manera la carga bacteriana e impidiendo e crecimiento del animal.

De acuerdo con los resultados del tratamiento con enzimas digestivas resulto en una disminución significativa de las bacterias totales en relación al control, similar a los hallazgos encontrado por (Zheng & Wang, 2016) donde en su trabajo de investigación mencionan que ciertas bacterias ácido lácticas aisladas del tracto digestivo de *Litopenaeus vannamei* fueron capaces de producir enzimas digestivas (proteasa, celulosa y lipasa) con actividades antagónicas contra patógenos en camarones, especialmente bacterias del genero *Vibrios sp.*

En otro estudio realizado en juveniles de camarón tigre *Penaeus monodon* demuestran que la adición de bacterias probióticas en el alimento produce enzimas hidrolíticas que ayudan a la digestibilidad del alimento y mejora la asimilación de nutrientes, dando como resultado un mayor rendimiento en el crecimiento de los ejemplares (Wan, y otros, 2020). Con este estudio podemos justificar por qué, la aplicación de enzimas digestivas resulto ser más efectiva tanto en crecimiento, como en la disminución de la cantidad de bacterias totales en los camarones cultivados a baja salinidad, ya que en la dieta experimental se adiciono junto a las enzimas bacterias probióticas.

## **9. CONCLUSIONES**

Los tratamientos aplicados demostraron, que la mezcla de enzimas digestivas es más eficiente que los ácidos biliares para mejorar la digestibilidad de los alimentos balanceados, y por ende promover el crecimiento de los camarones, sin embargo no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control. Es decir que las enzimas digestivas actúan de mejor manera que los ácidos biliares en relación al aumento de la biomasa, cuya diferencia no es significativa.

Las enzimas digestivas tuvieron un mejor efecto sobre la carga bacteriana de los camarones, reduciendo de manera considerable la cantidad de bacterias totales en comparación con los ácidos biliares y el control. En este caso si se existen diferencias estadísticas entre la cantidad de bacterias totales en los camarones alimentados con suplementos de enzimas digestivas con respecto a los animales alimentados con una dieta normal.

## **10. RECOMENDACIONES**

- Realizar pruebas aplicando diferentes dosificaciones y estudiar el efecto tanto de enzimas digestivas como de ácidos biliares en el crecimiento del camarón.
- Aplicar bacterias probióticas en el alimento balanceado para promover la producción de enzimas digestivas que mejoren el proceso de síntesis de nutrientes.
- Estudiar el efecto de ácidos biliares y de enzimas digestivas en cultivos de camarón a diferentes salinidades.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, D., Maridueña, M., Ching, C., & Pérez, O. (2019). Métodos de producción en el cultivo intensivo de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*) en baja salinidad, una opción para familias emprendedoras. *Revista Ciencia & Tecnología*, 19(23), 35-40.
- Alanes, L. (2020). Alimentación y nutrición en peces de agua dulce. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 4(2), 604-608.
- Alvarado, C. (2021). *EFECTO DE HARINA DE PESCADO PRETRATADA CON PAPAYA Y PIÑA EN EL CRECIMIENTO DE ALEVINES DE GAMITANA Colossoma macropomum*. Universidad Nacional Federico Villarreal , Lima.
- Ayala, E. (2014). *Efecto de la Inclusión de Harina de Langostilla (Pleuroncodes planipes) en el Alimento sobre la Expresión y Actividad Enzimática Digestiva en el Intestino del Camarón Blanco (Litopenaeus vannamei)*. La Paz - Baja California: Centro de Investigaciones Biológicas del NOROESTE, S.C.
- Barrandeguy, B. (2009). *OBTENCION DE UN PRODUCTO COMERCIAL EN BASE A BETAINA, PARA SER USADO COMO OSMOREGULADOR EN DIETAS DE ESPECIES ACUATICAS*. Chile: Fondef. Obtenido de <http://repositorio.anid.cl/bitstream/handle/10533/113202/D05I10169.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barreto, A. (2020). *EFECTO DE LA SALINIDAD Y DIETAS SIN HARINA DE PESCADO SOBRE LA FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y CRECIMIENTO EN EL CAMARÓN BLANCO Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931)CAMARÓN BLANCO Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931) CULTIVADOS EN BIOFLOC*. Xalisco, Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit.
- Benitez, A. (2018). *Valor nutricional de subproductos de origen marino en alimentos para juveniles de Jurel Seriola rivoliana (Valenciennes, 1833)*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur.
- Carranza, E., Velásquez, R., & Rivas , A. (junio de 2018). Análisis de la proteína hidrolizada extraída del tejido de la curvinay la tilapia en el alimento del camarón. *Ciencia y tecnología*(22).
- Ching, C. (2014). Manejo del cultivo de camarón en agua de baja salinidad. *Nicovita-Alicorp*. Ecuador.
- Cota, M. (2020). *Genes asociados al crecimiento compensatorio en el camarón blanco del Pacífico Penaeus vanamei*. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Craig, S. (2017). Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. *Virginia Cooperative Extension*(420-256), 1-6.

