



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>



Incorporación de bacterias ácido lácticas nativas como probióticos en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) en la camaronera “Las Ánimas”, El Salvador

Incorporation of native lactic acid bacteria as probiotics in the white shrimp culture *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) in the shrimp farm “Las Ánimas”, El Salvador

Luis Miguel Delgado-Díaz¹, Napoleón Edgardo Paz-Quevedo², Norma Esthela Molina-Velásquez³, Armando Navarrete-Soriano⁴

RESUMEN

La investigación se realizó en la camaronera “Las Ánimas”, ubicada en cantón Ánimas Abajo, Zacatecoluca, La Paz, El Salvador, durante agosto 2016 a septiembre 2017. El objetivo principal fue la búsqueda de alternativas que generen una reducción de costos en la producción de camarón, así como el mejoramiento de las condiciones del medio ambiente en la zona del estudio de manera eficiente. Se realizó en dos fases, la primera consistió en trabajo de laboratorio, comenzó con la recolección de muestras de camarones de cuatro estanques de dicha granja, con el propósito de aislar cepas nativas de *Lactobacillus*. se obtuvieron 40 cepas, de las que se seleccionaron cuatro para realizarles, pruebas de factibilidad probiótica, al final dos cepas que cumplieron todos los requisitos como probióticos, estas son las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus paracasei* (E91) y *Lactococcus lactis* (E33). La segunda fase implicó trabajo de campo, donde se evaluó el probiótico a base de las bacterias ácido lácticas nativas aisladas contra un probiótico comercial EPICIN® G2. Se configuraron cuatro tratamientos de los cuales dos contenían las bacterias nativas más el biorremediador EPICIN® PST y dos con el probiótico comercial más el EPICIN® PST. Los resultados de los tratamientos conformados por bacterias ácido lácticas más EPICIN® PST, presentaron un menor deterioro de los parámetros del agua. Aunque las aguas se clasificaron como pobres, según el ICA (Índice de Calidad del Agua), los probióticos nativos presentaron poca variabilidad entre sus constantes; este dato fue concordante con el análisis del Índice de Estado Trófico (TRIX por sus siglas en inglés), que clasifica las aguas del estero como Hipertróficas. En los parámetros productivos los tratamientos con bacterias ácido lácticas generaron

1 Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.
luismiguel4123@hotmail.com

2 Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.

3 Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

4 Laboratorio de Microbiología, MEGATEC La Unión.

mayor eficiencia, ya que la sobrevivencia para los tratamientos T3 y T4 fue de 47.56% y 45.68%, superando a los tratamientos control T1 y T2 con 44.57% y 38.97%, al igual que en la sobrevivencia de los estanques con bacterias nativas, se tuvo mayor eficiencia en cuanto al rendimiento en la producción, ya que los T3 y T4 presentaron un rendimiento de 6,806.36 kg y 5,414.55 kg, mientras que T1 y T2 registraron un rendimiento de 5,544.09 kg y 5,387.27 kg. Al mismo tiempo se realizó un análisis de beneficio-costos el cual demostró que utilizar bacterias ácido lácticas como probióticos, se produce una reducción en costos operativos, ya que los T3 y T4 producen un egreso de USD\$62,614.63 y USD\$55,481.78 contra los egresos de los T1 y T2 que fueron de USD\$94,105.33 y USD\$74,456.95; indicando que para los T3 y T4 se realizó un retorno de USD\$1.39 y USD\$1.25 por cada dólar invertido, mientras que los T1 y T2 dejaron un retorno de USD\$1.10 y USD\$1.15 por cada dólar invertido. Con lo anterior, se concluye que *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus paracasei* aisladas del tubo digestivo de los camarones cultivados en la granja, están dentro de la lista de bacterias que se pueden utilizar como probióticos en el cultivo de camarones en estanques y se recomienda la presente metodología para mejorar la producción de granjas camaroneras en armonía con el medio ambiente.

Palabras claves: camarón blanco, Bacterias Ácido Lácticas, Probiótico, Biorremediador, Bacterias nativas, *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*.

ABSTRACT

The research was carried out in the Las Ánimas shrimp farm located in Canton Ánimas Abajo, Zacatecoluca, La Paz, El Salvador, from August 2016 to September 2017. The fundamental objective was the search for alternatives that generate a reduction of costs in the production of shrimp, as well as the improvement of environmental conditions in the study area in an efficient manner. It was carried out in two phases, the first laboratory phase, began with the collection of shrimp samples from four ponds of said farm, with the purpose of isolating native strains of *Lactobacillus*, obtaining 40 strains, of these four were selected, performing tests of probiotic feasibility, achieving at the end two strains that fulfilled all the requirements as probiotics, being these the lactic acid bacteria *Lactobacillus paracasei* (E91) and *Lactococcus lactis* (E33). The second was a field phase, where the probiotic was evaluated based on native lactic acid bacteria isolated against a commercial probiotic EPICIN® G2. Four treatments were configured, of which two contained the native bacteria plus the EPICIN® PST bioremediator and two with the commercial probiotic plus the EPICIN® PST, the results of the treatments formed by lactic acid bacteria plus EPICIN® PST presented a lower deterioration of water parameters, Although the waters were classified as poor according to the ICA (Water Quality Index), the native probiotics showed little variability between their constants, this data was concordant with the analysis of the Trophic Status Index (TRIX for its acronym in English), that the waters of the estuary according to this index are classified as Hypertrophic. In the productive parameters the treatments with lactic acid bacteria generated greater efficiency, since the survival for the treatments T3 and T4 is of 47.56% and 45.68%, surpassing the control treatments T1 and T2 with 44.57% and 38.97%, as well as In the survival of the ponds with native bacteria, there was greater efficiency in terms of production yield, since the T3 and T4 showed a yield of 6,806.36 kg and 5,414.55 kg, while T1 and T2 recorded a yield of 5,544.09 kg and 5,387.27 kg. At the same time, a cost benefit analysis was carried out which showed that when using the lactic acid bacteria as probiotics, a reduction in operating costs is produced, since the T3 and T4 produce an outflow of \$ 62,614.63 and \$ 55,481.78 against the outflows of the T1 and T2 which was \$ 94,105.33 and \$ 74,456.95; indicating that for T3 and T4 a return of \$ 1.39 was made and \$ 1.25 for each dollar invested, while the T1 and T2 were made a rebound of \$ 1.10 and \$ 1.15 for each dollar invested. Therefore, it is concluded that *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* isolated from the digestive tract of farmed shrimps are among the list of bacteria that can be used as probiotics in shrimp culture in ponds and this methodology is recommended to improve the production of shrimp farms in harmony with the environment.

