

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
ESCUELA DE POSTGRADO**

SECCIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE DOS PROBIÓTICOS BIOENCAPSULADOS EN NAUPLIOS DE
Artemia franciscana EN EL MEJORAMIENTO DEL DESARROLLO LARVAL
DEL CAMARÓN DE RÍO *Cryphiops caementarius*, EN LABORATORIO.**

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
MENCION EN BIOTECNOLOGÍA Y FERMENTACIONES INDUSTRIALES**

AUTOR : Br. WALTER EDUARDO REYES AVALOS

ASESOR : Dr. HEBER ROBLES CASTILLO

**TRUJILLO – PERÚ
2008**

Nº de Registro:.....

DATOS PERSONALES

NOMBRE : **Walter Eduardo Reyes Ávalos**

DIRECCIÓN : **Calle Chiclayo N° 256 – Urb. Aranjuez**

TELÉFONO : **044-346700** **Cel.: 94-9751665**

E_MAIL : **wreyes@uns.edu.pe**

JURADO EXAMINADOR

Dr. Federico Gonzáles Veintimilla
Presidente

Ms. Nelida Otiniano García
Miembro

Dr. Heber Robles Castillo
Miembro

DEDICATORIA

A mis hijos
Brayan Eduardo Yasser,
Gilda Lorena Lily
Andrea de Fatima Camila,
por ser fuente de mi inspiración
en esta vida.

A mi esposa Manuela
por su comprensión y apoyo
para la materialización de tan
importante esfuerzo personal
y a la vez familiar.

A mis padres
Segundo y Teonila
por darme la oportunidad de
seguir adelante por el camino del bien.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Santa, por permitirme hacer uso de la infraestructura y del equipamiento de los laboratorios de la facultad de Ciencias y llevar a cabo la presente tesis.

A los Bach. en Biol. Acuic. Inés Esquivel Paredes y Carlos García Córdova de la Universidad Nacional del Santa, por su valioso apoyo en el acondicionamiento de los sistemas de crianza y en el mantenimiento de larvas de camarón durante la experiencia.

Al Dr. Heber Robles Castillo docente de la Universidad Nacional de Trujillo, por proporcionar las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* MITL51 y *Lactobacillus casei* 475 CECT, empleadas en el presente trabajo.

Al Blgo. Mtblg. Carlos Azañero Díaz M.Sc. docente de la Universidad Nacional de Santa, por su apoyo en la manipulación de las cepas probióticas empleadas.

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS	6
2.1. Población y muestra	6
2.2. Diseño experimental	6
2.3. Activación de cepas y preparación de inóculos de los probióticos	7
2.4. Obtención de nauplios de <i>Artemia</i>	8
2.5. Bioencapsulación de probióticos en nauplios de <i>Artemia</i>	8
2.6. Larvicultura del camarón de río	10
A) Sistema de crianza de larvas de camarón	10
B) Obtención de larvas de camarón de río	11
C) Alimentación de larvas de camarón de río	12
D) Evaluación del desarrollo de larvas de camarón de río	12
2.7. Análisis microbiológico de larvas de camarón	13
2.8. Monitoreo de la calidad del agua de crianza larval	14
2.9. Análisis estadístico	14
III. RESULTADOS	15
3.1. Desarrollo larval	15
3.2. Crecimiento larval	18
3.3. Supervivencia larval	19
3.4. Comportamiento alimentario de larvas de camarón	21
3.5. Análisis microbiológico de larvas de camarón	23
IV. DISCUSIÓN	25
V. CONCLUSIONES	31
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. Calidad del agua de crianza larval.
2. Hidratación de cistos, decapsulación de cistos, incubación de embriones y bioencapsulación de probióticos en *A. franciscana*.
3. Obtención de larvas del camarón de río *C. caementarius*.
4. Análisis estadístico del crecimiento de zoea 8 de *C. caementarius*, según tratamientos.
5. Análisis estadístico del crecimiento de zoea 9 de *C. caementarius*, según tratamientos.
6. Análisis estadístico del crecimiento de zoea 10 de *C. caementarius*, según tratamientos.
7. Análisis estadístico del crecimiento de zoea 11 de *C. caementarius*, según tratamientos.
8. Análisis estadístico del crecimiento de zoea 12 de *C. caementarius*, según tratamientos.
9. Análisis estadístico del crecimiento de megalopa I de *C. caementarius*, según tratamientos.
10. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 3 de crianza, según tratamientos.
11. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 4 de crianza, según tratamientos.
12. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 5 de crianza, según tratamientos.
13. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 6 de crianza, según tratamientos.
14. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 7 de crianza, según tratamientos.
15. Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 8 de crianza, según tratamientos.
16. Análisis estadístico de la temperatura del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, según tratamientos.
17. Análisis estadístico del oxígeno del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, según tratamientos.
18. Análisis estadístico del porcentaje de saturación de oxígeno del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, según tratamientos.
19. Análisis estadístico del pH del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, según tratamientos.