- Dai, W.-F., Zhang, J.-J., Qiu, Q., Chen, J., Yang, W., Ni, S., & Xiong, J.-B. (2018). Starvation stress affects the interplay among shrimp gut microbiota, digestion and immune activities. *Fish and Shellfish Immunology*. doi:10.1016/j.fsi.2018.05.040
- Gadelha, F., Dos Santos, L., Cavalcante, D., & Do Carmo, M. (2020). Ionic balance of water and physical-chemical properties of soil from marine shrimp farms of the Jaguaruna interior county, Ceará, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*, 21.
- García, B. (2021). *VIABILIDAD NUTRICIONAL DE LA HARINA DE CABEZA DE CAMARON EN REEMPLAZO DE HARINA DE PESCADO EN DIETAS PARA LITOPENAEUS VANNAMEI*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- García, T., & Carillo, O. (2010). *Nutrición del camarón blanco Litopenaeus schmitti*. La Habana: Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana.
- García, T., & Carillo, O. (2015). NUTRICIÓN DEL CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus schmitti* Burkenroad: 25 AÑOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. *Revista Investigaciones Marinas*.
- Guerrero, I., Rosmini, M., & Amenta, R. (2018). *Utilización de pescado y mariscos: Tecnología e Innovación*. México: Editorial académica española.
- Hanna, W. (2020). *LÍPIDOS DE ORIGEN ANIMAL PRESENTES EN DIETAS ALIMENTICIAS Y SU INCIDENCIA EN EL ENGORDE Y CRECIMIENTO DEL CAMARON LITOPENAEUS VANNAMEI*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Jin, M., Pan, T., Cheng, X., Zhu, T.-T., Sun, P., Zhou, F., . . . Zhou, Q. (2019). Effects of supplemental dietary l-carnitine and bile acids on growth performance, antioxidant and immune ability, histopathological changes and inflammatory response in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed high-fat diet. *ELSEVIER*, 504, 199-209.
- Kumar, R., Hann, T., Chan, C.-C., Tung, T.-C., Lin, S.-S., Lo, C.-F., & Wang, H.-C. (2019). Bile acid and bile acid transporters are involved in the pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Cellular Microbiology*, 22(1).
- Lera Santín, A. (2011). *APLICACIONES ENZIMÁTICAS EN PROCESOS DE CONSERVACIÓN Y RESTAURACIÓN DE OBRAS DE ARTE. CONSOLIDACIÓN DE CELULOSA*. Universidad del país vasco, España.
- Liao, Z., Sun, B., Zhang, Q., Jia, L., Wei, Y., Liang, M., & Xu, H. (2020). Dietary bile acids regulate the hepatic lipid homeostasis in tiger puffer fed normal or high-lipid diets. *ELSEVIER*(734935). doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734935
- López, W. (2020). *APLICACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO AISLADAS DE CAMARONES SILVESTRES LITOPENAEUS VANNAMEI COMO UNA MEDIDA PROFILÁCTICA PARA CONTROLAR LA VIBRIOSIS*. Universidad Técnica de Machala, Machala.
- Maytorena, C. (2011). *Efecto de solventes orgánicos y temperatura en la actividad enzimática de las lipasas difestivas e intracelular de Penaeus vannamei*. La paz.