Keywords: White shrimp, Bacteria Lactic acid, Probiotic, Bioremediator, Native bacteria, *Lactobacillus paracasei* and *Lactococcus lactis*.

INTRODUCCIÓN

En camaronicultura no existen productos químicos o medicamentos para tratar las infecciones una vez que los estanques han sido invadidos por virus, pero un buen manejo del estanque, agua, alimentos y las condiciones de salud de la población, pueden reducir su virulencia. En algunos casos, se han empleado antibióticos y otros fármacos para el tratamiento (FAO 2006). Una alternativa utilizada con éxito para el control de enfermedades del camarón es el uso de los probióticos. Este conjunto de microorganismos y/o sustancias contribuyen al balance de la flora benéfica del individuo, al bienestar y salud de los organismos. Tienen la capacidad de competir contra bacterias patógenas tanto en el medio, como en el interior y exterior del individuo y de degradar metabolitos tóxicos y materia orgánica¹. Dentro de los probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas que es uno de los grupos más estudiados por sus beneficios en los tratamientos causados por los trastornos de la microflora intestinal. Estas bacterias están clasificadas dentro del grupo de las bacterias Gram positiva, generalmente tienen movilidad y no son formadoras de endoesporas, producen ácido láctico. Algunos miembros de este grupo contienen bastones como los *Lactobacillus*, que junto con *Streptococcus*, *Carnobacter*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*, están adaptadas a crecer bajo diferentes condiciones ambientales (Chávez 2008).

En la acuicultura, la aplicación de probióticos, no solo está asociada con la salud del intestino, sino también con la biorremediación que es un proceso que utiliza las habilidades catalíticas de microorganismos vivos para un aumento de la velocidad en la extensión de la destrucción

de contaminantes. Las comunidades naturales pueden no ser capaces de llevar a cabo los procesos de biodegradación a la velocidad deseada, debido a factores físicos o nutricionales limitantes. Salazar 2013, expresa que mejora el medio ambiente (agua y suelo) en el que se crían los animales. Los efectos de las cepas de biodegradación (como las *Bacillus* spp., *Paracoccus* spp., *Thiobacillus* spp.) que se añaden directamente al agua, implican la modulación del perfil microbiológico de los estanques, la degradación de los residuos indeseables (amoníaco, nitrito, sulfuro de hidrógeno), mejora la mineralización de la materia orgánica, disminuye las condiciones anaeróbicas en el suelo del estanque y reduce la acumulación de lodos (Aquafeed 2013).

La importancia de la investigación fue la búsqueda de métodos más amigables con el medio ambiente, como la aplicación de probióticos, un procedimiento de gran versatilidad y de grandes beneficios ampliamente aceptado en la producción de camarón a nivel mundial. Los probióticos son capaces de controlar patógenos por múltiples mecanismos, promover el crecimiento del hospedero, mejorar la calidad del agua y reducir los contaminantes producidos por el cultivo de camarón. Adicionalmente pueden ser administrados por el alimento y el agua en combinación con otras sustancias beneficiosas.

La investigación provee una actualización sobre la aplicación de probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas, con énfasis en la influencia del incremento de la productividad y los beneficios ambientales con la mejora de la calidad del agua.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación

El presente estudio se desarrolló de agosto

¹ XII Jornada de actualización científica en acuicultura.12, 2015. Cholulteca.2015.Probioticos: mecanismos de acción y uso en cultivo de camarón. Cholulteca, HN.43.p.

2016 a septiembre 2017 en la camaronera “Las Ánimas”, ubicada en el cantón Ánimas Abajo, jurisdicción de Zacatecoluca, departamento de La Paz, El Salvador, a 5 msnm con coordenadas latitud norte 13°21'38.26'', longitud oeste 88°51'11.57''. Las características del terreno tienen una topografía plana, la textura del suelo está compuesta de arcilla, arena fina y en menor grado materia orgánica, suelos del tipo Grumosoles (Vertisoles) que son aquellos de arcillas negras, con un alto poder de contracción y dilatación. En la época seca, se rajan y se cuartejan. En estos suelos los minerales están en sus primeros 18 cm, por lo general mezclados de este límite a un metro de profundidad, teniendo un contenido de arcilla superior a 30% (Rico 1974; MAG 2012). El área de los estanques es: # 10: 32,377 m² o 3.24 ha, #11: 25,567 m² o 2.56 ha, # 12: 21,116 m² o 2.11 ha y #13: 23,442 m² o 2.34 ha, haciendo un área total de 102,502 m² o 10.25 ha, presentando una profundidad de 1.5 m.

Metodología de campo

Previo a preparar los estanques para la siembra, se le aplicó a cada uno 300 gr de EPICIN®PST.

Preparación de los estanques para la siembra

Se utilizó una densidad de siembra de 55 post-larvas/m² para cada uno de los cuatro estanques, haciendo un total de 5,637,610 post-larvas. Se realizó el proceso de aclimatación, el que consistió en medir las constantes de temperatura y salinidad para no afectar a las post-larvas. Seguidamente se realizó la siembra a los estanques por medio del método de la manguera. A partir de la siembra se realizó un muestreo de sobrevivencia, que consistió en un conteo de post-larvas en cajas de muestreo, sobrevivientes después de un período de dos días de sembradas, a partir de una muestra determinada. Obteniendo los valores de 88.33% para el T1, 93.33% para el T2, 83.33% para T3 y

90% para el T4.

Preparación y Aplicación de EPICIN G2

La preparación del EPICIN G2, consistió en incorporar 100 gr del probiótico comercial a 45.45 kg del concentrado (marca MOR al 35% de contenido proteico), se mezcló homogéneamente en una tolva. Su aplicación se realizó al voleo, con una frecuencia de aplicación de cinco días, mediante una lancha con motor fuera de borda de cinco caballos de fuerza.

Aplicación del EPICIN PST y el probiótico a base de bacterias ácido lácticas nativas

EPICIN PST: volumen del masivo en 1,000 litros por estanque, con 16 horas de incubación, aplicado al voleo, utilizando una lancha con motor fuera de borda de 5 hp y frecuencia de aplicación cada dos días

Probiótico a base de bacterias ácido lácticas nativas.

En el agua: volumen del masivo: 2 tinacos de 750 litros (1,500 litros por estanque), con 16 horas de incubación, aplicado al voleo, utilizando una Lancha con motor fuera de borda de 5 hp y frecuencia de aplicación: cada cinco días.

