

Efecto de dos probióticos en la supervivencia, crecimiento y concentración de proteínas en la hemolinfa de *Penaeus vannamei* Boone 1931 enfrentado a desbalance iónico

Effect of two probiotics on survival, growth and protein concentration in hemolymph of *Penaeus vannamei* Boone 1931 confronted with ionic imbalance

Alexander Javier Basurto-Aguirre^{1,2}, Alexandra Elizabeth Bermúdez-Medranda², Yanis Cruz-Quintana², Juan Carlos Vélez-Chica²

¹Maestría con Trayectoria de Investigación en Acuicultura, Facultad de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

²Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables. Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola, Inocuidad y Salud Ambiental. Facultad de Acuicultura y Ciencias del Mar. Universidad Técnica de Manabí Bahía de Caráquez, Manabí EC130104, Ecuador.

Correspondencia: Yanis Cruz-Quintana **E-mail:** cqyanis@gmail.com

Artículo original | Original article

Palabras clave

Acuicultura,
Bacillus,
camarón,
cultivo en agua dulce,
levaduras,
potasio

RESUMEN | Los probióticos son comúnmente utilizados en acuicultura por sus beneficios para el crecimiento, la prevención de enfermedades y reducción del estrés. Sin embargo, los beneficios de los probióticos en camarones cultivados a baja salinidad han sido poco estudiados aun cuando este tipo de cultivo se ha incrementado considerablemente en la última década. Este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de dos probióticos en la supervivencia, incremento en peso y talla, y concentración de proteínas totales en hemolinfa de *Penaeus vannamei* enfrentado a desbalance iónico. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado con 288 juveniles de *P. vannamei* (9,80 ± 1,33 g; 12,11 ± 1,06 cm) distribuidos en 24 acuarios de 40 L. Se utilizó un control a 30 % y tres tratamientos a 2 % (n = 8) con tres réplicas cada uno; todos los tratamientos fueron duplicados y se agregó probióticos (Aquablend C® o HLBAC®) a uno de los duplicados. Para generar el desbalance iónico, a uno de los tratamientos a 2 % se le incrementó del magnesio y a otro se le incrementó el potasio. El bioensayo tuvo una duración de 96 h, se alimentó con una ración equivalente al 4% de la biomasa cada 8 h y se registraron los parámetros de calidad de agua, talla y peso inicial y final, mortalidad diaria y proteínas totales en hemolinfa, para comparar entre tratamientos. La supervivencia se redujo significativamente con el desbalance iónico; en los tratamientos a 2 % con modificación de iones, la supervivencia fue significativamente mayor cuando se incorporó probióticos. El incremento en talla y peso en los tratamientos a baja salinidad fue significativamente menor que en los tratamientos a 30 %. La concentración de proteínas totales en hemolinfa no varió significativamente entre tratamientos. El uso de probióticos mejoró significativamente la supervivencia de *P. vannamei* frente a desbalance iónico a 2 %, lo que abre una nueva línea de investigación para el desarrollo de protocolos de cultivo de camarón a baja salinidad.

Keywords

Aquaculture,
Bacillus,
shrimp,
freshwater culture,
yeasts,
potassium

ABSTRACT | Probiotics are commonly used in aquaculture for their benefits for growth, disease prevention and stress reduction. However, the benefits of probiotics in shrimps grown at low salinity have been little studied even though this type of aquaculture has increased considerably in the last decade. In this sense, this study aims to evaluate the effects of probiotics on the survival, increase in weight and length, and total protein concentration in hemolymph of *Penaeus vannamei* faced with ionic imbalance. A completely randomized experimental design was applied with 288 juveniles of *P. vannamei* (9.80 ± 1.33 g; 12.11 ± 1.06 cm) distributed in 24 aquariums of 40 L. A control at 30 % and three treatments at 2 % (n = 8) with three replicates each was used. All groups were duplicated, and probiotics (Aquablend C® or HLBAC®) were added to one of the duplicates. To generate the ionic imbalance, magnesium was increased in one of the 2 % treatments and potassium in the other. The bioassay lasted 96 h, and the shrimp were fed with a ration equivalent to 4% of biomass every 8 h. Water quality parameters, initial and final length and weight, daily mortality and total proteins in hemolymph were recorded, to compare among treatments. Survival was significantly reduced with ion imbalance; in the treatments with ion modification, survival was significantly greater when probiotics were incorporated. The increase in length and weight in treatments at low salinity was significantly lower than in treatments at 30 %. The total protein concentration in hemolymph did not vary significantly among treatments. The use of probiotics significantly improved the survival of *P. vannamei* against ionic imbalance at 2 %, which opens a new line of research for the development of low salinity shrimp culture protocols.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón en Ecuador se basa casi exclusivamente en la especie *Penaeus vannamei* Boone, 1931 (Wyban 2019). La producción nacional ha mostrado un vertiginoso crecimiento, sobre todo después de la pandemia de la Mancha Blanca (Wyban 2019), gracias a la experiencia adquirida por los productores frente a este y otros eventos previos de enfermedades (Boyd *et al.* 2021). Esta experiencia ha permitido expandir la cantidad de hectáreas de engorde de camarón no solo en sistemas de producción semintensivos en agua salada (Boyd *et al.* 2021), sino también incursionar en el cultivo a bajas salinidades motivado por la menor incidencia de enfermedades en este tipo de ambientes (Jaffer *et al.* 2019).