- Mercado, J. (2016). *Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo ontogénico de larvas de botete diana (Spherooides annulatus) alimentados con diferentes protocolos*. Universidad Autónoma de Baja California, Baja California.
- Merino, M. (2018). *FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES DE SARGO Archosargus probatocephalus (PERCIFORMES: SPARIDAE)*. Boca del Río - Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Molinos Champion S.A.S. (18 de Diciembre de 2020). *Relevancia del balance iónico para la cría de camarones*. Obtenido de Molinos Champion S.A.S: <https://www.molinoschampion.com/relevancia-del-balance-ionico-para-la-cria-de-camarones/>
- Montiel, A. (2018). *Variación del contenido de lípidos en la hemolinfa del camarón blanco Litopenaeus vannamei como respuesta al tratamiento con rCHH-B2*. Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Muñoz, J., Zambrano, M., Párraga, R., & Verduga, C. (2019). Uso de papaína y bromelina y su efecto en las características organolépticas y bromatológicas de chuletas de cerdo ahumadas. *RECUS*, 4(2), 38-42.
- Pacheco, J., Cadena, M., Leyva, J., Zavala, O., Pérez, E., & Ruiz, J. (2018). Effect of isolated bacteria and microalgae on the biofloc characteristics in the Pacific white shrimp culture. *ELSEVIER*, 11, 24-30.
- Parra, A. M. (2020). *Estudio del crecimiento, preferencia alimentaria y digestibilidad de ingredientes vegetales y animales del langostino Macrobrachium americanum (Decapoda: Caridea: Palaemonidae)*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT, Xalisco, Nayarit.
- Párraga, A., & Parrales, V. (2020). *EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE HARINA Amaranthus dubius SOBRE LA CONVERSIÓN ALIMENTICIA DEL CAMARÓN DE BAJA SALINIDAD EN ETAPA POSTLARVA*. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ, Calceta.
- Rueda, D. (2018). *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO "PENAEUS VANNAMEI" A BASE DE DIETAS CON NIVELES ALTOS DE VITAMINAS, NUCLEÓTIDOS Y B-GLUCANOS*. Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Ruvalcaba, J. C. (2021). *Sustratos energéticos, relaciones carbohidratos:proteína y lípido:proteína en la dieta de Litopenaeus vannamei con relación al desempeño acuícola, capacidad inmune y antioxidante*. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
- Saraswathy, R., Muralidhar, M., Balasubramanian, C., Rajesh, R., Sukumaran, S., Kumararaja, P., . . . Kizhakedath, K. (2020). Osmo-ionic regulation in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, exposed to climate change-induced low salinities. *Aquaculture Research*, 1-12.

- Senmache, N., & Reyes, W. (2020). EFECTO DE DIETAS CON ZEOLITA NATURAL EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DEL CAMARÓN DE RÍO *Cryphiops caementarius*. *Revista de Investigación Científica REBIOL*, 40(1), 30-38.
- Sirvas, S., Jones, D., & Latchford, J. (2005). Efecto de dietas micro-encapsuladas suplementadas con enzimas digestivas, sobre el desarrollo de post-larva de *Fenneropenaeus indicus*. En J. Renno, C. García, F. Duponchelle, & J. Nuñez, *Biología de las poblaciones de peces de la amazonía y piscicultura*. Lima.
- Su, C., Li, J., Lu, Y., Wang, Y., Ding, Y., Pan, L., & Zhang, M. (2022). Interactive effects of dietary cholesterol and bile acids on the growth, lipid metabolism, immune response and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*: Sparing effect of bile acids on cholesterol in shrimp diets. *ELSEIVER*, 547.
- Su, C., Liu, X., Li, J., Zhang, M., Pan, L., Lu, Y., . . . Ding, Y. (2021). Effects of bile acids on the growth performance, lipid metabolism, non-specific immunity and intestinal microbiota of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 27(6), 2029-2041.
- Toledo, A., Castillo, N., Carrillo, O., & Arenal, A. (2018). Probióticos: una realidad en el cultivo de camarones. *Revista de Producción Animal*, 30(2).
- Wan, Y., Al Farraj, D., Vijayaraghavan, P., Hatamleh, A., Devadhasan, G., & Mostafa, A. (2020). Host associated mixed probiotic bacteria induced digestive enzymes in the gut of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 2479-2484. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.010>
- Zhao, A. (2021). *Cómo los ácidos biliares protegen el hepatopáncreas de los camarones*. Lachance. Obtenido de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/articulos-separado-lachance-t47070.htm>
- Zheng, C., & Wang, W. (2016). Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 48(6), 2767-2777.