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el efecto de dos probióticos bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana* en el mejoramiento del desarrollo larval de *C. caementarius*. Se empleó el diseño completamente al azar en donde las larvas de camarón fueron alimentadas con los probióticos *L. casei* y *S. cerevisiae* más aceite de pescado bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*, respectivamente y en el tratamiento control se empleó solo aceite de pescado bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana*. Las larvas de *C. caementarius* fueron criadas en nueve acuarios de 8,5 l acondicionadas con sustrato de arcilla, agua salobre (20‰) y aireación continua. La densidad de siembra fue de 40 larvas l⁻¹. Se alimentó con nauplios de *A. franciscana* a una densidad de 3 nauplios ml⁻¹ dos veces por día. El desarrollo larval de *C. caementarius* fue mejorado cuando las larvas fueron alimentadas con *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* en comparación con aquellas alimentadas con *L. casei*. Con *S. cerevisiae*, los cambios de estadio larval demoraron entre 3 a 5 días; los estadios zoea 12 y megalopa I fueron alcanzados en 44 y 50 días de crianza, respectivamente y el tamaño de megalopa I fue de 1209,77 µm de LC; además las larvas sobrevivieron 28 días más desde que mostraron signos de estar enfermas, muriendo a los 62 días en megalopa II. Con *L. casei* los cambios de estadio larval demoraron entre 4 a 9 días de crianza; los estadios zoea 12 y megalopa I fueron alcanzados en 52 y 64 días de crianza, respectivamente, y el tamaño de megalopa I fue de 1111,12 µm de LC; además las larvas sobrevivieron 43 días más desde que mostraron signos de estar enfermas, muriendo a los 75 días de crianza en megalopa I.

Palabras claves: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, bioencapsulación, *Artemia*, *Cryphiops*.

ABSTRACT

In this paper we determined the effect of probiotics *L. casei* and *S. cerevisiae* bioencapsulated in nauplii *A. franciscana* in improving the larval development of *C. caementarius*. We employed completely randomized design where prawn larvae were fed with *L. casei* and *S. cerevisiae* more fish oil bioencapsulated in nauplii *A. franciscana* respectively and in the control treatment was used only in fish oil bioencapsulado nauplii *A. franciscana*. The larvae of *C. caementarius* were rearing in nine aquariums 8.5 litre, equipped with clay substrate, brackish water (20 ‰) and continuous aeration. It was fed nauplii *A. franciscana* to a density of 3 nauplii mi twice a day. The development larval of *C. caementarius* was improved when the larvae were fed with *S. cerevisiae* bioencapsulated in nauplii of *A. franciscana* in comparison with those fed with *L. casei*. With *S. cerevisiae*, the changes of stage larval delayed between 3 to 5 days; the stages zoea 12 and megalopa I were achieved in 44 and 50 days of rearing, respectively and the size of megalopa I was of 1209,77 μm LC; in addition the larvae survived 28 more days since they showed signs of being sick, dying to 62 days in megalopa II. With *L. casei* the changes of larval stage delayed between 4 to 9 days of rearing; the stages zoea 12 and megalopa I were reached by them in 52 and 64 days of rearing, respectively, and the size of megalopa I was of 1111,12 μm LC; in addition the larvae survived 43 more days since they showed signs of being sick, dying to 75 days of rearing in megalopa I.

