

Probióticos y ácidos orgánicos como biocontroladores para optimizar el desarrollo embrionario y la eclosión de *Penaeus vannamei*

Probiotics and organic acids as biocontrol agents to optimize embryonic development and hatching of *Penaeus vannamei*

Luis Enrique Velásquez Salcedo¹ , Jenny Patricia Castro Salcedo² , Marita Elizabeth Monserrate Vite³ 

¹Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena, Ecuador.

²Facultad de Comunicación Social, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

³Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad, Santa Elena, Ecuador.

Correspondencia: Jenny Castro Salcedo **E-mail:** jenny.castrosa@ug.edu.ec

Artículo original | Original article

Palabras clave

ACID 5FIVE
bacteria
carga bacteriana
nauplio
HGS-7
camarón

Keywords

ACID 5FIVE
bacterium
bacterial load
nauplii
HGS-7
shrimp

RESUMEN | El desarrollo embrionario del *Penaeus vannamei* es susceptible a infecciones causadas por hongos, virus y bacterias presentes en el medio de cultivo o transmitidas de los progenitores a las descendencias durante el desove. Los aceites esenciales, ácidos orgánicos, extractos naturales, prebióticos y probióticos han sido frecuentemente usados para fortalecer al sistema inmunológico y garantizar el desarrollo de los camarones. Con la finalidad de mejorar la salud y viabilidad de los nauplios, se evaluó la eficacia de productos comerciales HGS-7, contentivos de bacterias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp.) y ACID 5FIVE con ácidos orgánicos (fumárico, málico, cítrico, láctico y succínico), aplicados de manera independiente o combinada por 20 días en los depósitos de hembras grávidas (bajo parámetros estandarizados), durante los procesos de desove y eclosión. La combinación de probióticos y ácidos orgánicos eliminó completamente *Pseudomonas* spp., pero no así *Vibrio* spp. La tasa de fertilidad incrementó (89,40%) y una menor deformidad de nauplios (0,5%) fue observada en el tratamiento combinado. La reducción significativa de *Pseudomonas* a través de la combinación de HGS-7 y ACID 5FIVE proporciona una solución efectiva, lo cual favoreció el desarrollo embrionario de *P. vannamei*. Esta estrategia puede mejorar la eficiencia y sostenibilidad de la producción acuícola, reduciendo la carga bacteriana y mejorando la viabilidad y tasa de eclosión de los embriones de camarón.

ABSTRACT | Embryonic development of *Penaeus vannamei* is susceptible to infections caused by fungi, viruses, and bacteria present in the culture medium or transmitted from broodstock to offspring during spawning. Essential oils, organic acids, natural extracts, prebiotics, and probiotics have often been used to strengthen the immune system and ensure the development of shrimp. To improve the health and viability of nauplii, the efficacy of commercial HGS-7 products containing probiotic bacteria (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp.) and ACID 5FIVE with organic acids (fumaric, malic, citric, lactic and succinic), applied independently or combined for 20 days in the tanks of gravid females (under standardized parameters) during the spawning and hatching processes. The combination of probiotics and organic acids eliminated *Pseudomonas* spp. but not *Vibrio* spp. Fertility rate increased (89.40%), and a lower nauplii deformity rate (0.5%) was observed in the combined treatment. The significant reduction of *Pseudomonas* through the combination of HGS-7 and ACID 5FIVE provides an effective solution, which successfully promotes embryonic development of *P. vannamei*. This strategy may improve the efficiency and sustainability of aquaculture production by reducing the bacterial load and improving the viability and egg production rate of *P. vannamei*.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura del camarón blanco *Penaeus vannamei* Boone 1931 constituye una parte esencial de la economía ecuatoriana. Sin embargo, esta industria ha enfrentado desafíos persistentes debido a enfermedades que han causado pérdidas económicas considerables a lo largo de las décadas, desde la incidencia del virus de la poliedrosis nuclear *Baculovirus penaeus* en la década de 1970, hasta el más reciente virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) a finales de los 90 y principios de los 2000 (FAO 2024). En la provincia de Santa Elena, epicentro de la producción de larvas y nauplios de camarón blanco, se encuentran actualmente 145 laboratorios formales enfocados en la larvicultura y maduración, quienes cuentan con programas genéticos sostenibles para la industria acuícola nacional (MPCEIP 2024).

El éxito en la producción de *P. vannamei* está estrechamente relacionado con la viabilidad y eclosión de los huevos, así como con la calidad microbiológica de su entorno (Suneetha, 2024). En particular, las etapas larvianas tempranas (nauplios, zoeas y mysis) son altamente vulnerables a la invasión de microorganismos patógenos, muchos de los cuales se originan desde la microbiota intestinal de las hembras reproductoras durante el desove (Garibay-Valdez *et al.* 2020). Entre las patologías más comunes que afectan la producción de *P. vannamei* se encuentra el Síndrome de Heces Blancas (WFS, por sus siglas en inglés), que puede ser causado por el microsporidio *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) y la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*; síndrome que se caracteriza por una decoloración blanca en el tracto gastrointestinal de los camarones, comprometiendo seriamente su salud y rendimiento productivo (Aranguren-Caro *et al.* 2022). Además, los factores microbiológicos y variables ambientales (como la temperatura y la calidad del agua) desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune embrionaria, influyendo en la capacidad de los organismos para controlar infecciones durante las primeras etapas de desarrollo (Álvarez 2020).