## 12. ANEXOS



Obtención de juveniles de camarón blanco (*P. vannamei*)



Aclimatación de juveniles de *P. vannamei*.



Preparación de las unidades experimentales con sus respectivos tratamientos.



Calculo de la biomasa de cada tratamiento



Mezcla de enzimas digestivas naturales



Extracción de bilis (ácidos biliares) de tilapia (*Oreochromis sp.*)





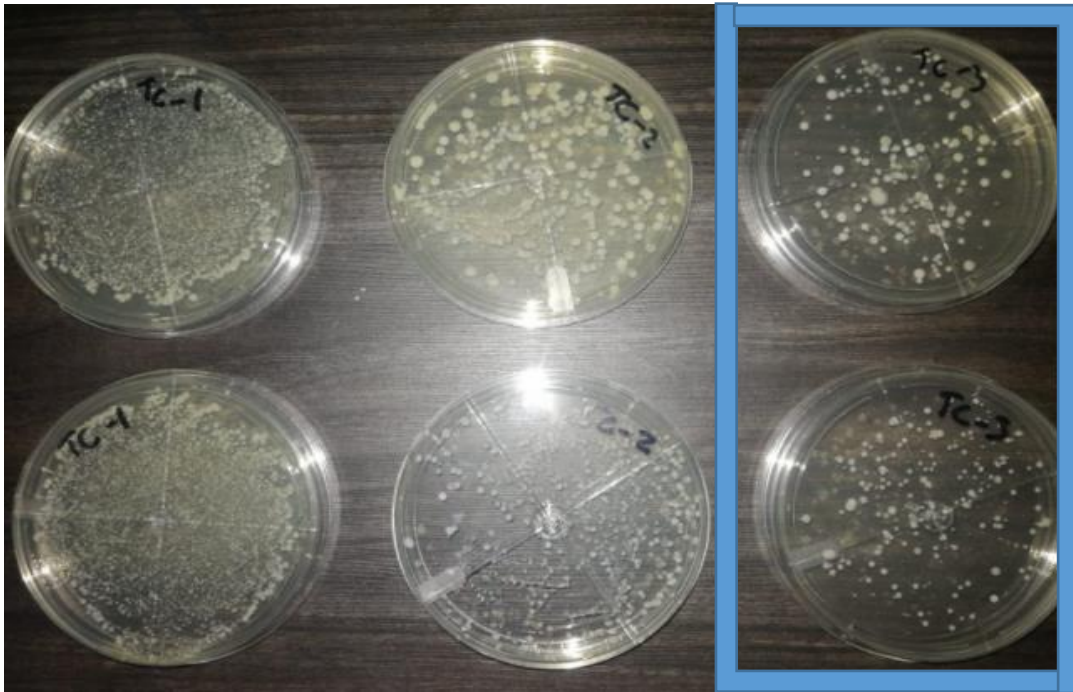
Preparación de alimento de acuerdo a cada tratamiento; TC (control), T1 (ácidos biliares) y T2 (enzimas digestivas).