Key words: *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, bioencapsulated, *Artemia*, *Cryphiops*.

I. INTRODUCCIÓN

En ambientes acuáticos, los animales poseen microorganismos específicos que se encuentran formando parte de su microflora normal, pero a la vez están rodeados por patógenos oportunistas que alcanzan alta abundancia alrededor del animal y ante alguna alteración orgánica o fisiológica pueden causar enfermedades. De esta manera, la microflora intestinal de los animales acuáticos es un fiel reflejo de la composición de las especies microbianas del agua (Balcázar, 2002), en donde la composición de la flora intestinal de las larvas de organismos acuáticos, desde su primera alimentación juega un importante rol en la defensa contra la colonización y el crecimiento de patógenos oportunistas (Abidi, 2003).

La flora bacteriana en larvas del camarón de río *Cryphiops caementarius* no se conoce. Sin embargo, la salinidad del agua y el tipo de sustrato que son factores limitantes para su desarrollo, así como el tipo de alimento vivo consumido, tanto en laboratorio (Guerra *et al.*, 1983 y 1986a) como en condiciones naturales, podrían definir el tipo de bacterias que colonizan internamente desde el estadio de zoea 2, donde inicia su alimentación exógena, hasta la metamorfosis. Además se ha reportado que es posible modificar la composición de la microflora larval de peces (Makridis *et al.*, 2001) y de camarones peneidos (Simões *et al.*, 2002) mediante el uso de probióticos.

Un probiótico es definido como un microbio vivo auxiliar el cual tiene un efecto benéfico sobre el huésped al modificar la comunidad microbiana del ambiente o asociada al huésped, haciendo mejor el uso del alimento o mejorando su valor nutricional, así mismo, estimulando la respuesta a las enfermedades o mejorando la calidad de su ambiente (Verschuere *et al.*, 2000). En acuicultura el término probiótico se define de manera similar pero aplicado a los sistemas de producción acuática (Balcázar, 2002). Sin embargo el exacto modo de acción de los probióticos aún no ha sido completamente entendido en animales acuáticos, pero es aceptado que la exclusión competitiva es la principal acción de las bacterias probióticas que incluye la producción de sustancias inhibitorias en contra del patógeno potencial, competición por nutrientes, adhesión a sitios en el intestino y estimulación del sistema inmune del huésped (Mahious & Ollevier, 2005) con lo cual se mejora el desempeño de las especies en cultivo.

Las bacterias consideradas como probióticas pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, (Abidi, 2003; Amores *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005). En crustáceos se han aislado cepas de bacterias que son usadas como probióticos, tales como *Vibrio alginolyticus* (Quesada *et al.*, 2004), *Vibrio* P62, P63 y P66, *Pseudomonas* P67, *Bacillus* P64 (Gullian, 2001) y *Bacillus* S11 (Balcázar, 2002), así como bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus plantarum*, *L. animalis*, *L. alimentarius* (Ramírez *et al.*, 2006), *L. acidophilus* y *L. sporogenes* (Venkat *et al.*, 2004), entre otras.

Lactobacillus sp, es el probiótico más común usado en humanos y *Lactobacillus casei* un miembro de la familia de las BAL ha sido aislado del intestino de humanos y comercialmente usada por largo tiempo para producir leche fermentada (Hori *et al.*, 2003). En animales acuáticos, Phianphak *et al.* (1999) demostraron que diversas especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* y *L. jensenii*) aislados de intestinos de pollos saludables, pueden colonizar el intestino del langostino *Penaeus monodon* y funciona como probióticos al incrementar la supervivencia y el crecimiento.

Las BAL son capaces de suprimir el crecimiento de patógenos oportunistas (Ajitha *et al.*, 2004) al sobrevivir en el tracto digestivo debido a su tolerancia a la acidez y a las sales biliares (Mahious & Ollevier, 2005) y además producen ácidos orgánicos (El-Naggar, 2004) que crean un ambiente desfavorable para el crecimiento de patógenos. Además, sintetizan sustancias con alto potencial bactericida contra *Salmonella* sp y *Escherichia coli* (Estrada *et al.*, 2005) y *L. acidophilus* además contra *Yersinia enterocolitica* y *Shigella dysenteriae* (Pabmanadha *et al.*, 2006); de manera similar *V. cholerae*, *Pseudomonas* sp y *Aeromonas* sp son inhibidas por *L. plantarum*, *L. animalis* y *L. alimentarius* (Ramírez *et al.*, 2006).