El control de la producción se inicia en el desove, donde se monitorea el desarrollo de los reproductores para una producción efectiva y eficiente, los huevos fecundados experimentan un proceso de desarrollo hasta la eclosión de los nauplios, extremadamente sensibles a la calidad del agua (Orrala 2021). El control previo en la maduración garantiza nauplios con estándares altos de salud y rendimiento, asegurando éxito en la larvicultura. Sin embargo, en el proceso de desove preexiste la transmisión de enfermedades bacterianas por contaminación del material fecal y ovígero de la madre, formando biopelículas en la superficie de los huevos. Una vez que son eclosionados, las bacterias pueden adherirse o colonizar a los nauplios y propagarse a los tanques de larvicultura (Otero-González 2018).

En los cultivos de camarón se presentan brotes de enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso, propagándose de forma vertical y horizontal (Diez-García *et al.* 2020), principalmente por bacterias oportunistas (Millard *et al.* 2021). Históricamente se han usado antibióticos y quimioterapias para controlar patógenos, evaluando a través de análisis bacteriológicos las diferentes etapas metamórficas del camarón (FAO 1988, Treece & Yates 1993, Otero 2018, Bautista y Pérez 2019, Diez-García *et al.* 2020, Garibay-Valdez *et al.* 2020). Un enfoque sostenible del control estratégico es manipular la flora bacteriana mediante tecnologías limpias, tales como los probióticos, aceites esenciales, ácidos orgánicos y extractos naturales, las cuales inhiben patógenos y fortalecen el sistema inmunológico del camarón (Alvarado *et al.* 2016; Olmos *et al.* 2020). Además, se ha demostrado que estos productos tecnológicos pueden mejorar la calidad del agua, la supervivencia larval y la rentabilidad de las granjas camaroneras, reduciendo la carga bacteriana y las infecciones. Esto mitiga la resistencia microbiana, la dependencia de antibióticos y productos químicos que puedan causar malformaciones, mejorando la salud embrionaria y la tasa de supervivencia de los nauplios (Pérez-Chabela *et al.* 2020, Hoseini *et al.* 2023).

En la camaronicultura se ha hecho frecuente el uso de probióticos y ácidos orgánicos de cadena corta, particularmente *Bacillus subtilis* como una bacteria multifuncional, que junto a *Lactobacillus lactis*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp., actúan como biocontroladores mejorando la asimilación de nutrientes, optimizando los parámetros ambientales en la acuicultura y reduciendo la contaminación del agua (Olmos *et al.* 2020); mientras que los ácidos orgánicos favorecen el crecimiento, la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades en camarones, disminuyen el pH, reduciendo la proliferación bacteriana (Ng y Koh 2018; Figueredo *et al.* 2019).

El objetivo general de esta investigación fue optimizar el desarrollo embrionario hasta la eclosión de *P. vannamei* mediante el uso de probióticos y ácidos orgánicos, con el fin de mitigar la carga bacteriana patógena y elevar el porcentaje de fecundidad, influyendo positivamente en la tasa de eclosión de los embriones de *P. vannamei*. Además, se cuantificó la carga bacteriana en los huevos y evaluó la eficacia de los tratamientos para reducirla y beneficiar la salud de los nauplios.

MATERIALES Y METODOS

Productos

Se probó la mezcla de dos productos comerciales con características específicas: 1) HGS-7 (Humic growth solutions) cuyos componentes activos fueron *B. subtilis* (1×10^9 CFU/g) 25%, *Lactobacillus lactis* (1×10^9 CFU/g) 25%, *Nitrosomonas* sp. (1×10^9 CFU/g) 25% y *Nitrobacter* sp. (1×10^9 CFU/g) 25%; y 2) ACID 5FIVE contenido de una mezcla ácidos monocarboxílicos saturados de cadena lineal: ácido fumárico ($C_4H_4O_4$) al 5%; ácido málico ($C_4H_6O_5$) al 10%; ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) al 20%; ácido láctico ($C_3H_6O_3$) al 15% y ácido succínico ($C_4H_6O_4$) al 50%.

Calidad del agua y llenado

Para el proceso de llenado de los tanques masivos, eclosión y almacenamiento de nauplios, se utilizó el agua de mar previamente quelada, aplicando 20 ppm de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), con fuerte movimiento estratificado de agua con ayuda de blower de 20 Hp y posteriormente filtrada mediante un sistema de 8 filtros de piola de 0,5 a 1 µm, y por bombona de carbón activado, para ser esterilizada por luz ultravioleta (longitud de onda 200 a 280 nm).