En el alimento: adicionalmente se utilizó 2.5 litros de inóculo de cepa de bacterias ácido lácticas por separado (según el tratamiento designado) por 1.0 quintal del concentrado de la marca MOR® al 35% de contenido proteico, mezclándolo homogéneamente y aplicándolo al voleo por todo el estanque y la frecuencia de aplicación para cada uno de los estanques utilizados en el estudio fue cada 5 días.

Metodología para la cuantificación de los parámetros productivos.

Para determinar el peso se utilizó el cuadro general de datos, que se utiliza en la camaronera “Las Ánimas” partiendo del conocimiento de la cantidad de camarones

sembrados en cada estanque, se extrajeron muestras “al azar” utilizando atarrayas de 1.0 m² de diámetro, se realizó cada siete días y los resultados se presentan en gramos.

Densidad de siembra: con una cantidad de 55 camarones por metro cuadrado.

Pesaje: se utilizaron en una báscula portátil, un recipiente para colocar los camarones, cubeta y una atarraya. Luego se anotó el número de estanque y la cantidad de post-larva sembrada, las fechas de siembra y muestreo, así como los días de cultivo, calculados de la diferencia entre la fecha de muestreo y de siembra, sin contar el día que se sembró la larva. Se colocó agua del estanque en la cubeta, con la atarraya se capturaron los camarones y se transfirieron a una cubeta con agua, luego se depositaron los camarones en el recipiente; se pesaron, se anotó su peso bruto (PB) y cantidad de unidades; se pesó el recipiente con agua: Tara (T), la resta del peso bruto (PB) y la tara (T) es el peso neto (PN). El peso neto (PN), se dividió entre el número de camarones para obtener el peso de camarón (PC), se realizaron cuatro repeticiones por estanque.

Población y porcentaje de sobrevivencia: se utilizó la técnica del transepto que consiste en trazar una línea transversal en el estanque, realizando diez lances con una atarraya de 2.0 m² de diámetro. En cada lance se contabilizaron los camarones, al finalizar el muestreo se sumaron todos los camarones de los lances.

Biomasa: se determinó utilizando la fórmula: $(P \times PS / 454 \text{ g} / 2.2 \text{ lb})$, donde P: población, PS: peso semanal en gramos entre 454 gramos para obtenerlo en libras y entre 2.2 libras para obtenerlo en kilogramos.

Factor de conversión: fórmula: $(PC \times A)$, donde PC: peso de camarón y A: alimento abastecido. El rango que se utilizó esta entre 1.1 a 1.3 para el estudio.

Rendimiento: fórmula: $(c \times UA)$, donde c:

cantidad de camarón producido y UA: unidad de área.

Metodología de laboratorio

Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Las muestras de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) utilizadas fueron recolectadas en la camaronera “Las Ánimas”, la cual posee 13 estanques de cultivo de los que se seleccionaron cuatro: Estanque tres, siete, nueve y diez, porque cumplen con el criterio de alta producción, lo que genera mayor probabilidad de encontrar bacterias ácido lácticas; al mismo tiempo estos estanques contaban con una alta presencia del pez Sambo (*Dormitator latifrons*), que es una especie detritívora importante de los ecosistemas acuáticos, porque contribuye a la descomposición y reciclado de los nutrientes y las bacterias ácido lácticas resisten al paso por su tracto digestivo.

Se recolectaron 60 camarones en total, 15 de cada uno de los cuatro estanques en muestras debidamente identificadas con el número de estanque, fecha y hora de recolección, y persona recolectora, luego se almacenaron en hielera para trasladarlos al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Para el aislamiento de los Lactobacilos, se utilizaron 10 camarones vivos de la muestra de cada estanque, se pesaron en una balanza semianalítica, luego se desinfectó con alcohol isopropílico, se extrajo el tubo digestivo con ayuda de tijeras y pinzas estériles, se colocó en tubo cónico estéril de 1 ml, debidamente tarado, seguidamente se pesó. Se le agregó 1.0 ml de solución salina y se maceraron. El proceso se repitió para cada una de las muestras, comenzando con E3 y así sucesivamente para el E7, E9 y E10. Se pipeteó 0.1 ml del macerado y se colocó en el centro de una Placa de Petri que contenía 20 ml de Agar RMS solidificado

y luego se procedió a extenderlo con una asa de Digralssky estéril, finalmente se incubó a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Morfología macroscópica de los lactobacilos.

Después del periodo de incubación se observaron las colonias formadas en el medio de Agar RMS y se compararon con las establecidas en el Manual de Merck (The MERCK group s.f.).

Morfología microscópica y pruebas para confirmar presencia de lactobacilos

Tinción de Gram: De las colonias puntiformes color azul en medio de RMS, se tomó con una asa estéril una porción de la colonia y se suspendió en una gota de solución salina en una lámina portaobjeto, se fijó al calor y se dejó secar, luego se realizó la tinción de Gram, se enfocó en el microscopio hasta llegar al 100X, con ayuda de aceite de inmersión. Prueba de catalasa y oxidasa: De las colonias puntiformes se sembraron en Agar Tripticosa Soya y se incubaron a temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Prueba de catalasa: Después del periodo de incubación se coloraron dos gotas de peróxido de hidrogeno H_2O_2 en una lámina portaobjeto limpia y luego con un palillo de madera estéril se recolectó una porción de una colonia y se emulsionó en las gotas de H_2O_2 , la ausencia de burbujeo confirma la presencia del Lactobacilo. Prueba de oxidasa: Después del periodo de incubación se seleccionó una colonia y se impregnó la tira que contiene el reactivo de Kovac en la colonia, la ausencia de coloración púrpura en la tira confirma la presencia del Lactobacilo.

Parámetros químicos

Los análisis químicos se realizaron en el laboratorio Físicoquímico de aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, con la metodología establecida en agua y aguas de desechos APHA (1992).

Las pruebas realizadas se detallan a

continuación: 4500- P Fósforo total: 4500- P C. Método colorímetro del ácido vanadomolibdofosforico, determinación de fosfatos en aguas por espectrofotometría -4500 Norg Nitrógeno total: 4500 Norg B. Método macro Kjeldahl, 4500 NH_3 Amonio: 4500 NH_3 F Método Fenato, 4500 NO_3^- Nitrato: 4500 NO_3^- B. Método espectrométrico ultravioleta selectivo, 2340 DUREZA: 2340 C. Método título métrico de EDTA, 4500- Si SILICE: 4500 -Si D. Método colorímetro del complejo azul, 4500 NO_2^- Nitrógeno (nitrito): 4500 NO_2^- B. Método Colorimétrico y 2320 Alcalinidad: 2320 B. Método de titulación.