Por consiguiente, las especies de BAL poseen buenas cualidades para ser empleadas como probióticos en crustáceos porque además se ha reportado que ciertas especies (*L. plantarum*, *L. paraplantarum* y *Pediococcus parvulus*) están presentes en el intestino del langostino *Litopenaeus vannamei* (Ramírez, 2005) y es probable que estas y otras especies también lo presenten otros crustáceos, de tal manera que se beneficien de su actividad.

Las levaduras probióticas son de los géneros *Saccharomyces* (Amores *et al.*, 2004), *Pichia* (Espinosa *et al.*, 2002), *Debaryomyces* y *Phaffia* (Mahious & Ollevier, 2005), empleadas en

alimentación tanto de humanos como de animales terrestres y acuáticos.

La capacidad de las levaduras para actuar como probióticos y mejorar la supervivencia y el crecimiento de organismos acuáticos se explican por diversos mecanismos. Un mecanismo de adhesión de *Salmonella* sp a la pared celular de *S. cerevisiae* ha sido observado recientemente por Pérez-Sotelo *et al.* (2005) lo cual explica la interferencia para bacterias patógenas, previniendo de esta manera las enfermedades. Tovar-Ramírez *et al.* (2000) observaron que *S. cerevisiae* produce poliaminas como espermidina y espermina, y además mostraron mejor capacidad de adhesión al intestino de larvas de peces lo cual favoreció la maduración de su tracto digestivo. En el caso de la espermina es considerado un promotor del crecimiento de *L. stylirostris* (Smith *et al.*, 2000). Además, las diferentes cepas de *S. cerevisiae* son capaces de resistir todos los estresores que hay en el tracto digestivo de un animal (Martins *et al.*, 2005) y en este ambiente mejoran la digestibilidad del alimento y provee de mayor disponibilidad de nutrientes (Lara *et al.*, 2002) incluso de compuestos indigeribles (Irianto & Austin, 2002).

En acuicultura, los probióticos son usados por adición al agua de crianza o por la introducción de cepas seleccionadas dentro del tracto digestivo del predador vía alimento inerte (pellets secos) o vía alimento vivo (rotíferos, *Artemia*) (Mahious & Ollevier, 2005). Esta última vía es llamada bioencapsulación que es un proceso mediante el cual un organismo vivo incorpora un determinado producto o agente bioencapsulante vía oral, de esta forma, dicho organismo se convierte a los efectos prácticos en una cápsula viva (Castro *et al.*, 2005).

Artemia es el género de microcrustáceos de mayor uso como alimento vivo para las diferentes etapas del cultivo de organismos acuático de interés comercial. Los nauplios de *Artemia* recién eclosionados miden aproximadamente 450 μm y a las 24 h de nacidas alcanzan el estadio de Instar II e inician su alimentación exógena, siendo filtradores no selectivos. A partir de esta edad los nauplios de *Artemia* son utilizados para bioencapsular ácidos grasos (Devresse *et al.*, 1990; Romdhane *et al.*, 1995), vitaminas (Merchie *et al.*, 1995), antibióticos (Chair *et al.*, 1996), inmunoestimulantes (Skjermo & Bergh, 2004), levaduras (Espinosa *et al.*, 2002; Patra & Mohamed, 2003) y bacterias (Gómez-Gil *et al.*, 1998; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Makridis *et al.*, 2001). Todas estas sustancias y

microorganismos son utilizados en la alimentación o en la profilaxis de diversos organismos acuáticos.