Recolección de hembras grávidas / embriones

Veinte hembras en estado de gravidez con madurez gonadal nivel IV caracterizado por ovarios muy agrandados, de color aceitunado a veces pardusco, fueron recogidas desde los tanques de maduración y luego depositadas en un tanque masivo (3 t), a una densidad de 6 hembras/t. Después de cuatro días, se recolectaron ~5 millones de embriones en etapa V de *P. vannamei* por masivo. Los embriones fueron recolectados a la 01:00 am e incubados a 32°C y 30 ups.

Bioensayo

Se usaron 4 tanques masivos y se almacenaron 20 hembras grávidas en cada uno; el diseño experimental aplicado siguió el protocolo del laboratorio GAESA (Sociedad Limitada Genética Acuícola del Ecuador) donde se llevó a cabo el estudio, que manifiesta el uso de 6,6 individuos /m³. Luego de 12 h de haberse llevado a efecto la cópula, las hembras son devueltas a sus respectivos tanques y se recolectan los huevos fertilizados, los cuales son mantenidos a 32°C, y luego son trasladados y depositados en el área de eclosión en 4 tanques de 1 t. Se sembró 10 millones de huevos en cada uno, manteniéndolos con aireación constante de acuerdo con la normativa de FAO (1988).

Los tratamientos fueron aplicados según lo propuesto por Rivera & Rodríguez (2019). Se dividieron las muestras de embriones y nauplios en cuatro tratamientos: (1) Grupo de control: No se aplicó ningún tratamiento; (2) *Grupo Bs*: Se aplicó 3 ppm de la mezcla de probióticos (HGS-7); (3) *Grupo Ao*: Se aplicó 1 ppm de ácidos orgánicos (ACID 5FIVE) y (4) *Grupo Bs – Ao*: Se aplicó una combinación de probióticos (3 ppm) y ácidos orgánicos (1 ppm). Todos los tratamientos fueron aplicados en tanques masivos con capacidad operativa de 3 t. Las concentraciones óptimas fueron seleccionadas según recomendaciones de las casas comerciales distribuidoras de los productos.

Desarrollo embrionario

Se incubaron los huevos fecundados en condiciones controladas en tanques llenados previamente con agua de mar filtrada y esterilizada a 32 °C, 30 ups de salinidad, y 6,8 mg/L de oxígeno disuelto, de acuerdo con la normativa de FAO (1988). Se monitoreó el desarrollo embrionario, y se determinó la tasa de eclosión y la supervivencia en cada tratamiento. Para determinar la acción de los biocontroles se tomaron muestras periódicas de los embriones en un recipiente de aprox. 15 L de agua, volumen manejable que permite mantener condiciones controladas y trabajar con una cantidad suficiente de embriones. Para obtener datos estadísticamente significativos, se homogenizaron para asegurar la representatividad de la población total al momento del análisis de los parámetros y se extrajo una muestra de 1 mL aprox., tamaño adecuado para el conteo bajo microscopio. Se tomó la muestra para observar la morfología de los embriones y determinar el efecto de los biocontroladores en los siguientes procesos bajo el microscopio de luz (400X). El procedimiento fue repetido para cada grupo de tratamiento y evaluados en su división celular descrita por Goytortúa *et al.* (2023)

Tasa de eclosión y viabilidad embrionaria

La tasa de eclosión fue cuantificada mediante la técnica de la volumetría, contando la cantidad de huevos fecundados y la cantidad de nauplios, a través de la fórmula: $(Nro. de nauplios / Nro. huevos) * 100$. Para determinar la viabilidad embrionaria se tomó una muestra aleatoria de 0.05 mL y se cuantificó multiplicado por 100 dentro de las 12 h por fototactismo positivo (aglomeración de nauplios en los sectores más iluminados del tanque).

Porcentaje de fertilidad

Se aplicó el método de evaluación microscópica de huevos fecundados en muestras representativas para obtener el número de huevos fertilizados producidos por hembra con relación al total de huevos esperados.

Carga bacteriana

Se cuantificó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en muestras de nauplios fase V bajo los distintos tratamientos. Se realizaron de 3 a 5 réplicas por muestra. Se usaron los medios selectivos-diferenciales como Agar Tiosulfato- Citrato - Sales biliares - Sacarosa (Agar TCBS), para cepas de *Vibrio* spp. y Agar Cetrimide para cultivo de *Pseudomonas* por siembra directa y se incubó por 24 h (Caycedo *et al.* 2021). Las muestras de nauplios fueron recolectadas a las 8:00 am tomando 1 L de agua que contenía 1 g de organismos vivos en bolsas estériles, las cuales fueron llevadas para su procesamiento en el laboratorio de control de calidad. El procedimiento se repitió por cinco días consecutivos.

Salud del nauplio

La salud de los nauplios fue evaluada mediante el método de observación directa utilizando un microscopio. Para ello, se recolectaron muestras representativas de nauplios en recipientes transparentes con agua de mar filtrada. La movilidad fue considerada el principal indicador de condición fisiológica. Nauplios con movimientos natatorios activos y constantes fueron clasificados como saludables, mientras que aquellos que presentaron movimientos aletargados o ausencia de actividad locomotora fueron considerados con posible compromiso en su salud.