Parámetros Microbiológicos

Para los análisis microbiológicos se utilizó la metodología establecida por APHA (1992), y se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y en el Laboratorio de Microbiología del MEGATEC - La Unión.

Las pruebas de identificación de *Vibrios* realizando el análisis en fresco (Morales 2010). Para el estudio se usó el 20% de prevalencia (es el número de individuos de una especie de huésped infectada con una especie particular de parásito/número de huéspedes examinados (Margolis, *et al.* (1982), citado por Morales 2010)). Se realizó identificación y cuantificación de *Vibrio spp.* en la hemolinfa y del hepatopáncreas de los camarones blancos vivos. Los resultados obtenidos de las placas bacterianas en agar TCBS provenientes del hemolinfa (UFC/ml) y el hepatopáncreas (UFC/g) de cada uno de los camarones se interpretó haciendo uso de la tabla de referencia para el mismo propósito que establece (Gómez, citado por Cuellar *et al.* (2010)). Los resultados obtenidos de la bacteriología, se sometieron a interpretación auxiliándose de los datos obtenidos del análisis en fresco, ya que con esta técnica se puede evaluar y cuantificar el posible daño estructural que el organismo pueda presentar y más

específicamente en cuanto al daño tubular hepático. Se utilizó la tabla de evaluación cualitativa del grado de severidad de daño tubular hepático (Morales 2013). El análisis en fresco se realizó dos veces durante el transcurso de la investigación.

Las pruebas realizadas se presentan a continuación: 9260. H. *Vibrio cholerae*, 9213. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*, 9213. F. Técnica de tubos múltiples para *Pseudomonas aeruginosa*, 9215, recuento heterótrofo de placa: 9215 B. Método de placa fluida, metodología de bacteriología para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* spp., sometidas a los antibióticos: prueba de Kirby-Bauer y la metodología de bacteriología, para el aislamiento, identificación y cuantificación de bacterias del género *Vibrio* spp.

Parámetros Biológicos

Para medir la clorofila "a", se utilizó la metodología de Strinckland y Parson (1972), la cual fue citada y modificada de Navarrete (2015), se usó un equipo de filtración, para trabajar sin luz solar y así proteger la muestra. Se conservó la muestra con hielo y se filtró con ayuda de bomba de vacío, homogenizando cada vez que se agregó al filtro. La cantidad dependió de la capacidad de saturación del filtro; la membrana doblada se colocó en papel aluminio debidamente etiquetada, luego se midió el volumen de agua filtrado, transfiriéndolo a bolsa tipo Ziploc® y depositado en congelación por 18-24 horas. Este se realizó en el laboratorio de microbiología del MEGATEC - La Unión, El Salvador. Al mismo tiempo, se utilizó la metodología para el análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton presente en los estanques de camarón cultivado.

Análisis de datos

Los parámetros físicos, químicos, microbiológicos y productivos, se analizaron utilizando la técnica estadística descriptiva, ya que trabaja con datos numéricos concretos que sirven de base al proceso estadístico de descripción; se realizó la recolección, presentación, tabulación y análisis de resultados (Bonilla 1986). En la interpretación de los resultados, se utilizó el índice del Estado Trófico (TRIX) y el Índice de Calidad de Agua (ICA), aplicando su fórmula y comparándolo con su cuadro de interpretación. Para la recopilación de datos se aplicó el programa de Microsoft Excel 2010 ®; además, para el análisis estadístico descriptivo de los resultados, se utilizó el programa estadístico InfoStat® y para medir la diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó la prueba de T Student.

Prueba Estadística

La prueba para el análisis de resultados, se utilizó la prueba estadística de "t" de Student, donde se compararon las medias y las desviaciones estándar de grupo del datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias (Ramos 1999). La fórmula es:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Dónde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student.

\bar{X}_1 = valor promedio del grupo 1.

\bar{X}_2 = valor promedio del grupo 2.

s_p = desviación estándar ponderada de ambos grupos.

N_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

N_2 = tamaño de la muestra del grupo 1.

Ecuación para obtener la desviación estándar ponderada:

$$s_p = \sqrt{\frac{SC_1}{N_1} + \frac{SC_2}{N_2 - 2}}$$

Dónde:

s_p = desviación estándar ponderada.

SC = suma de cuadrados de cada grupo.

N = tamaño de la muestra 1 y 2.

Configuración de tratamientos y comparaciones

El Cuadro 1, muestra la configuración de los tratamientos evaluados durante la investigación.

Se realizaron las comparaciones en grupos de dos, se compararon los resultados entre los tratamientos 1-4 y tratamientos 2-3. Ya que, el objetivo de la investigación fue medir la eficiencia de los probióticos a base de bacterias ácido lácticas nativas, contra los estanques con probiótico comercial.

Las variables a las cuales se les aplicó la prueba de T Student, se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Configuración de cada tratamiento.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Estanque 10	Estanque 11	Estanque 12	Estanque 13
EPICIN PST + EPICIN G2	EPICIN PST + EPICIN G2	EPICIN PST + E91*	EPICIN PST + E33**

E91: Estanque 9, muestra 1 **E33: Estanque 3, Muestra 3.

Cuadro 2. Variables de la investigación.

Variables	Unidad	Variables	Unidad
Oxígeno disuelto	mg/l	Turbidez	cm
Porcentaje de Saturación de oxígeno	%	Salinidad	mg/l
Temperatura del agua	°C	Alcalinidad	mg/l
Ph	Log I H	Dureza	mg/l
Fósforo total	mg/l	Porcentaje de sobrevivencia	%
Fosfatos	mg/l	Población	Número de individuos
Nitrógeno Total	mg/l	Biomasa	kg
Nitratos	mg/l	Peso promedio del camarón	gr
Nitritos	mg/l	Incremento de peso	gr
Sílice	mg/l	Factor de conversión alimenticia	adimensional
Clorofila <i>a</i>	mg/m ³		

Estadística Económica

Se efectuó una relación beneficio-costos que es el cociente de dividir el valor actualizado de los beneficios del proyecto (ingresos) entre el valor actualizado de los costos (egresos) (Pérez 2009). La fórmula es: $R B/C$: valor presente de los ingresos/ valor presente de los egresos. Para el proyecto se utilizó el costo de la larva, de

la cosecha, de alimentación, pago de planilla y de combustible y los ingresos obtenidos de la venta de camarón blanco comparando dos estanques testigos con respecto a dos estanques que tenían similares condiciones, pero aplicando las bacterias ácido lácticas nativas para determinar si es rentable o no su utilización en la camaronicultura.