Un cultivo es considerado de baja salinidad cuando la cantidad de sales disueltas se encuentra entre 1 y 10 %; por debajo de 1 % se considera agua dulce mientras que con valores superiores a 10 % se considera agua salada (Boyd & Thunjai 2003). Los cultivos tierra adentro o a bajas salinidades, si bien tienen muchos beneficios como una menor incidencia de enfermedades, enfrentan el reto de bajas concentraciones de iones o desbalances de las proporciones entre iones que son biológicamente importantes para el camarón (Moreira *et al.* 2020), ocasionando reducción del crecimiento o ganancia en peso e incluso la muerte por desbalance iónico (Weihua *et al.* 2016). La cantidad de iones en el agua a baja salinidad puede variar grandemente de un sitio a otro, dependiendo de factores como el régimen de precipitaciones o la composición del suelo; pero en general, muestran bajas concentraciones de los principales iones que necesita el camarón para su buen desarrollo, si se compara con agua de mar diluida a una salinidad similar (Weihua *et al.* 2016). El potasio y el magnesio, por su importancia en los procesos fisiológicos del camarón y sus bajas concentraciones en agua a baja salinidad, son considerados iones limitantes y deben ser agregados durante el cultivo como medida de compensación iónica para reducir la mortalidad (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017).

El uso de probióticos en acuicultura, y fundamentalmente en cultivos de camarón, ha mostrado un incremento importante en la última década mientras se comprueban sus beneficios para contrarrestar las enfermedades (Amoah *et al.* 2022, Luo *et al.* 2021), favorecer el crecimiento y potenciar tanto el sistema inmune como la actividad de las enzimas digestivas del camarón (Amoah *et al.* 2022, Miao *et al.* 2018). Adicionalmente, los probióticos son una alternativa segura para reducir el uso de antimicrobianos en acuicultura (Kumar *et al.* 2016), un tema de preocupación creciente a nivel global. Sin embargo, actualmente existen muy pocos estudios sobre los beneficios que los probióticos pueden tener sobre la fisiología del camarón, su crecimiento o la supervivencia, en cultivos a baja salinidad (Li *et al.* 2017). En ese sentido, este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de dos probióticos sobre la supervivencia, crecimiento (talla y peso), y concentración de proteínas totales en hemolinfa de *P. vannamei* enfrentado a desbalance iónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 300 juveniles de *P. vannamei* con un peso y longitud promedio de $6,9 \pm 1,19$ g y $10,01 \pm 0,92$ cm, respectivamente, fueron recolectados de un sistema de cultivo a baja salinidad (5 %) ubicado en la parroquia Bachillero, Cantón Tosagua ($0^{\circ}45'50''$ S – $80^{\circ}12'20''$ O) y trasladados a los laboratorios experimentales de la Universidad Técnica de Manabí, extensión Sucre, provincia de Manabí. Los organismos fueron aclimatados a 27°C en tanques de 1500 L por 3 días; durante los siguientes 15 días previos al bioensayo, a 250 ejemplares se les redujo paulatinamente la salinidad agregando agua potable (tratada) desclorinada hasta llegar a 2 %, mientras que los otros 50 organismos fueron trasladados a otro tanque donde se les incrementó paulatinamente la salinidad con agua de mar filtrada hasta llegar a 30 %. Se aplicó una variación del 2% de la salinidad diariamente, según la recomendación de Li *et al.* (2008).

Se utilizaron 24 acuarios de 40 L de capacidad en un diseño experimental completamente aleatorizado que consistió en ocho grupos con tres réplicas cada uno (Tabla 1). Los camarones ($n = 288$), con un peso y longitud promedio al momento del ensayo de $9,80 \pm 1,33$ g y $12,11 \pm 1,06$ cm, respectivamente, sin registrar diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos en cuanto al peso y longitud, fueron colocados aleatoriamente a una densidad de 12 organismos/acuario, alimentados tres veces al día (09:00, 13:00 y 17:00 h) al 4% del peso corporal húmedo/día durante el ensayo, sin recambio de agua, con aireación continua y expuestos por 96 h a los diferentes tratamientos. Los residuos de alimentos no consumidos y heces fueron extraídos por sifonado 3 h después de cada alimentación; el volumen de agua perdido durante el sifonado fue restablecido con agua de características similares según el

tratamiento. Los parámetros físicos – químicos como oxígeno ($5,00 \pm 0,83 \text{ mg.L}^{-1}$), temperatura ($27,00 \pm 1,40^\circ\text{C}$), pH ($7,68 \pm 0,08$) y sólidos en suspensión ($3,60 \pm 0,48 \text{ mg.L}^{-1}$) no variaron significativamente ($p > 0,05$) entre los tratamientos al ser una sala controlada. Las concentraciones de NH_3 ($< 0,09 \text{ mg.L}^{-1}$), NO_2 ($< 0,14 \text{ mg.L}^{-1}$) y NO_3 ($< 9,35 \text{ mg.L}^{-1}$) se mantuvieron durante todo el ensayo por debajo de los límites tóxicos para camarón, NH_3 : 0,01 – 0,10; NO_2 : < 0,25; NO_3 : < 10 (Boyd & Tucker 1998).