Parámetros fisicoquímicos

Se monitoreó constantemente la temperatura, salinidad y el oxígeno disuelto mediante el uso de equipos multiparámetros portátiles o de monitoreo continuo YSI (modelo ProDSS o EXO), Hach, Hanna Instruments. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron en 29 °C, 30 ups de salinidad y 6,8 mg/L de oxígeno. Sin embargo, para estimular la ovulación durante el proceso del desove, proceso de aclimatación y limpieza mecánica del material ovígero, la temperatura se incrementó a 32 °C.

5.4. Análisis estadístico

El porcentaje de fertilidad, número de huevos por hembra, número de nauplios por hembra, tasa de eclosión, recuento bacteriano y salud del nauplio (porcentaje de deformidad). fueron analizados a través de un ANOVA de una vía. Previamente, se verificó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro - Wilk y para la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene (Shapiro y Wilk, 1965). Los porcentajes de fertilidad y eclosión fueron transformados a $\arcsen\sqrt{\%}$, y a logaritmos para garantizar las condiciones de normalidad. Se aplicó la prueba *a posteriori* de rangos múltiples de Tukey. Para todos los análisis efectuados, el nivel de significación fue de $P < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 26 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTADOS

Parámetros productivos

En la Tabla 1 se presentan los parámetros productivos tras la incorporación de probióticos (HGS-7), ácidos orgánicos (ACID 5FIVE) y combinación de éstos en el agua de cultivo durante 20 días. La tasa de fertilidad osciló entre 84,53 % y 89,40 %, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos tratados y el grupo control. La tasa fertilidad (TF) más elevada fue obtenida bajo la exposición a los probióticos (Bs), ácidos orgánicos (Bs–Ao) y combinación (Bs–Ao), lo que representó un incremento del 4 al 5% respecto al grupo control. Estos resultados indican que los tratamientos influyeron directamente en la TF de las hembras grávidas.

El número de huevos por hembra (H/h), nauplios por hembra (N/h) y tasa de eclosión (TE) no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre tratamientos. La deformidad de los nauplios (DN) denotó diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos con relación al grupo control, registrándose promedios de deformidad más bajo (0,54 %) en el tratamiento combinado de probióticos y ácidos orgánicos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de probióticos (Bs), ácidos orgánicos (Ao) y combinación de probióticos más ácidos orgánicos (Bs-Ao) sobre los parámetros productivos en el cultivo de camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*.**Table 1.** Effect of probiotics (Bs), organic acids (Ao), and combination of probiotics plus organic acids (Bs - Ao) on production parameters in the culture of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*.

Tratamientos	TF (%)	H/h	N/h	TE (%)	TDN (%)
Control	84,53 ± 2,62 a	194.842 ± 14,27	142.437 ± 12,85	73,06 ± 3,06	1,00 ± 0,00 a
Bs	89,20 ± 1,14 b	202.993 ± 12,95	146.661 ± 12,72	72,15 ± 1,87	0,63 ± 0,12 b
Ao	87,57 ± 1,72 b	198.754 ± 14,93	145.825 ± 13,57	73,29 ± 2,10	0,59 ± 0,11 bc
Bs-Ao	89,40 ± 0,89 b	204.268 ± 7,31	145.168 ± 7,43	71,06 ± 1,69	0,54 ± 0,09 c

Parámetros productivos: TF: tasa de fertilidad; H/h: número de huevos por hembra; N/h: nauplios por hembra; TE: tasa de eclosión, TDN: tasa deformidad en nauplio. Valores son expresados como promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre tratamientos.

Efecto de biocontroles

En la tabla 2 se presentan los resultados relacionados con tasas de huevos infértiles (THI %), los cuales mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0,05$). Los valores más altos fueron obtenidos en los grupos tratados con probióticos (Bs) y la combinación entre probióticos y ácidos orgánicos (Bs-Ao). La tasa de huevos que no eclosionaron (TNE) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, oscilando entre 8,70 % y 9,84 %, resultado que no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de huevos que no lograron eclosionar.

Tabla 2. Efecto de probióticos (Bs), ácidos orgánicos (Ao) y combinación de probióticos más ácidos orgánicos (Bs - Ao) sobre la tasa de huevos infértiles (THI) y tasa de nauplios encapsulados (TNE) en el cultivo de camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*.**Table 2.** Effect of probiotics (Bs), organic acids (Ao), and probiotics and organic acids combination (Bs - Ao) on infertile egg rate (IER) and encapsulated nauplius rate (ENR) in the culture of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*.

Tratamientos	THI (%)	TNE (%)
Control	7,82 ± 1,49 a	9,46 ± 1,73
Bs	10,01 ± 0,53 b	9,12 ± 0,85
Ao	8,87 ± 0,76 a	8,70 ± 0,79
Bs -Ao	10,48 ± 0,94 b	9,84 ± 0,77

THI: tasa de huevos infértiles; T: tasa de nauplios encapsulados. Valores expresados como promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre tratamientos.