Análisis de dominancia

Se realizó un análisis de dominancia, para determinar el tratamiento con los mejores resultados en cuanto al análisis de la relación beneficio costo, este propuso cuál de los tratamientos es dominado por la mejor rentabilidad al final de la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización e identificación de bacterias ácido lácticas y *Vibrio* spp. a partir de intestino y hepatopáncreas (HP)

Resumen de la caracterización probiótica

Las cepas *Lactococcus lactis* (E33) y *Lactobacillus paracasei* (E91), fueron sometidas a prueba en agar sangre y el resultado fue positivo con hemólisis gamma en ambas, esto garantizó la inocuidad en las cepas y confirma que no poseen potencial nocivo, para los camarones y el ser humano. Además, estuvieron sometidas a

diversas pruebas de laboratorio, que arrojaron las siguientes propiedades: 1) amplia tolerancia a pH desde 4.0 hasta 10.0; 2) amplia tolerancia a la salinidad desde 0% a 10%; 3) no presentaron actividad proteolítica ni lipolítica extracelular; 4) alta capacidad de adhesión en pruebas *in vitro*; 5) alta actividad antimicrobiana contra *Vibrio parahaemolyticus* y aislado de hepatopáncreas de camarones de los estanques 3, 7, 9 y 10 (Cuadro 3).

Índice de Estado Trófico (TRIX, por sus siglas en inglés)

Como se observa en la Figura 1, el comportamiento del índice de estado trófico, muestra un comportamiento homogéneo en sus valores, lo cual osciló entre los valores de 9 a 10, mostrando algunos registros donde se advierten valores de 8 y 11 para el primer y tercer muestreo de entrada para el estanque 12; así como para el estanque 10 en el tercer muestreo con un valor de 11, siendo este su mayor registro.

Cuadro 3. Resultados de las pruebas *in vitro* para determinar la factibilidad probiótica de las bacterias ácido lácticas nativas sometidas a evaluación.

PRUEBAS		MUESTRAS			
		E33	E72	E91	E107
Tinción Gram		+	+	+	+
Hemolisis		γ	γ	γ	γ
Conteo UFC/ml		6.00E+08	1.00E+06	5.00E+08	6.50E+08
Tolerancia a pH		4 - 10	5 - 10	4 - 10	4 - 10
Tolerancia a salinidad		0% - 10%	0% - 6%	0% - 10%	0% - 7%
Actividad enzimática	Degradación de la caseína	NDS	NDS	NDS	NDS
	Degradación de la gelatina	NDS	NDS	NDS	NDS
	Degradación del Tween 80	NDS	NDS	NDS	NDS
Adhesión a solventes	% de adhesión a cloroformo	60.91	57.82	82.11	57.37
	% de adhesión a tolueno	70.32	52.12	65.47	59.02
	% de adhesión a xileno	55.24	35.52	54.64	45.20
Actividad antibacteriana (mm)		14.0	7.0	15.0	7.0
Identificación según API HCL50		<i>Lactococcus lactis</i> spp.	<i>Lactococcus lactis</i> spp.	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp.	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp.

Fuente: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.



Figura 1. Comportamiento del Índice de Estado Trófico para los muestreos de entrada y salida en los diferentes estanques.

Índice de Estado Trófico (TRIX) para los comparativos T1-T4 y T2-T3.

Los promedios del índice TRIX para los estanques, se encuentran con valores de T1=9.75, T2= 9.3, T3= 9.6 y T4=9.6, lo cual nos indica que las aguas son Hipertróficas, es decir altamente productivas con calidad pobre para el consumo humano. Estos datos altamente superiores a los registrados por Escobedo y Méndez (2009), para el sistema lagunar de costero (San Ignacio-Navachiste-Macupule) en México, con un valor de 5.43, mientras el análisis de los registros del Golfo de California en 2003, indican un valor de 6.2. Por otra parte, lo registrado por Murrillo *et al.* (2008), presentan un sistema lagunar costero en Chile con valores <3.0 para el TRIX, valor ampliamente inferior a lo registrado por la investigación en El Salvador; al igual que lo registrado por Barraza *et al.* (2014), con promedios en distintas granjas con valor de 4.2, 3.3 y 3.6 de índice TRIX. Además, Castillo (2013) reporta un rango de oscilación de 1 a 2.5 y Niola (2017), con un promedio de 4.2.

La diferencia del tipo de agua que el índice TRIX manifiesta en las investigaciones citadas, puede deberse a que la camaronera que se utilizó en el presente estudio, se encuentra al final de la zona manglar y ahí es donde se dirigen todas las aguas residuales provenientes de las parcelas

agrícolas de la zona, revelando el pobre estado del agua para el consumo humano.

Índice de la Calidad de Agua (ICA)

El estero de Jaltepeque, El Salvador, posee un área extensa de cuerpo de agua, y como la camaronera “Las Ánimas” se encuentra ubicada dentro de este lugar, se tomaron cuatro puntos de muestreo para determinar la calidad del agua (Figura 2). Para el cálculo del ICA se muestrearon las compuertas de entrada y salida de los estanques en estudio, determinando la calidad de agua. Este ICA permitirá reflejar las condiciones reales en que se encuentran las aguas que se utilizan para la crianza de camarones en dicha zona.

La Figura 2, el comportamiento de los valores ICA para los T1 y T4, mostraron que la calidad del agua para el T1 posee mayor variación entre el agua que entra y se desaloja al estero, generando mayor deterioro a las condiciones del agua del estero, mientras que la variación del T4 es mínima con respecto al agua que entra y se desaloja al estero.

La Figura 3, muestra la diferencia que se produce en la calidad del agua en los estanques, denotando que existe una mayor diferencia en el ICA de entrada en el T2 con el

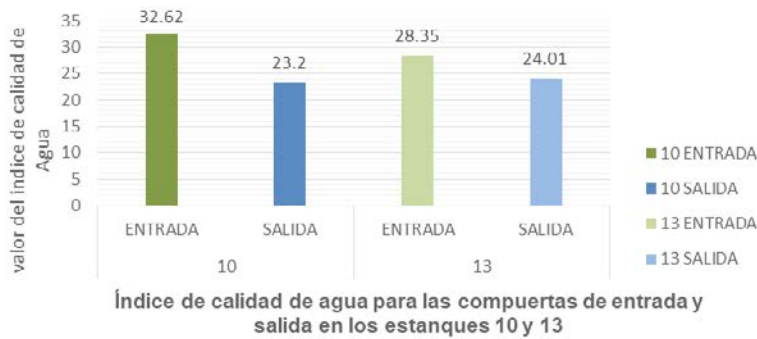


Figura 2. Comparación del valor ICA para entrada y salida en los T1 y T4.