Probióticos Se utilizaron dos probióticos comerciales: probiótico A (PA) conocido como Aquablend C®, altamente concentrado ($5 \cdot 10^{12} \text{ UFC/g}$) y compuesto por *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *B. subtilis*; y probiótico B (PB) conocido como HLBAC®, compuesto por *Bacillus subtilis* y *Bacillus* sp. ($2,3 \cdot 10^8 \text{ UFC/ml}$), levadura *Pichia* sp. ($1,1 \cdot 10^4 \text{ UFC/ml}$), ácidos húmicos y fúlvicos, y fermento de *Saccharum officinarum*. Se aplicó la dosis sugerida por el fabricante de 4 g.kg^{-1} de alimento de PA y $1\text{--}5 \text{ L.kg}^{-1}$ de PB, y se adicionó pegante Adipeg, también siguiendo las recomendaciones del fabricante. La elección de dos probióticos (A o B) y su uso en cada tratamiento fue tomada con base a la disponibilidad y presupuesto.

Iones en agua A cada tratamiento se le determinó la salinidad con un refractómetro ATC (salinómetro RFT-P series) y la concentración de los iones en el agua con un espectrofotómetro YSI-9300 (EcoSense®, UK) utilizando los kits comerciales para Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó un grupo control con agua estuarina filtrada a 30 %, simulando las condiciones de cultivo en la zona norte de Manabí, y otro grupo control con las mismas condiciones al que se agregó probiótico A. Dos tratamientos a baja salinidad (2 %), uno sin probiótico y otro con probiótico B. Dos tratamientos a baja salinidad (2 %) donde se restituyó el magnesio para mantener una proporción cercana a 3:1:1 (Mg^{2+} , Ca^+ y K^+) (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017), uno de ellos sin probiótico y otro con probiótico A. Otros dos tratamientos a baja salinidad (2 %) donde se restituyó el potasio a niveles similares al control de 30 % dado que el K^+ es un ion limitante (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017), uno de ellos sin probiótico y otro con probiótico B. La incorporación de Mg^{2+} y K^+ se realizó siguiendo los cálculos y proporciones para agua de mar (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017). Las concentraciones de iones al inicio del bioensayo para el agua a 30 % fueron $462,33 \pm 9,88 \text{ Mg}^{2+}$, $123,00 \pm 8,02 \text{ Ca}^{2+}$ y $104,67 \pm 4,79 \text{ K}^+$; mientras que para el agua a 2 % fueron $76,85 \pm 8,09 \text{ Mg}^{2+}$, $54,67 \pm 3,05 \text{ Ca}^{2+}$ y $36,67 \pm 3,08 \text{ K}^+$. Los valores promedio (0–96 h) de iones por tratamiento en los grupos control a 30 % y 2 %, y en los tratamientos con modificación de iones se muestran en la tabla 1.

Estimación de supervivencia Para estimar la supervivencia de cada tratamiento al final del bioensayo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$S = \frac{nf}{ni} \times 100$$

Donde S es la supervivencia; nf es el número de organismos al final del bioensayo; ni el número de organismos al inicio del bioensayo. El resultado se expresa en porcentaje.

Determinación del incremento en peso y talla A todos los organismos se le registró al inicio y al final del bioensayo, el peso (P) en gramos (g) utilizando una balanza gramera Ohaus® (Scout Pro SP202, USA) de tres cifras de precisión, y la talla (Largo Total = LT) en cm, utilizando un calibrador vernier de dos cifras de precisión. Se calculó el incremento en peso mediante la ecuación:

$$Ip = Pf - Pi$$

Donde Ip corresponde al incremento de peso mientras que Pf corresponde al peso final y Pi corresponde al peso inicial. El resultado se expresa en g.

El incremento en talla se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$It = LTf - LTi$$

Donde It es incremento en talla, LTf es el largo total final y LTi es el largo total inicial, el resultado se expresa en cm.

Determinación de proteínas en hemolinfa Se estimó la cantidad de proteínas en plasma de hemolinfa, después de extraer 100 μ l del seno ventral de cada organismo con jeringas de insulina pre-enfriada y una relación de hemolinfa y anticoagulante de 1:2. El anticoagulante fue preparado mezclando 10 mM de KCL, 450 mM de NaCl, 10 mM de HEPES a un pH de 7,3, y posteriormente se adicionaron 10 Mm de EDTA-Na2 para una osmolaridad final de 850 mOsm.kg⁻¹ (Aguilera-Rivera *et al.* 2019). La hemolinfa extraída fue colocada en tubos capilares y centrifugada a 9000 g^{-1} en una centrífuga de micro hematocrito, el plasma obtenido fue colocado en un refractómetro clínico veterinario ATC (RFT-P series) y se registró la lectura. Los valores fueron expresados en mg.mL⁻¹ y multiplicados por el factor de dilución con anticoagulante (Anuta *et al.* 2011).

Análisis estadísticos Las variables ambientales (oxígeno, temperatura, pH, sólidos disueltos y amonio) así como el incremento en peso y talla fueron comparadas entre tratamientos mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía después de comprobar la normalidad de los residuos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey para las diferencias significativas entre niveles de tratamientos. Se comparó la supervivencia a las 96 h entre los tratamientos, mediante una prueba de χ^2 . Estos análisis se realizaron con el programa Statistic V.8. En el caso de los valores de proteínas totales en hemolinfa las comparaciones se realizaron con una ANOVA de Welch mediante el software Minitab 18, por incumplir el supuesto de homogeneidad de varianzas. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos para todos los análisis.