La bioencapsulación de bacterias y levaduras en *Artemia* depende del inóculo, de la especie de microorganismo empleado, del tiempo de exposición y del estadio de desarrollo de la *Artemia*. Gómez-Gil *et al.* (1998) bioencapsularon dos cepas de *Vibrio* (C7b y HL57) en nauplios de *A. franciscana* con inóculos de 10^7 y 10^8 UFC ml⁻¹ y a los 45 minutos y 2 horas logran la máxima concentración de $2,7 \times 10^3$ y $4,5 \times 10^3$ UFC nauplio⁻¹, respectivamente. De igual manera, Makridis *et al.* (2001) bioencapsularon *Vibrio* (PB 1-11 y PB 6-1) pero en metanauplios de *A. franciscana* empleando un inóculo de 1 a 2×10^7 UFC ml⁻¹ durante 30 minutos para lograr $2,7 \times 10^3$ UFC metanauplio⁻¹. En cambio Espinosa *et al.* (2002) bioencapsularon levadura *P. pastoris* en nauplios de *A. salina* empleando un inóculo de 10^7 UFC ml⁻¹ y a las 4 h logran los mayores de valores de $0,85 \times 10^2$ UFC nauplio⁻¹.

Diversos probióticos bioencapsulados en nauplios de *Artemia* han sido empleados como alimento en diversos organismos acuáticos. En peces, Makridis *et al.* (2001) determinan que la composición de la microflora intestinal en larvas de *Hippoglossus hippoglossus* fue influida por la alimentación con cepas de *Vibrio* bioencapsuladas en *A. franciscana*. Gómez-Gil *et al.* (2000) demuestran que *L. bulgaricus* y *S. lactis* bioencapsulados en nauplios de *Artemia* mejoran la supervivencia de larvas de *Scophthalmus maximus*. En crustáceos, Patra & Mohamed (2003) enriquecieron nauplios de *Artemia* con *S. boulardii* y encontraron que con 10^4 UFC ml⁻¹ se mejora la resistencia de dichos nauplios a la infección con *V. harveyi*. Así mismo, Venkat *et al.* (2004) obtuvieron mayor crecimiento y una alta conversión alimenticia y ganancia de proteínas en postlarvas del camarón *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas con *L. sporogenes* bioencapsulados en nauplios de *Artemia*.

Actualmente no se ha realizado estudio alguno referente al uso de bacterias y levaduras como probióticos en el cultivo del larvas del camarón de río *C. caementarius*, pero de acuerdo a lo mencionado sobre la importancia y aplicación de probióticos en diversos organismos acuáticos de interés comercial, incluido a los crustáceos, es posible que los probióticos *L. casei* y *S. cerevisiae*, contribuyan con la nutrición y la salud de las larvas de tal manera que se mejore el desarrollo larval de la especie de camarón en términos de duración de los estadios larvales, tamaño y supervivencia larval.

C. caementarius es una de las trece especies de camarones que habitan los ríos de la vertiente occidental de los andes del Perú, siendo la de mayor importancia comercial por su amplia distribución latitudinal y porque su abundancia poblacional se concentra en los ríos del sur (Yépez & Bandín, 1997); además es la especie más estudiada y promisoría para cultivo. Recientemente se ha bioencapsulado microalgas y lípidos en el rotífero *Brachionus plicatilis* logrando mejorar la supervivencia larval (24%), de la misma especie de camarón, en los estados críticos de su desarrollo inicial hasta el estadio zoea 8 (Portugal *et al.*, 2003), no continuando con su desarrollo larval probablemente a la necesidad de otras condiciones ambientales y nutricionales.

El objetivo general fue determinar el efecto de dos probióticos bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana* en el mejoramiento del desarrollo larval del camarón de río *C. caementarius*, en laboratorio, para lo cual fue necesario:

- Determinar la duración de los estadios larvales de *C. caementarius* alimentados con los probióticos *L. casei* y *S. cerevisiae* bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*.
- Determinar el tamaño de los estadios larvales de *C. caementarius* alimentados con los probióticos *L. casei* y *S. cerevisiae* bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*.
- Determinar la supervivencia de las larvas de *C. caementarius* alimentados con los probióticos *L. casei* y *S. cerevisiae* bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Población y muestra

La población estuvo conformada por larvas recién eclosionadas del camarón de río *C. caementarius* procedente de la parte baja del río Lacramarca (09°07'70'' LS y 78°34'20'' LW) de la provincia de El Santa, Distrito de Nvo. Chimbote, Departamento de Ancash, Perú. La especie de camarón fue identificada en laboratorio, según la clave de Méndez (1981).