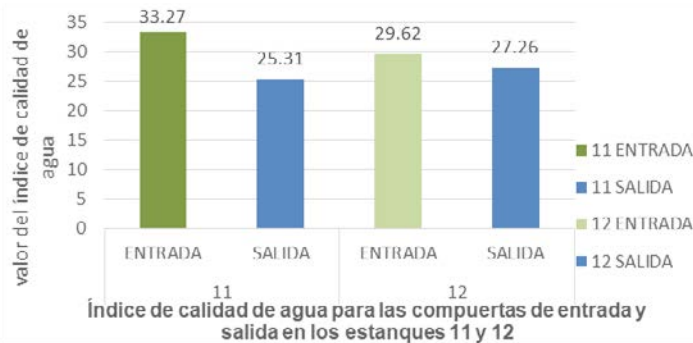


Figura 3. Comparación del valor ICA para entrada y salida en T2 y T3.

registro de salida; además se puede observar que el T3 (*Lactobacillus paracasei*) registra una variabilidad baja con respectó a ambos muestreos.

Índice de la calidad del agua general

La Figura 4, muestra que el valor ICA para el T4 es 1.76 unidades mayor por lo registrado por el T1, aunque ambos estanques clasifican sus aguas como pobres, el *Lactococcus lactis*

genera mejores condiciones en la calidad del agua.

La Figura 5, muestra el comportamiento general del valor ICA entre los T2 y T3, resultando que aunque las aguas se clasifican como pobres, el T3 genera condiciones que favorecen los parámetros de la calidad del agua, debido a la utilización de la bacteria *Lactobacillus paracasei*. Mostrando una mínima diferencia.

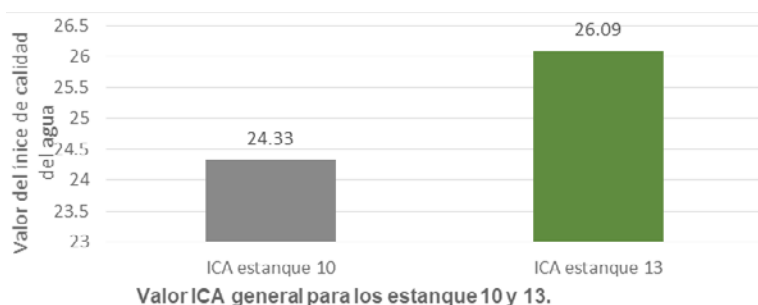


Figura 4. Comparación del valor ICA para los T1 y T4.



Figura 5. Comparación del valor ICA para los T2 y T3.

Índice de Calidad de Aguas (ICA) para los comparativos T1-T4 y T2-T3

Los valores del ICA obtenidos para los tratamientos testigos (T1 y T2) y los tratamientos con bacteria nativa (T3 y T4) registraron valores de 24.33, 29.33, 26.09 y 28.72 respectivamente, por medio de la fórmula canadiense ICA CCME y la tabla Canadian Council of the Environment 2001, las cuales clasifican las aguas de los estanques como “Pobres”, esta clasificación varía con la interpretación propuesta por el SNET y MARN, ya que ellos clasifican las aguas según la interpretación de la tabla propuesta por Lobos (2002) citado en el informe del MARN, para la clasificación de las aguas de El Salvador (MARN, s.f).

Según esta interpretación, los tratamientos T2, T3 y T4, clasifican sus aguas como “Malas”, lo que pueden indicar una diversidad baja de la vida acuática y probablemente están experimentando problemas con la contaminación (MARN, s.f.) y el T1 se clasifica como “Pésima”. De acuerdo a la información que presenta el MARN (2017), para el sitio de monitoreo del río San Antonio en el límite de los departamentos de San Vicente y La paz, El Salvador, la calidad del agua se encuentra con un valor ICA de 68, lo cual clasifica a las agua como “Regular”. Contrastando con los registros de cada estanque, por otra parte en el mismo estudio el MARN clasifica en general las

aguas de la zona del Estero de Jaltepeque, El Salvador, con calidad de agua “Mala”, generando concordancia con la información presentada por esta investigación. Según MARN-BID (2006), se clasificaron las aguas del río San Antonio, el cual es el punto de monitoreo más cercano a la granja, con un valor general del ICA para aguas superficiales de 33.35, contrastando con los valores de la investigación, los cuales muestran un deterioro de la calidad del agua con el tiempo; esto puede afirmarse con el informe presentado por el MARN (2013), el cual clasifica las aguas para el periodo comprendido entre 2012–2013 con calidad “Regular”. Se puede agregar que según el informe del MARN (2012), para Zacatecoluca, El Salvador, únicamente el 7% de las localidades de este municipio cuenta con el registro de aguas pésimas, debido a la contaminación de las zonas agrícolas y el mal manejo de los desechos.

Análisis Económico

El Cuadro 4, muestra el costo y los beneficios de campo que se consideraron para la investigación por tratamiento, generando los datos siguientes.

Cuadro 4. Costos por tratamientos en los estanques evaluados en la investigación.