RESULTADOS

Los valores de iones de magnesio (Mg^{++}), calcio (Ca^+) y potasio (K^+) a baja y alta salinidad; así como, las concentraciones de magnesio y potasio después del ajuste al agua a 2 % se muestran en la tabla 1. Estos iones muestran una relación de 3:1:1 (Mg^{++} , Ca^+ y K^+) en agua a 30 %, pero a 2 % sin agregar magnesio o potasio, esta proporción no es cumple.

Tabla 1: Salinidad y concentración (promedio \pm DE) de iones de magnesio (Mg), calcio (Ca) y potasio (K) en cada tratamiento. PA: Probiótico A (Aquablen C®); PB: Probiótico B (HLBAC®).

Tratamiento	Parámetros			
	Salinidad (%)	Mg ⁺⁺ (mg.L ⁻¹)	Ca ⁺ (mg.L ⁻¹)	K ⁺ (mg.L ⁻¹)
30 % + PA.	30	464,40 \pm 8,08	120,21 \pm 4,61	116,34 \pm 3,75
30 %	30	460,40 \pm 8,45	129,67 \pm 5,03	114,34 \pm 3,45
2 % + PB.	02	77,77 \pm 7,70	54,66 \pm 2,31	33,33 \pm 2,22
2 %	02	75,92 \pm 7,48	54,66 \pm 3,79	38,07 \pm 0,90
Mg + PA	02	130,74 \pm 6,58	51,33 \pm 3,06	36,67 \pm 2,08
Mg	02	137,79 \pm 6,81	54,66 \pm 3,21	38,67 \pm 3,45
K + PB	02	75,03 \pm 5,76	51,30 \pm 3,06	141,33 \pm 5,45
K	02	75,55 \pm 5,88	53,00 \pm 3,00	143,17 \pm 7,32

La supervivencia a las 96 h varió de acuerdo con el tratamiento, siendo las más altas (97%) a 30 % con y sin probióticos y la más baja (28%) en el tratamiento a 2 % con modificación del potasio (Figura 1). Las mayores supervivencias se observaron en los tratamientos a 30 %, y de manera general, los tratamientos a 2 % con y sin alteración de iones, mostraron mayor supervivencia cuando se incorporó un probiótico. Entre los tratamientos 30 %+PA vs 30 % y 2 %+PB vs 2 % no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$), pero sí la hubo entre los tratamientos Mg⁺⁺+PA vs Mg⁺⁺ ($P < 0,05$) y K⁺+PB vs K⁺ ($P < 0,05$).