Colonias totales y *Pseudomonas* en nauplios de *P. vannamei*

En el recuento de *Vibrio* spp. (log UFC mL⁻¹) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$) entre el control y los nauplios que recibieron los tratamientos con probióticos (Tabla 3). Los tratamientos con ácidos orgánicos y combinación de probióticos con ácidos orgánicos no lograron una reducción significativa en las concentraciones de *Vibrio* spp. en relación con el grupo control. Sin embargo, el conteo de *Pseudomonas* (log UFC mL⁻¹) en nauplios se denotaron diferencias significativas ($P<0,05$) en los tratamientos, resultando en una reducción significativa en el crecimiento de colonias de *Pseudomonas* cuando se usa la combinación de probióticos y ácidos orgánicos (Tabla 3).

Tabla 3. Conteo de unidades formadoras de colonias totales de *Vibrio* spp. (log UFC mL⁻¹) y *Pseudomonas* (log UFC mL⁻¹) durante la aplicación de probióticos (Bs), ácidos orgánicos (Ao) y combinación de probióticos más ácidos orgánicos (Bs - Ao) en desoves de camarón blanco del Pacífico *P. vannamei*.**Table 3.** Count of total colony-forming units of *Vibrio* spp. (log CFU mL⁻¹) and *Pseudomonas* spp. (log CFU mL⁻¹) during the application of probiotics (Bs), organic acids (Ao), and combination of probiotics plus organic acids (Bs - Ao) in spawning of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*.

Tratamientos	<i>Vibrio</i> spp. (log UFC mL ⁻¹)	<i>Pseudomonas</i> spp. (log UFC mL ⁻¹)
Control	3,85 ± 0,72	1,55 ± 1,02 a
Bs	3,50 ± 0,72	1,69 ± 1,14 a
Ao	3,65 ± 0,79	1,35 ± 0,78 a
Bs -Ao	3,66 ± 0,77	0,00 ± 0,00 b

Valores expresados como promedios ± desviación estándar. Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre tratamientos.

DISCUSIÓN

El estudio estimó que productos como probióticos, ácidos orgánicos y combinaciones de éstos, bajo condiciones específicas, pueden mejorar la tasa de fertilidad de *P. vannamei*. Se evaluó el impacto del uso como biocontroles en la eficiencia desde el desarrollo embrionario hasta la eclosión de *P. vannamei* y la carga bacteriana en sistemas de desove de hembras grávidas. La tasa de fertilidad y deformidad en los nauplios mostraron diferencias significativas, mientras que la eclosión y la cantidad de huevos y nauplios por hembra no fueron afectados por los tratamientos. El uso de probióticos como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. ha sido ampliamente documentado en la acuicultura, no solo por su capacidad para inhibir patógenos, sino también por sus efectos beneficiosos sobre el sistema inmunológico de los organismos (Alvarado 2016, Bautista-Teruel 2019, Díez-García 2020, FAO 2009, González-León *et al.* 2023, Goytortúa *et al.*, 2023).

Estudios realizados por Pérez-Chabela *et al.* (2020) han demostrado que *B. subtilis* puede mejorar la salud de los camarones al competir con patógenos bacterianos, mejorar la digestión y promover un sistema inmunológico saludable. Su incidencia en la reducción de la carga bacteriana conduce a una disminución significativa en los sistemas acuícolas y ayuda a prevenir enfermedades, mejorar la calidad del agua e incrementar los porcentajes de productividad. De esta manera, la tasa de fecundidad (F%) mostró un buen solapamiento de la cantidad de huevos producidos por las hembras, con una fertilidad registrada del 89,40%, así como la deformidad de los nauplios se mantuvo baja, dentro de intervalos aceptables (Figueredo *et al.* 2020). Adicionalmente, Melgar-Valdés *et al.* (2013) resaltaron que los parámetros ambientales influyen de manera diferenciada en el crecimiento del camarón *P. vannamei*, y cómo ciertos aditivos pueden impactar su rendimiento sin afectar todo el ciclo de desarrollo en cultivos intensivos.

Es conocido que los ácidos láctico, cítrico y acético tienen propiedades antimicrobianas que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas en el agua de cultivo, desde la fase de eclosión de quistes de camarón marino (Ng y Koh, 2017). También, estas sustancias mantienen un pH adecuado en el agua, lo que contribuye a un ambiente acuático saludable para el desarrollo de los huevos y larvas de camarón, es decir que los ácidos orgánicos han mostrado eficacia como aditivos antimicrobianos. Los resultados demuestran que, a pesar de no observarse una disminución significativa en las unidades formadoras de colonias de *Vibrio* spp., la combinación de probióticos y ácidos orgánicos resultó en una supresión clara de *Pseudomonas* spp. En comparación, se ha indicado que para desarrollar tecnologías de biocontrol para la vibriosis en camarones, mediante el uso de probióticos se debe enfocar en sus mecanismos de acción y sus interacciones con el huésped. Este tratamiento asegura una estrategia efectiva para mejorar el manejo sanitario de los desoves de *P. vannamei*, abriendo oportunidades a futuros estudios que evalúen la duración del tratamiento con probióticos y su posible aplicación comercial (Harpeni *et al.* 2024).