Presupuesto	Estanque 10 (T1)	Estanque 11 (T2)	Estanque 12 (T3)	Estanque 13 (T4)
Camarón producido(Kg)	17,962.72	13,794.09	14,361.36	12,670.00
Beneficio bruto de campo	\$103,537.16	\$85,275.07	\$86,886.25	\$69,127.52
Costos que varían				
Epicin g2	\$27,240.00	\$21,720.00		
Epicin pst	\$769.11	\$769.11	\$769.11	\$769.11
Nupro®	\$36.53	\$36.53	\$456.92	\$456.92
Fosfato di basico	\$1.65	\$1.65	\$55.00	\$46.09
Azúcar	\$23.21	\$23.21	\$284.99	\$284.99
Tinacos	\$384.00	\$384.00	\$528.00	\$528.00
Agua destilada			\$18.65	\$18.65
Caldo rms			\$197.75	\$197.75
Sal de acuario			\$68.75	\$68.75
Peptona buferada			\$13.50	\$13.50
Sulfato de magnesio			\$3.28	\$3.28
Cloro			\$3.05	\$3.05
Tiosulfato de sodio			\$11.91	\$11.91
Harina de soya			\$158.90	\$158.90
Garraiones			\$46.80	\$45.80
Guacales grandes			\$39.00	\$39.00
Olla de presión			\$37.20	\$37.20
Kit probador de agua			\$3.90	\$3.90
Alcohol			\$88.14	\$88.14
Agitador de vidrio			\$6.00	\$6.00
Critaleria			\$512.24	\$512.24
Espatulas, coladores embudos y otros			\$265.30	\$265.30
Bolsas, cucharas y guantes			\$53.06	\$53.06
Bomba de oxigeno completa			\$39.24	\$39.24
Cilindro de oxigeno y recarga			\$114.30	\$114.30
Set cajas petri (500 unidades)			\$93.85	\$93.85
Tarjetas toma de muestra			\$45.20	\$45.20
Hielera y botellas de hielo			\$107.60	\$107.60
Obtencion de bacterias nativas (laboratorio)			\$50.00	\$50.00
Preparación de los estanques	\$ 601.28	\$ 434.26	\$ 475.08	\$ 391.57
Costo de la Larva	\$ 8,048.92	\$ 5,827.68	\$ 6,355.96	\$ 5,249.44
Alimentación (Quintales de concentrado)	\$32,901.71	\$27,108.03	\$32,908.64	\$29,206.42
Antibiótico (oxiblen®)	\$ 1,563.56	\$ 1,129.24	\$ 1,235.40	\$ 1,018.24
Combustible utilizado	\$ 9,023.82	\$ 6,517.20	\$ 7,129.93	\$ 5,876.62

Mantenimientos de maquinarias, equipos y vehículos	\$ 4,699.40	\$ 3,394.00	\$ 3,713.11	\$ 2,960.42
Mantenimiento de la infraestructura	\$ 2,459.19	\$ 1,776.09	\$ 1,943.06	\$ 1,701.51
Equipos de laboratorio y oficina	\$ 472.26	\$ 341.08	\$ 373.15	\$ 307.55
<i>Salarios, comisiones, vacaciones y Aguinaldos</i>	\$ 4,220.69	\$ 3,334.87	\$ 2,748.66	\$ 3,048.28
Total de los costos que varían	\$92,445.33	\$72,796.95	\$60,954.63	\$53,821.78
Relación beneficio costo				
Ganancia o ingresos adicionales	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
Disminución de costos	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
Total de ingresos adicionales	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
Costos adicionales				
Costos adicionales (pruebas de laboratorio para calidad de agua)	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00
Disminución de los ingresos	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
Total de los costos adicionales	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00	\$1,660.00
Total de beneficio de campo - ingresos adicionales	\$103,537.16	\$85,275.07	\$86,886.25	\$69,127.52
Total costos que varían - costos adicionales	\$94,105.33	\$74,456.95	\$62,614.63	\$55,481.78
Beneficio neto	\$9,431.83	\$10,818.12	\$24,271.62	\$13,645.74

De acuerdo a la información del Cuadro 4, los costos que generaron los tratamientos, se denota que el T1 registró USD\$94,105.33 de gasto, siendo este el mayor valor, y un precio de venta por kilogramo de USD\$5.764, generando USD\$103,537.16; para el T2 el valor de gasto de USD\$74,456.95 y un valor de venta por kilogramo de USD\$6.182, generando USD\$85,275.07; el T3 generó un costo de USD\$62,614.63, con un valor de venta por kilogramo de USD\$6.05, generando USD\$86,886.25 y el T4 mostró un gasto de USD\$55,481.78, con un valor de venta por kilogramo de USD\$5.456, generando USD\$69,127.52.

Análisis de Dominancia

T1= \$9, 431.83
T4= \$13, 645.74 } \$4, 213.91 a favor de T4

T2= \$10, 818.12
T3= \$24, 271.62 } \$13, 453.50 a favor de T3

Como muestra el análisis de dominancia entre T1 y T4, la mejor rentabilidad se muestra a favor de T4 con USD\$4,213.91 más que el T1; mientras para los T2 y T3 muestra una rentabilidad a favor del T3 con USD\$13,453.50 más que el T2.

Relación Beneficio-Costo

El Cuadro 5, indica que la relación de retorno con respecto al costo y precio de venta, denotan que por cada dólar invertido para el T1 se retorna USD\$1.10, para el T2 por cada dólar invertido habrá un retorno USD\$1.10, para el T3 por cada dólar invertido se tendrá un retorno de USD\$1.39 y para el T4 al invertir un dólar se retornara USD\$1.25; encontrándose que los tratamientos de *Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*, muestran el mayor retorno con respecto a los tratamientos con EPICIN G2.

Cuadro 5. Relación Beneficio-Costo.

TRATAMIENTOS	Costo de los tratamientos	Beneficio de campo	Beneficio costo
Estanque 10 (T1)	\$94,105.33	\$103,537.16	1.10
Estanque 11 (T2)	\$74,456.95	\$85,275.07	1.15
Estanque 12 (T3)	\$62,614.63	\$86,886.28	1.39
Estanque 13 (T4)	\$55,481.78	\$69,127.52	1.25

CONCLUSIONES

El *Lactococcus lactis* y el *Lactobacillus paracasei*, aislados del tubo digestivo de los camarones cultivados en el estanque 3 y estanque 9, están dentro de la lista de bacterias que se pueden utilizar como probióticos en el cultivo de camarones en estanques.

El *Lactococcus lactis* y el *Lactobacillus paracasei*, utilizados como probióticos, se comportaron inocuos. Su aplicación en el alimento no alteró el sabor del camarón, y no se interactuaron con las bacterias utilizadas como biorremediador en el agua.

El estudio comprendió el análisis del Índice del Estado Trófico (TRIX), concluyendo que las aguas de los adyacentes a la camaronera "Las Ánimas" están se encuentran en estado permanente de eutrofización, muy alto en productividad primaria y agua de calidad pobre.

El Índice de Calidad de Agua (ICA), determinó que el agua de los adyacentes a la camaronera "Las Ánimas" (compuerta de entrada), es de calidad pobre; mientras las aguas que se desalojan (compuerta de salida) a los canales del complejo de Jaltepeque, El Salvador, no varían en la clasificación de calidad con respecto a las aguas de entrada.

Al realizar la sustitución de tratamientos con probióticos comerciales (EPICIN G2) por tratamientos con bacterias ácido lácticas nativas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*), se produjo un ahorro de USD\$50,465.87 en gastos de producción. Al utilizar bacterias

ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei* y *Lactococcus lactis*), se obtuvo una ganancia de USD\$17,667.41, sobre lo generado por los tratamientos control (EPICIN G2).