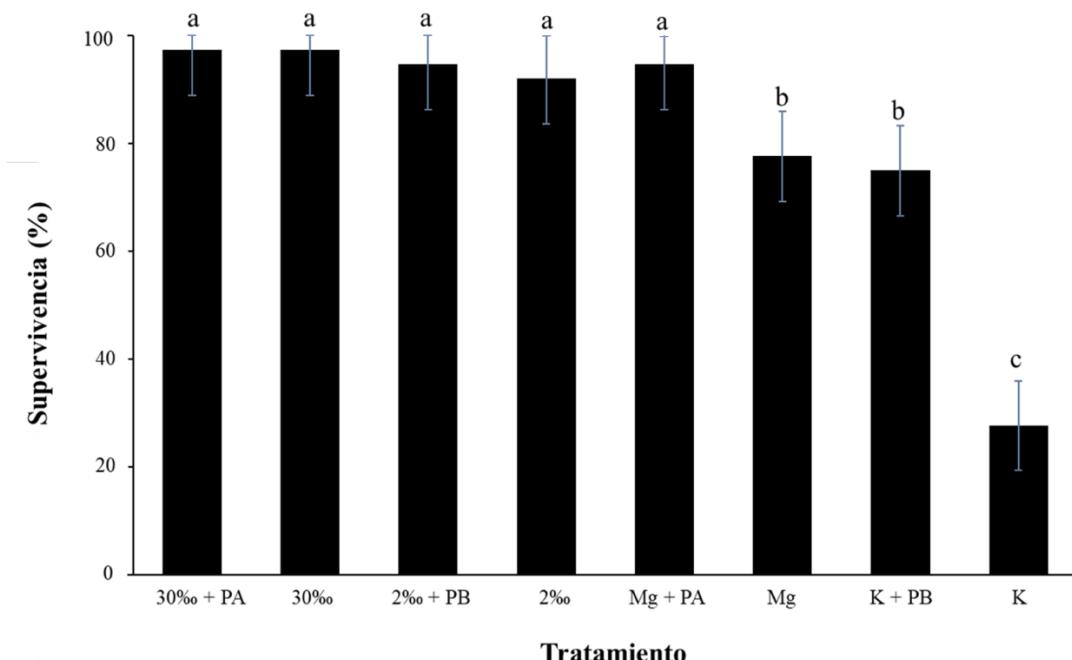


Figura 1. Comportamiento de la supervivencia de juveniles de *Penaeus vannamei* en cada tratamiento a las 96 h de exposición. Salinidad 30 ‰ y 2 ‰; PA: Probiótico A (Aquablend C®); PB: Probiótico B (HLBAC®); Mg: Magnesio; K: Potasio. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Incremento de peso y talla Los tratamientos a salinidades de 30 ‰ con y sin probióticos mostraron un incremento significativo respecto a todos los tratamientos a 2 ‰, tanto para el peso ($F_{(7,230)} = 55,6559$, $P < 0,0001$) como para la talla ($F_{(7,230)} = 162,0344$, $P < 0,0001$) (Figura 2). El peso no se incrementó significativamente ($P > 0,05$) en algún tratamiento con probióticos respecto a los tratamientos sin probióticos. El incremento en talla fue significativamente mayor en los tratamientos con probióticos a 30 ‰ ($P < 0,001$) y 2 ‰ + K ($P < 0,05$) respecto a los mismos tratamientos sin incorporación de probióticos; mientras que en los tratamientos con y sin probióticos a 2 ‰ sin modificación de iones y 2 ‰ + Mg, la talla no se incrementó significativamente ($P > 0,05$), pero si mostró una tendencia a mayores valores cuando se incorporó probióticos.

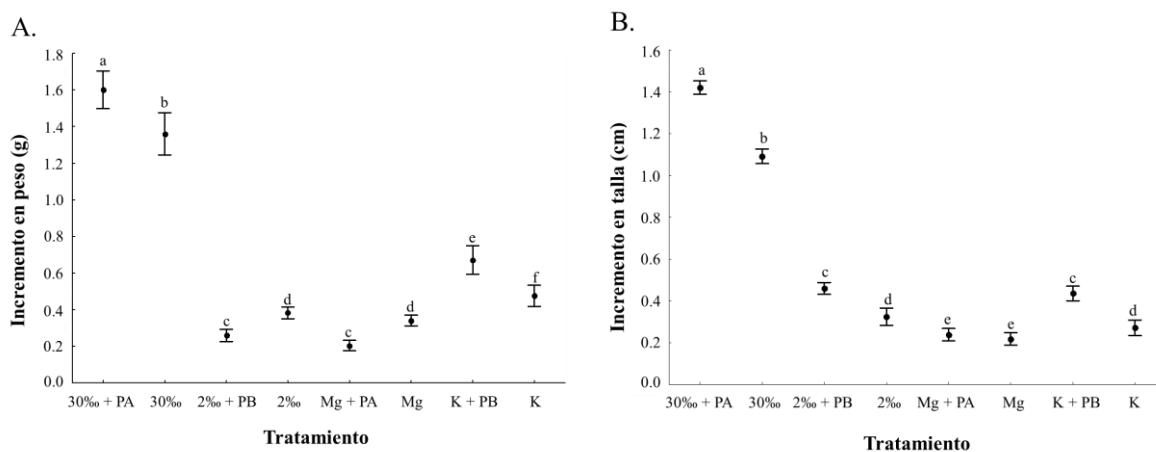


Figura 2 Comparación del incremento en peso (A.) y del incremento en talla (B.) entre los tratamientos. PA: Probiótico A (Aquablend C®); PB: Probiótico B (HLBAC®).

Proteínas totales En la hemolinfa de los camarones, la concentración de proteínas osciló entre 58,00 y 204,00 mg.mL^{-1} , pero los valores promedios por tratamiento oscilaron entre $121,81 \pm 30,72$ y $148,29 \pm 22,25 \text{ mg.mL}^{-1}$. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos (Figura 3); sin embargo, la concentración media de proteínas en la hemolinfa tiende a ser ligeramente mayor en todos los tratamientos con probióticos respecto a los tratamientos sin probióticos, excepto en el tratamiento con modificación de Magnesio.

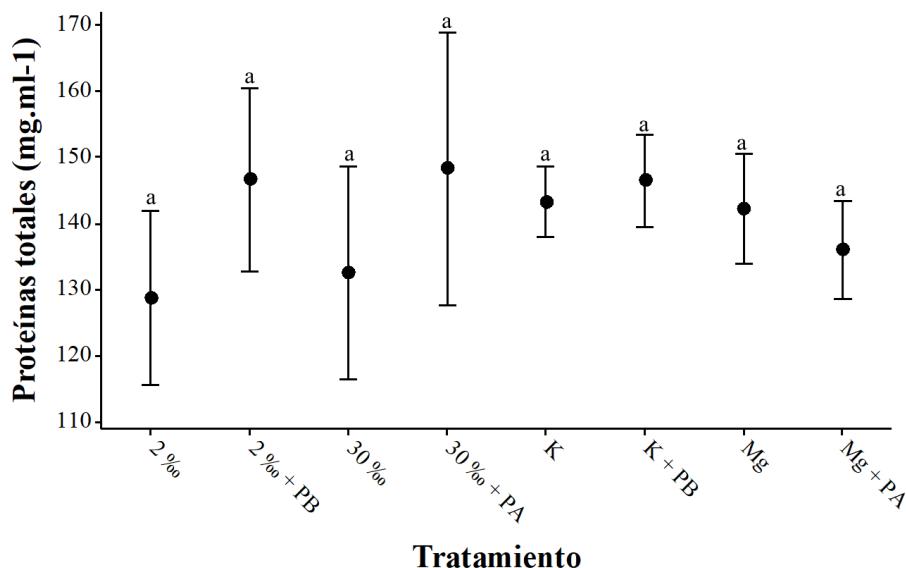


Figura 3. Concentración de proteínas totales (promedio \pm DS) en hemolinfa de *Penaeus vannamei* expuesto a desbalance iónico. PA: Probiótico A (Aquablend C®); PB: Probiótico B (HLBAC®). Letras similares denotan ausencia de diferencias significativas.