La fertilidad y la deformidad de los nauplios son significativamente afectados por los tratamientos aplicados de manera positiva. Sin embargo, la producción de huevos por hembra, el número de nauplios por hembra y la tasa de eclosión no mostraron variación entre los tratamientos. Bautista-Teruel y Pérez-Velázquez (2019) sugieren el uso de ácidos orgánicos como tratamientos sobre bacterias patógenas, los mismos pueden tener efectos positivos en aspectos reproductivos, lo cual debe ser considerado en relación con los mecanismos fisiológicos o las condiciones experimentales. La aplicación de probióticos (HGS-7) resultó ejercer un ambiente propicio para evitar el desplazamiento de patógenos; además, el uso de ácidos orgánicos (ACID 5FIVE) mejoró en un 2,8% la tasa de eclosión. La combinación de los probióticos con el ácido orgánico incrementó la fertilidad (huevos por hembra) y disminuyó la deformidad en nauplios, debido a que el *B. subtilis* y otras bacterias pueden mejorar la digestibilidad del alimento y la absorción de nutrientes esenciales (aminoácidos, lípidos, vitaminas), lo que incide en una mejor condición corporal y en la madurez gonadal de las hembras. Por otro lado, los ácidos orgánicos pueden reducir el pH intestinal, lo cual inhibe el crecimiento de bacterias patógenas como *Vibrio* spp. y favorecen una microbiota beneficiosa.

La utilización de probióticos y ácidos orgánicos moduló la tasa de infertilidad de los huevos, con variaciones importantes entre algunos de los tratamientos, que refiere al número de huevos fertilizados producidos por hembra con relación al total de huevos esperados o posibles. Aunque no se observó un efecto significativo en el porcentaje de huevos no eclosionados, este hallazgo demuestra que, ciertos tratamientos pueden mejorar la fertilización, como dietas o sistemas alternos de cultivo, confirmando la teoría de Díaz *et al.* (2017), que los probióticos y ácidos orgánicos no necesariamente influyen en la capacidad de los huevos para completar el desarrollo embrionario y de eclosión, pero proporcionan estrategias potenciales para optimizar la fertilidad sin impactar negativamente el proceso de eclosión. Aunque los tratamientos no

mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *Vibrio* spp., la combinación de probióticos y ácidos orgánicos resultó ser eficaz en la eliminación de *Pseudomonas*. En concordancia con los hallazgos de Lyng *et al.* (2024), referente a las interacciones entre *B. subtilis* y *Pseudomonas* spp., como géneros microbianos comunes en el suelo, que, si frecuentemente son beneficiosos para las plantas por su actividad en la rizosfera, sugieren entonces una posible sinergia en la aplicación conjunta de ambos microorganismos para el control de *Pseudomonas* spp. en los desoves de *P. vannamei*.

Estudios previos sobre el uso de *B. subtilis* y *Pseudomonas* spp, indican que no se había evaluado de forma sistemática su interacción bajo diferentes condiciones ambientales. Asimismo, no se había analizado la eficacia de la combinación de las cepas HGS-7 y ACID 5FIVE en el control de *Pseudomonas* durante los desoves de *P. vannamei*. Sin embargo, los resultados de este experimento sugieren que la eficacia de dichas combinaciones puede variar según las condiciones específicas del entorno, las condiciones de cultivo y las cepas bacterianas involucradas, encontrando patrones de inhibición vinculados a especies específicas. El estudio sugiere que las interacciones entre *B. subtilis* y *Pseudomonas* tienden a ser negativas y que su coexistencia exitosa en el cultivo podría requerir la presencia de otros microorganismos intervinientes.

La reducción en la carga bacteriana (58%) y aumento de la tasa de eclosión (2,8%) y el mantener la deformidad del nauplio (0,5%) en periodos diarios, generan implicaciones importantes para el manejo sanitario en la producción acuícola de esta especie. inhibiendo la formación de biopelículas de *B. subtilis*. Xue *et al.* (2016) consideraron que la dosis aplicada influye sobre el proceso inhibitorio y que la dosis óptima y la frecuencia de aplicación de los productos comerciales de *Bacillus* deben evaluarse previamente en criaderos de camarones a gran escala, para evitar efectos adversos ya que los ingredientes no bacterianos afectan su eficacia.

La implementación de probióticos y ácidos orgánicos puede ser una herramienta poderosa para mejorar la salud del embrión y la productividad en la maduración. Aunque estos tratamientos requieren una inversión en productos, equipos de monitoreo y capacitación del personal, su implementación es fundamental debido a los beneficios que aportan a la salud y al desarrollo óptimo del embrión. A pesar de los costos iniciales, su impacto positivo en la fertilidad y en la eficiencia del proceso justifican su adopción. No obstante, la discusión final expone que muchos acuicultores optan por no implementar estos tratamientos en esta etapa, ya que priorizan reducir costos operativos, incluso si ello implica cultivar un camarón menos saludable para el consumo. Prefieren evitar la inversión en biorremediación, a pesar de que esta permitiría obtener un camarón más fuerte, saludable y con mayor éxito productivo. Es esencial continuar explorando los efectos de estos tratamientos para determinar los factores específicos que mejoran la fertilidad sin comprometer el éxito en la eclosión y generar conciencia sobre su valor a largo plazo.