AGRADECIMIENTOS

Al personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador (UES), al personal del laboratorio de Microbiología y Físicoquímico de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador (UES), a los estudiantes del laboratorio de Microbiología del MEGATEC La Unión y al personal de la camaronera Las Ánimas.

BIBLIOGRAFÍA

APHA (American Public Health Association, United States); AWWA (American Water Works Association, United States); WPCF (Water Pollution Control Federation, United States). 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Conteo de bacterias heterótrofas, Identificación y cuantificación de *Vibrio* sp y *Pseudomonas* sp, fósforo total, nitrógeno total, amonio, nitrato, nitrito, alcalinidad, dureza y sílice. 17 ed. Diorki, Madrid, ES. p.9-63, 9-64,9-167, 4-187, 4-162,4-140,4-149,4-145,2-38,2-57, 4-204.

Aquafeed. 2013. El papel de la biorremediación en el manejo de la calidad del agua. La biorremediación en la acuicultura. (En

- línea).AT. Consultado 6 oct 2014. Disponible en: <http://aquafeed.co/el-papel-de-la-biorremediacion-en-el-manejo-de-la-calidad-del-agua/>
- Barraza Guardado, R.H; Martínez Córdova, L.R; Enríquez Ocaña, L.F; Martínez Porchas, M; Miranda Baeza, A; Porchas Cornejo, M.A. 2014. Effect of shrimp farm effluent on water and sediment quality parameters off the coast of Sonora, México. *Ciencias Marinas*, Universidad Autónoma de Baja California Ensenada, México. Vol. 40, núm. 4, 2014, p.221-235.
- Bonilla, G. 1986. Estadística. Elementos de estadística descriptiva y probabilidades. UCA editores. Antiguo Cuscatlán, SV. 375p.
- Castillo Duran, J. 2013. Aspectos Biológicos y Ecológicos de Almeja Negra *Chione fluctifraga* (Sowerby, 1853). Doctor en Ciencias. Baja California. México. Centro de Investigación Biológicas del Noroeste (CIB). p.42-47.
- Cuellar Ángel, Lara, C; Morales, V; De Gracia, A; García Suarez, O. 2010. Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Manejo de enfermedades de camarones. Panamá, PA. OIRSA-OPESCA. p.64.
- Chávez Rigal, J. 2008. Manual probióticos de tilapia y camarones, 1(1): 32-3.
- Escobedo Urías, D; Méndez Lozano, J. 2009. Impacto de los efluentes Acuícolas sobre la calidad ambiental de una laguna costera del Norte de Sinaloa. Sinaloa. México. Instituto Politécnico Nacional (IPN). p.10-19. http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20080964_5657.pdf
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia). 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Litopenaeus vannamei*. (En línea). Consultado 6 oct 2014. Disponible en: http://www.fao.org/fishey/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/es
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, El Salvador). 2012. Clasificación de suelos por división política de El Salvador, C.A. Clasificación de suelos por división política del departamento de La Paz, El Salvador. Dirección General de Ordenamiento Forestal, Cuencas y Riego. Santa Tecla, El Salvador. 37p.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2012. Informe de labores. San Salvador. El Salvador. MAR. 58-65p.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, El Salvador). 2013. Informe de labores. San Salvador. El Salvador. MARN. 23-76p.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, El Salvador). 2017. Informe de Calidad del agua de los ríos de El Salvador. Katan, C; Mena, Z; Amaya Grande, L; Aguirre, J; Péñate, Y. San Salvador. El Salvador. MAR. p.36-79.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, El Salvador). s.f. Índice de calidad de Agua ICA. SNET (Sistema Nacional de estudios Territoriales). San Salvador. El Salvador. p.1-4.
- MARN (Ministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente, El Salvador), BID (Banco Interamericano de Desarrollo, Estados Unidos). 2006. Informe Final Diagnóstico Nacional de la Calidad Sanitaria de las Aguas Superficiales de El Salvador. San Salvador. El Salvador. Ministerio de Recursos Naturales y Medio Ambiente. 78 – 88p.
- Morales Covarrubias, MS. 2010. Enfermedades del camarón. Camarón: Análisis en fresco, Herramienta de diagnóstico. Muestreo Aleatorio. México D.F, MX. Trillas. p.15-22; 85.

- Morales, R. 2013. Características técnicas de los sistemas de producción del camarón del cultivo en El Salvador. Santa Tecla, SV. p.3.
- Murillo, Haro, V. M; Fábregas, L. F; Paredes Iturrieta, N; González Maier, R; Oyarzún Vera, M. 2008. Programa y análisis de información biológica y oceánica, obtenida a través del Programa de Sanidad de Moluscos bivalvos. Chile. Instituto de Formación Pesquera. 76-100p.
- Navarrete Soriano, A. 2015. Protocolo de levantamiento de masivo y reporte de análisis de antibióticos. La Unión, SV. MEGATEC. s.p.
- Navarrete Soriano, A. 2017. Manual para el uso de EPICIN PST y EPICIN G2 de la marca EPICORE® con el propósito de Biorremediación validado en el cultivo de camarón marino en El Salvador. La Unión. El Salvador. ITCA- FEPADE, MINED (Ministerio de Educación), MEGATEC, La Unión.
- Navarrete Soriano, A. 14 de octubre. 2017. Elaboración y análisis de tablas para tesis de probióticos. (Mesa Redonda). Santa Tecla. La Libertad. MEGATEC, La Unión, El Salvador.
- Niola Morocho, A. 2017. Revisión de sistemas combinados de micro y macro organismos como alternativa tecnológica para el tratamiento de efluentes de granjas camaroneras. Ingeniero Acicala. Machala. Ecuador. Universidad Técnica de Machala (UTMACH). 5-8p.
- Pérez, L. 2009. Formulación y evaluación de proyectos productivos de inversión. Relación Beneficio Costo (R B/C). (En línea). Consultado 5 sept 2015. Disponible en: <http://www.agroproyectos.org/2013/08/relacion-beneficio-cost.html>
- Ramos Plaza, ER. 1999. Psicología para estudiantes. Prueba t de Student. México D.F., MX. s.p.
- Rico, MA. 1974. Las nuevas clasificaciones y los suelos de El Salvador. Suelos Grumosoles (Vertisoles). Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. San Salvador, El Salvador. Editorial Universitaria. p.19-20.
- Salazar Fiallo, J. 2013. Microorganismos para Bioremediacion.1 (10): 29- 33.
- The MERCK group. s.f. Microbiology Manual. MRS Agar (Lactobacillus Agar acc.To De MAN, ROGOSA and SHARE), Darmstadt, Alemania. p.354-355.