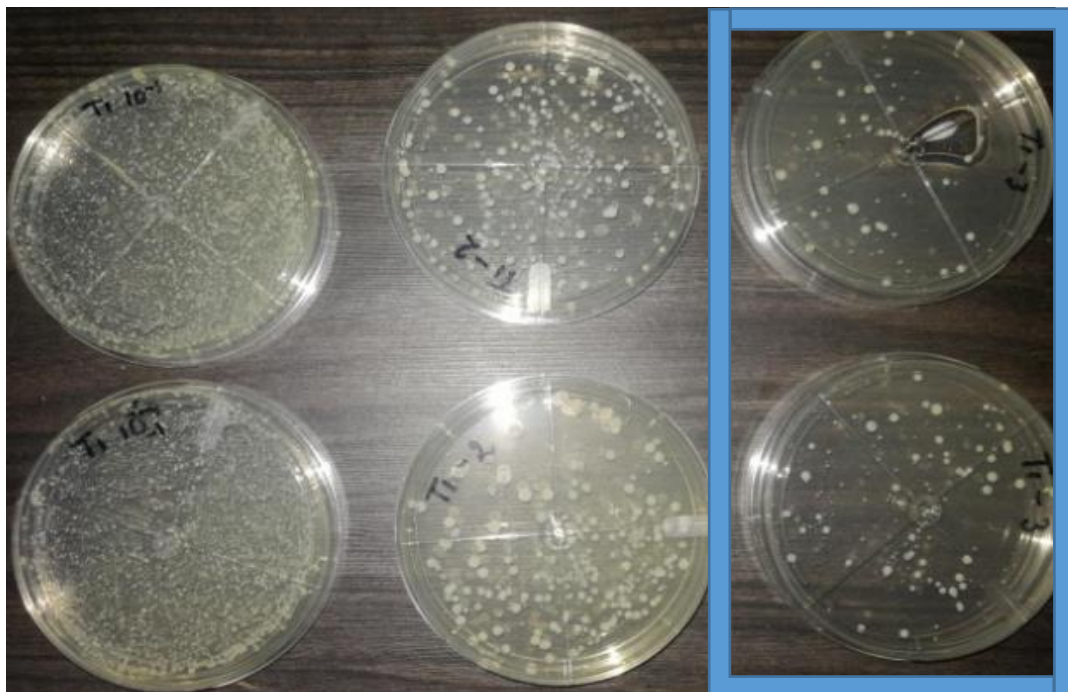
Preparación de medio de cultivo: AGAR NUTRITIVO



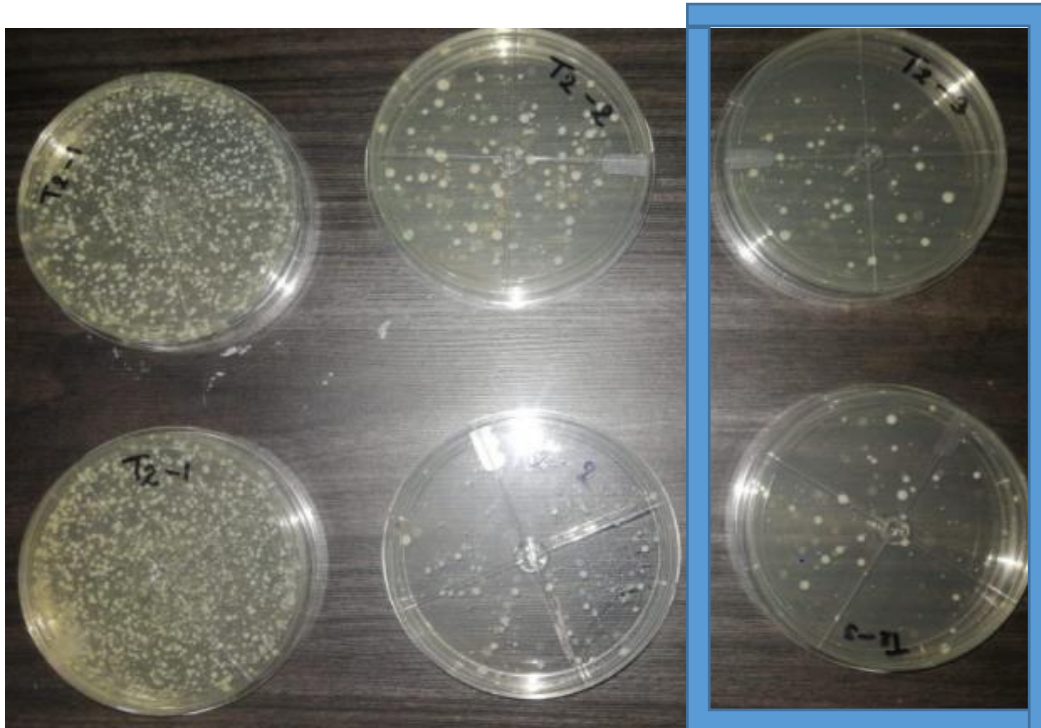
Siembra de hepatopáncreas en el medio de cultivo.



TC (control). Carga bacteriana en camarones (*P. vannamei*), después de 24 horas de incubación



T1 (ácidos biliares). Carga bacteriana en camarones (*P. vannamei*), después de 24 horas de incubación



T2 (enzimas digestivas). Carga bacteriana en camarones (*P. vannamei*), después de 24 horas de incubación

$10^{-3}$