CONCLUSIONES

Este estudio demostró que el uso de probióticos (*B. subtilis*, *L. lactis*, *Nitrosomonas* sp., *Nitrobacter* sp.) y mezclas de ácidos orgánicos (ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido succínico) como biocontroles de microorganismos patógenos mejoran la fertilidad y la salud de los nauplios de *P. vannamei*. Aunque no se redujo la carga de *Vibrio* spp., sí eliminaron *Pseudomonas*, lo cual representa un avance significativo para el manejo sanitario en acuicultura. Este enfoque sostenible promueve la salud embrionaria y apoya su producción acuícola sostenible.

Declaración de conflicto de interés de los autores

Los autores declaran no tener conflictos de interés relacionado con el presente trabajo.

Declaración de buenas prácticas en el uso de seres vivos

Los autores declaran haber seguido todas las pautas internacionales, nacionales o institucionales aplicables para el cuidado y uso de animales en la realización del presente trabajo, siguiendo los protocolos del Comité de Ética para la Investigación con Animales en el Ecuador (Agrocalidad).

Declaración de contribución de autoría

Luis Velásquez S. Conceptualización (líder); análisis formal (líder); Investigación (líder), Metodología (líder), Escritura – borrador original (igual); análisis formal (igual); Software (líder); **Jenny Castro S.:** análisis formal (igual); Redacción (igual); revisión y edición (igual), Visualización (protagonista); Escritura – Elaboración del borrador original

(líder); Revisión y Edición (líder); **Marita Monserrate V.**: Supervisión (igual); Revisión (soporte), Conceptualización (soporte).

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Biólogo Alberto Bayas, gerente de Sociedad Limitada Genética Acuícola del Ecuador (GAESA).

REFERENCIAS

- Alvarado C., Krisyian J., Aveiga C., Stalin J. (2016). Evaluación de *Bacillus subtilis* como potencial probiótico en camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en etapa de post larva en Choluteca. Honduras. Tesis de pregrado. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/5891>
- Álvarez A., Martínez S., Gutiérrez J., Lanz H. (2020). Induction of innate immune response in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) embryos. *Developmental & Comparative Immunology* 105:103577. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103577>
- Anguiano-Cabello J. C., Flores-Olivas A., Olalde-Portugal V., Arredondo-Valdés R., Laredo Alcalá E. I. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth. *Revista Bio Ciencias* 6:e418. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e418>
- Aranguren-Caro L. F., Mai H. N., Cruz-Flores R., Alenton R. R. R., Dhar A. K. (2022). Estudio síndrome de heces blancas en camarones puede ser causado por más de un patógeno. *Global Aquaculture Advocate*. <https://www.globalseafood.org/advocate/estudio-sindrome-de-heces-blancas-en-camarones-puede-ser-causado-por-mas-de-un-patogeno/>
- Aranguren-Caro L.F., Gómez-Sánchez M.M., Piedrahita Y., Mai H. N., Cruz-Flores, R., Alenton R.R.R., Dhar A. K. (2022). Current infection status with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the Peruvian and Ecuadorian shrimp industry. *PLoS ONE* 17(8):e0272456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272456>
- Bautista-Teruel M. N., Pérez-Velázquez M. (2019). Uso de ácidos orgánicos como tratamiento de bacterias patógenas en cultivo de camarón. *Revista de Ciencias Marinas y Costeras* 11(1): 45-58. <https://library.co/document/zpnronp0-uso-%C3%A1cidos-org%C3%A1nicos-tratamiento-bacterias-pat%C3%B3genas-cultivo-camar%C3%B3n.html>
- Caycedo L., Corrales L., Trujillo D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova* 19(36):49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Díaz-Jiménez L., Pérez-Rostro C. I., Hernández-Vergara M. P.; Pérez-Legaspi I. A. (2017). Efecto de la dieta y el sistema de cultivo en la supervivencia y desarrollo larval del camarón bandeado *Stenopus hispidus*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88(1):163-172. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.004>
- Diez-García N., Troccoli-Ghinaglia L., Faneite J., González G., Bernal N. (2020). Bacterias probióticas en camaronerías del Guayas. Análisis microbiológico y su incidencia en *Vibrios* y *Pseudomonas*. *Revista Acuicultura* 138:40–42. https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion138_final_100
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1988). Manual operativo y definición de un laboratorio de 160 millones de Pl/año – Ministerio de la Industria Pesquera, Empresa Camaronicultura Cuba, contrato No. dp/cub/86/004-2/f10 anexo 111.a. <https://www.fao.org/3/AC410S/AC410S00.htm#TOC>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2009). *Penaeus vannamei*. In Cultured Aquatic Species Fact Sheets. https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2024). *Comercio de productos acuáticos*. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/f93e199d-7cba-48ff-a8aa-4b514e226512/content>
- Figueredo A., Patti J., de la Fuente R. (2019). Evaluación del desempeño reproductivo de una cepa domesticada de *Penaeus vannamei* en una maduración comercial. *AquaTIC* 53:18-31. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7604180>
- Garibay-Valdez E., Martínez-Porchas M., Calderón K., Gollas-Galván T., Martínez-Córdova L. R., Vargas-Albores F., Arvayo M. A. (2020). El microbiota del tracto digestivo de camarones peneidos: una perspectiva histórica y estado del arte. *Biocetnia* 22(1):5-16. <https://doi.org/10.18633/biotech.v22i1.1119>
- González-León Y., Ortega-Bernal J., Anducho-Reyes M. Á., Mercado-Flores Y. (2023). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 25:e520. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Goytortúa-Bores E., Andrade-Vizcaino K., Cadena Roa M. A., Civera Cerecedo R. (2023). Manual para la identificación de estadios larvales del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. CIBNOR. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3175>
- Harpeni E., Isnansetyo A., Istiqomah I., Murwantoko M. (2024). Bakterielle biologische Kontrolle der Vibriose bei Garnelen: Ein Überblick. *Aquaculture International* 32(5):5801–5831. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01445-z>
- Hoseini S. M., Yousefi M., Afzali-Kordmahalleh A., Pagheh E., Taheri-Mirghaed A. (2023). Effects of dietary lactic acid supplementation on the activity of digestive and antioxidant enzymes, gene expressions, and bacterial communities in the intestine of common carp, *Cyprinus carpio*. *Animals* 13(12):1934. <https://doi.org/10.3390/ani13121934>
- Lyng M., Þórisdóttir B., Sveinsdóttir S.H., Hansen M.L., Jelsbak L., Maróti G., Kovács Á.T. (2024). Taxonomy of *Pseudomonas* spp. determines interactions with *Bacillus subtilis*. *Systems* 9:e00212-24. <https://doi.org/10.1128/msystems.00212-24>
- Melgar-Váldez C. E., Barba-Macías, E., Álvarez-González, C. A., Tovilla-Hernández, C., Sánchez, A. J. (2013). Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decápoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. *Revista de Biología Tropical* 61(3):1215-1228.
- Millard R.S., Ellis R.P., Bateman K.S., Bickley L.K., Tyler C.R., Van Aerle R., Santos E.M. (2021). How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focused on white spot disease, *Journal of Invertebrate Pathology* 186:107369. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369>
- MPCEIP. (2024). Listado Oficial. Laboratorio de Larvas. Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, Subsecretaría de Calidad e Inocuidad. https://docs.google.com/spreadsheets/d/13hactBFolH_xTygEV9QecVQCwTkA2FeM/edit?gid=621599883#gid=621599883
- Ng W.K., Koh C.B. (2017). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 9(4):342-368. <https://doi.org/10.1111/raq.12141>
- Olmos J., Acosta M., Mendoza G., Pitones V. (2020). *Bacillus subtilis* is an ideal probiotic bacterium for shrimp and fish aquaculture that increases feed digestibility, prevents microbial diseases, and avoids water pollution. *Archives of Microbiology* 202:427–435. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01757-2>
- Orrala-Sandoval, L. (2021). Comparación de producción larvaria de distintas maduraciones en el laboratorio INCAMAR-ALFAMARINA, San Pablo-Provincia de Santa Elena Trabajo Practico, Universidad Estatal Península de Santa Elena. Universidad Estatal Península de Santa Elena, Ecuador. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6585/1/UPSE-TBM-2021-0007.pdf>