DISCUSIÓN

En el agua de mar natural a 34,5 % la proporción de los iones magnesio, calcio y potasio es de 3:1:1 y las concentraciones son de 1350 mg.L^{-1} de magnesio, 400 mg.L^{-1} de calcio, y 380 mg.L^{-1} de potasio (Boyd & Tucker 1998), por lo que el agua de mar diluida a 30 % debería contener $1173,9 \text{ mg.L}^{-1}$ de magnesio, $347,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de calcio, y $330,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de potasio (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017). Sin embargo, los valores de magnesio, calcio y potasio en el agua de los tratamientos a 30 % (grupos control) fueron inferiores a lo esperado tomando como referencia al agua de mar diluida a 30 %, evidenciando una baja concentraciones de estos iones en el agua del estuario del río Chone. Esto podría deberse a la dilución natural del agua marina que ocurre en el estuario durante los ciclos de marea y las descargas del río, regímenes de lluvia y características del suelo en la región, factores que determinan la concentración de iones en el agua (Weihua *et al.* 2016). No obstante, la proporción de estos iones es de 3:1:1 y las concentraciones se encuentran por encima de los valores mínimos de magnesio ($\text{Mg} > 100,00 \text{ mg.L}^{-1}$) y potasio ($\text{K} > 50,00 \text{ mg.L}^{-1}$) recomendados para cultivo de camarón (Weihua *et al.* 2016, Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017). Actualmente no existen estudios previos sobre composición iónica del agua en granjas de camarón alrededor del estuario del río Chone, pero bajas concentraciones de magnesio y potasio han sido reportadas en otras zonas estuarinas de Ecuador como el estuario del Río Guayas (Jaffer *et al.* 2019), zona camaronera de Ecuador con alta productividad y elevada supervivencia.

Los tratamientos a 2 % sin modificación de iones mostraron valores proporcionales de magnesio, pero valores elevados de calcio y potasio respecto al agua de mar diluida a 2 %. Aplicando el factor de conversión de 39,13 para magnesio, 11,59 para calcio y 11,1 para potasio (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017), el agua a 2 % debería tener $78,26 \text{ mg.L}^{-1}$ de magnesio, $23,18 \text{ mg.L}^{-1}$ de calcio y $22,20 \text{ mg.L}^{-1}$ de potasio; sin embargo, los valores de potasio, y fundamentalmente los de calcio, estaban elevados probablemente por la incorporación de carbonato de calcio del agua dulce utilizada para la dilución. Trabajos previos han descrito que el agua dulce o a baja salinidad presenta deficiencia de algunos iones importantes para el desarrollo de los camarones (Esparza-Leal *et al.* 2019).

La supervivencia se redujo significativamente en los tratamientos a 2 % con modificación de iones (magnesio y potasio) respecto a los tratamientos a 30 % y 2 % sin modificaciones de iones, siendo más marcado en el tratamiento con modificación del potasio. Este resultado es un poco contradictorio dado que se recomienda agregar sales de magnesio y potasio en cultivos a baja salinidad como medida de compensación iónica (Jaffer *et al.* 2019); sin embargo, aunque se incrementaron las concentraciones de magnesio y potasio por encima de los valores mínimos recomendados para cultivo de camarón (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017, Abrori *et al.* 2022), la reducción de la supervivencia parece estar más asociada al desequilibrio en las proporciones de los iones generado con la incorporación. Como se mencionó anteriormente, la proporción de magnesio, calcio y potasio debe ser 3:1:1 (Boyd

& Tucker 1998), pero con la incorporación de magnesio se modificó a 4:1,5:1, mientras que con la incorporación de potasio esta proporción se alteró drásticamente a 0,5:0,4:1, y se ha reportado que la proporción de los iones es tan importante como la concentración de cada ion para la supervivencia de los camarones (Boyd & Thunjai 2003).

Pese a que los camarones son organismos eurihalinos, la osmorregulación es influenciada por la concentración de sales presentes en el agua, por lo cual los organismos buscan equilibrar ese desbalance de sales por medio de la osmolaridad de la hemolinfa lo que conlleva un mayor desgaste energético (Huang *et al.* 2019, Wang *et al.* 2019) ya que la bomba de sodio y potasio se mantiene activa. En ese sentido, la relación sodio – potasio (26,7 Na:K) es fundamental para el buen funcionamiento de la bomba, y cualquier desbalance es letal porque acarrea problemas osmóticos. Se ha reportado que la baja relación de estos iones, como la inducida por la incorporación de potasio, produce letargia, nado errático y mortalidad (Li *et al.* 2017). Este resultado evidencia la necesidad de futuros estudios sobre la proporción de los iones no solo en la supervivencia sino en la fisiología del camarón, para poder recomendar medidas de compensación iónica apropiadas a los productores.

En los tratamientos a 30 %o y 2 %o sin modificación de iones, no se observaron supervivencias significativamente mayores al incorporar probióticos, aunque si una leve tendencia en el caso del tratamiento a 2 %o; sin embargo, en los tratamientos a 2 %o con modificación de magnesio y potasio, la supervivencia fue significativamente mayor al incorporar probióticos en la dieta, sugiriendo que los probióticos podrían mejorar la tolerancia de los camarones al desbalance iónico, al jugar un papel fundamental en la regulación intestinal del balance hidro mineral o en la absorción de nutrientes esenciales para la obtención de energía (Miao *et al.* 2018, Amoah *et al.* 2022), procesos necesarios para mantener la homeostasia de los camarones. La activación de la bomba Na:K a través de la enzima ATPasa requiere gran cantidad de energía para expulsar iones de sodio del interior celular e incorporar potasio (Li *et al.* 2017). En ese sentido, la relación sodio – potasio (26,7 Na:K) es fundamental para el buen funcionamiento de la bomba, y cualquier desbalance acarrea problemas osmóticos que afectan la fisiología del organismo y la supervivencia (Rubio-Gastélum *et al.* 2014). Se ha reportado que la baja relación de estos iones, como la inducida por la incorporación de potasio, produce letargia, nado errático y mortalidad (Li *et al.* 2017), mientras que la suplementación con probióticos en cultivos a baja salinidad (2 %o) incrementa la supervivencia (Li *et al.* 2017).

Aunque el experimento de exposición de los camarones a desbalance iónico se basó en un ensayo de corta duración (96 h), se pudo evidenciar que los organismos de los tratamientos a 2 %o con y sin modificación de iones mostraron incrementos en talla y peso significativamente menores que en los tratamientos a 30 %. Esto podría explicarse por un mayor desgaste energético en los camarones a baja salinidad para mantener la homeostasia, en detrimento del crecimiento o ganancia en peso. Los organismos mantenidos a baja salinidad requieren destinar mayor cantidad de energía para el mantenimiento de su homeostasia (p. ej. Osmorregulación), limitando su crecimiento o ganancia en peso (Li *et al.*, 2017), mientras que los organismos mantenidos a 30 % se encuentran en su medio natural con concentraciones adecuadas de iones para mantener su homeostasia, permitiendo destinar la energía obtenida de la alimentación hacia otros procesos fisiológicos como crecimiento y ganancia en peso. El incremento en peso no varió significativamente entre tratamientos con y sin probióticos, pero sí el incremento en talla, que en el caso de los camarones es un proceso relacionado con la muda. Este es un resultado interesante porque muestra que los probióticos no solo mejoran la supervivencia, sino que permiten el crecimiento de los organismos sometidos a desbalance iónico, aunque sea en pequeñas proporciones.

La concentración media de proteínas plasmáticas en este estudio fue similar a los valores de proteína plasmática entre 99,00 y 110,00 mg.L⁻¹ reportado previamente por Wang *et al.* (2019) e inferior al intervalo de 236,18 a 632,38 mg.L⁻¹ reportado en organismos mantenidos a alta salinidad (37 %o) (Rubio-Gastélum et al. 2014), aunque todos estos valores se encuentran dentro del amplio intervalo descrito para crustáceos (70,00 a 700,00 mg.mL⁻¹), incluyendo *P. vannamei* (Aweya *et al.* 2021). La concentración de proteínas no varió significativamente entre tratamientos lo que indica que este parámetro probablemente no se relaciona directamente con el equilibrio iónico y los procesos de osmorregulación de los camarones, dado que se ha relacionado principalmente con las condiciones nutricionales (Qiuyu *et al.* 2020). Los resultados de este estudio aportan información relevante sobre la respuesta de *P. vannamei* frente al estrés agudo por desbalance iónico, y como podría mejorar la supervivencia utilizando probióticos. Sin embargo, los resultados del presente estudio se limitan a condiciones experimentales en un ambiente controlado, muy diferente a lo que sucede en condiciones de cultivo, donde existen muchas

interacciones de variables biológicas y ambientales (Valenzuela-Madrigal *et al.* 2017) que podrían influir en los resultados finales. En ese sentido, los mecanismos fisiológicos que se potencian con la incorporación de probióticos y permiten una mayor supervivencia, aspectos no evaluados en este estudio, deben ser estudiados con más detalles tanto experimentalmente como a escala productiva.

Declaración de conflicto de intereses de los autores

No se declaran conflicto de intereses por parte de los autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Centro de Sanidad Acuícola del Departamento de Acuicultura, Pesca y Recursos Naturales Renovables; y a la Universidad Técnica de Manabí, por el apoyo logístico para el desarrollo de este estudio. A los Ing. Adriana Almeida, Ing. Leonela Muñoz Chumo e Ing. Byron Manuel Reyes, Mg., por el apoyo durante la ejecución del bioensayo y el análisis de muestras en el laboratorio. Por último, agradecemos al editor y revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias, las cuales contribuyeron a mejorar el documento.