- Otero-González J. (2018). Enfermedades bacterianas más comunes en la larvicultura del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y sus métodos de control. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/12225>
- Pérez-Chabela M. L., Álvarez-Cisneros Y. M., Soriano-Santos J., Pérez-Hernández, M. A. (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica* 30(1): 93-105.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v30n1/Perez>
- Rivera L. G., Rodríguez C. I. (2019). Los ácidos orgánicos deben reemplazar a los antibióticos en acuicultura. Departamento de Investigación y Desarrollo de Distribuciones IR, DIR-Ecuador. *AQUACULTURA* #127.
https://www.academia.edu/38753805/Los_%C3%A1cidos_org%C3%A1nicos_deben_reemplazar_a_los_antibi%C3%B3ticos_en_acuicultura
- Saberioon M., Gholizadeh A., Cisar P., Pautsina A., Urban J. (2017). Application of machine vision systems in aquaculture with emphasis on fish: state-of-the-art and key issues. *Review in Aquaculture* 9(4):342-368.
<https://doi.org/10.1111/raq.12143>
- Shapiro S. S., Wilk M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3/4):591-611. <https://doi.org/10.1093/BIOMET/52.3-4.591>
- Suneetha K., Padmavathi P., Chatla, D. (2024). Hatchery performance of Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, in Biofloc technology by using different carbon sources. *Blue Biotechnology* 1:13. <https://doi.org/10.1186/s44315-024-00016-4>
- Treece G.D., Yates M.E. (1993). Manual de laboratorio para el cultivo de larvas de camarón peneido. Marine Advisory Service, Texas A & M University, Texas, EE UU.
https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/12407/noaa_12407_DS1.pdf
- Xue M., Wen C., Liang H., Ding M., Wu, Y., Li X. (2016). *In vivo* evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. *Aquaculture Research* 47:1661-1669. <https://doi.org/10.1111/are.12719>