REFERENCIAS

- Abrori M., Soegietano A., Winarni D. (2022). Survival, osmoregulatory and hemocyte changes in *Litopenaeus vannamei* postlarvae acclimated to different intervals of salinity reduction. *Aquaculture Reports*, 25(101222): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101222>
- Aguilera-Rivera D., Escalante-Herrera K., Gaxiola G., Prieto-Davó A., Rodríguez Fuentes G., Guerra-Castro E., Hernández-López J., Chávez-Sánchez M.C., Rodríguez-Canul R. (2019). Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50: 119–136. <https://doi.org/10.1111/jwas.12543>
- Anuta J., Buentello A., Patnaik S., Lawrence A., Mustafa A., Hume M., Gatlin III D., Kemp M. (2011). Effect of Dietary Supplementation of Acidic Calcium Sulfate (Vitoxal) on Growth, Survival, Immune Response and Gut Microbiota of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(6): 834–844. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Amoah K., Huang Q.C., Tan B.P., Zhang S., Chi S.Y., Yang Q.H., Liu H.Y., Dong X.H. (2022). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus coagulans* ATCC 7050, improves the growth performance, intestinal morphology, microflora, immune response, and disease confrontation of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 87: 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.029>
- Aweya J.J., Zheng Z.H., Zheng X.Y., Yao D.F., Zhang Y.L. (2021). The Expanding Repertoire of Immune-Related Molecules with Antimicrobial Activity in Penaeid Shrimps: A Review. *Reviews in Aquaculture*, 13: 1907–1937. <https://doi.org/10.1111/raq.12551>
- Boyd C., Davis R., McNevin A. (2021). Comparison of resource use for farmed shrimp in Ecuador, India, Indonesia, Thailand, and Vietnam. *Aquaculture, Fish and Fisheries*, 1: 3–15. <https://doi.org/10.1002/aff2.23>
- Boyd C., Thunjai T. (2003). Concentrations of Major Ions in Waters of Inland Shrimp Farms in China, Ecuador, Thailand, and the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(4): 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2003.tb00092.x>
- Boyd C., Tucker C. (1998). Pond Aquaculture Water Quality Management. Springer. New York: Springer. 700 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5407-3>
- Esparza-Leal H., Ponce-Palafox J., Cervantes-Cervantes C., Valenzuela-Quiñónez W., Luna-González A., López-Álvarez E., Vázquez-Montoya N., López-Espinosa M., Gómez-Peraza R. (2019). Effects of low salinity

exposure on immunological, physiological and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 50(3): 944–950. <https://doi.org/10.1111/are.13969>

Huang M., Dong Y., Zhang Y., Chen Q., Xie J., Xu C., Zhao Q., Li E. (2019). Growth and Lipidomic Responses of Juvenile Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* to Low Salinity. *Frontiers in Physiology*, 23(1087): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01087>

Jaffer R., Saraswathy R., Ishfaqc M., Antony J., Bundela D., Sharma P. (2019). Effect of low salinity on the growth and survival of juvenile pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*: A revival. *Aquaculture*, 734561: 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734561>

Kumar V., Roy S., Kumar U., Kumar D. (2016). Application of Probiotics in Shrimp Aquaculture: Importance, Mechanisms of Action, and Methods of Administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24: 342–368. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841>

Li E., Wang X., Chen K., Xu C., Qin J.G., Chen L. (2017). Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Reviews in Aquaculture*, 9(1): 57–75. <https://doi.org/10.1111/raq.12104>

Li E., Xiong Z., Chen L., Zeng C., Li K. (2008). Acute toxicity of boron to juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, at two salinities. *Aquaculture*, 278: 175–178.

Luo K., Tian X., Wang B., Wei C., Wang L.C., Zhang S., Liu Y., Li T.H., Dong S. (2021). Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses, and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 544(737041): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737041>

Miao S., Zhao C., Zhu J., Hu J., Dong X., Sun, L. (2018). Dietary soybean meal affects intestinal homoeostasis by altering the microbiota, morphology, and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead. *Scientific Reports*, 8(113): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18430-7>

Moreira F., Lima F., Cavalcante D., Carmo S. (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(e-56913): 1–14. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-56913>

Qiuyu Z., Tao H.L. Xinyu W. Jiteng Y. Yunxia Y. Xiaojun Z. Puqiang L. Teng X. Hanying, Chunlin W. (2020). Effects of dietary carbohydrate levels on growth, body composition, and gene expression of key enzymes involved in hepatopancreas metabolism in mud crab *Scylla paramamosain*. *Aquaculture*, 529(1):735638. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735638>

Rubio-Gastélum D., Valenzuela-Quiñónez W., Parra-Bracamonte G.M., Santamaría-Miranda A. (2014). Response of metabolites in hemolymph and productive performance of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured at high densities in laboratory. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3): 601–606. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000300017>

Valenzuela-Madrigal I., Valenzuela-Quiñónez W., Esparza-Leal H., Rodríguez-Quiroz G., Aragon-Noriega E. (2017). Effects of ionic composition on growth and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* culture at low-salinity well water. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52: 103–112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000100008>.

Wang Z., Qu Y., Yan M., Li J., Zou J., Fan L. (2019). Physiological Responses of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* to Temperature Fluctuation in Low-Salinity Water. *Frontiers in Physiology*, 10(1025): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01025>

Weihsia G., Luo T., Tinghua H., Min Y., Wei H., Qiaoqing X. (2016). Effect of salinity on the growth performance, osmolarity and metabolism-related gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 4: 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.09.001>

Wyban J. (2019). Selective Breeding of *Penaeus vannamei*: Impact on World Aquaculture and Lessons for Future. *Journal of Coastal Research*, 86(SI): 1–5. <https://doi.org/10.2112/SI86-001.1>