La muestra lo constituyó 3060 larvas recién eclosionadas, las que fueron seleccionadas al azar de la población de larvas obtenida de una hembra ovífera de 6,5 cm de longitud total (Fig. 1).



Fig. 1: Hembra ovífera del camarón de río *C. caementarius*.

2.2. Diseño experimental

Se empleó el diseño completamente al azar con tres tratamientos (T) y tres repeticiones por tratamiento (Fig. 2), siendo estos los siguientes:

T1= Larvas de *C. caementarius* alimentadas con aceite de pescado bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* (Control).

T2= Larvas de *C. caementarius* alimentadas con *L. casei* más aceite de pescado bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*.

T3= Larvas de *C. caementarius* alimentadas con *S. cerevisiae* más aceite de pescado bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana*.



Fig. 2: Disposición de las unidades experimentales de cada tratamiento

2.3. Activación de cepas y preparación de inóculos de los probióticos

La manipulación de cepas fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional del Santa. Se empleó cepas de *L. casei* 475 CECT y de *S. cerevisiae* MITL51 (Fig. 3a) cedidas por el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Trujillo. La primera cepa fue activada en agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), incubada a 37°C por 5 días en anaerobiosis (Fig. 3b). La segunda cepa fue activada en agar Sabouraud suplementada con antibiótico (Cloranfenicol 1 mg l⁻¹) e incubada a 37°C durante 48 h. A partir de estos cultivos se determinó la concentración celular por nefelometría.

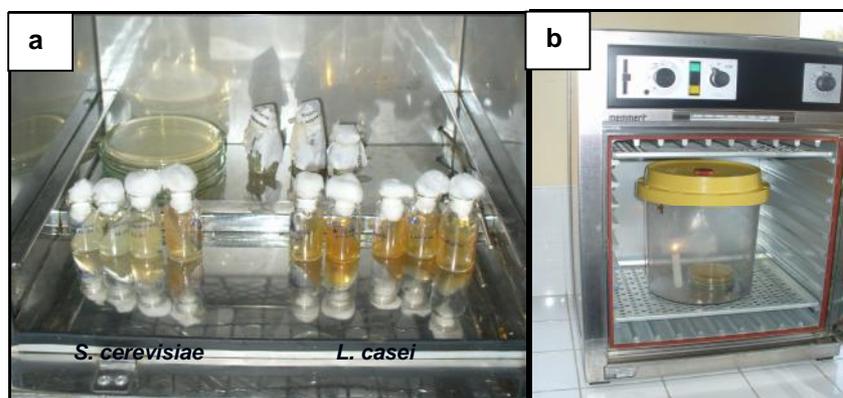


Fig. 3: a) Cepas de los probióticos empleados. b) Jarra de anaerobiosis.

2.4. Obtención de nauplios de *Artemia*

Los nauplios de *A. franciscana* se obtuvieron de cistos empacados al vacío procedente del Gran Lago Salado Utah USA (INVE Artemia Cysts) cuya eficiencia de eclosión fue de 127000 nauplios g^{-1} de cistos. Los cistos fueron hidratados durante una hora en agua dulce y decapsulados con solución de hipoclorito de sodio (5,25%) (Fig. 4a), según la metodología de Sorgeloos *et al.* (1986). Para la eclosión de los cistos decapsulados se siguió la metodología de Gómez-Gil *et al.* (1998), con algunas modificaciones, el cual consistió en emplear frascos de vidrio semi-cerrados conteniendo 210 ml de agua salobre (5‰) autoclavada (121°C x 20 min.). La densidad de siembra de cistos fue de 3 g l^{-1} y la incubación fue a 25°C, con iluminación constante abastecido por un fluorescente de 20W y aireación continua (3 l min^{-1}) obtenido de un Blower de 1/16 HP (Fig. 4a). Para prevenir la contaminación bacteriana el aire fue filtrado haciendo burbujear en una solución salina al 20% antes de ingresar a los frascos. Después de 24 h de incubación los nauplios (Fig. 4b) fueron colectados asépticamente utilizando una tela organza y lavados con agua salobre (5‰) estéril.

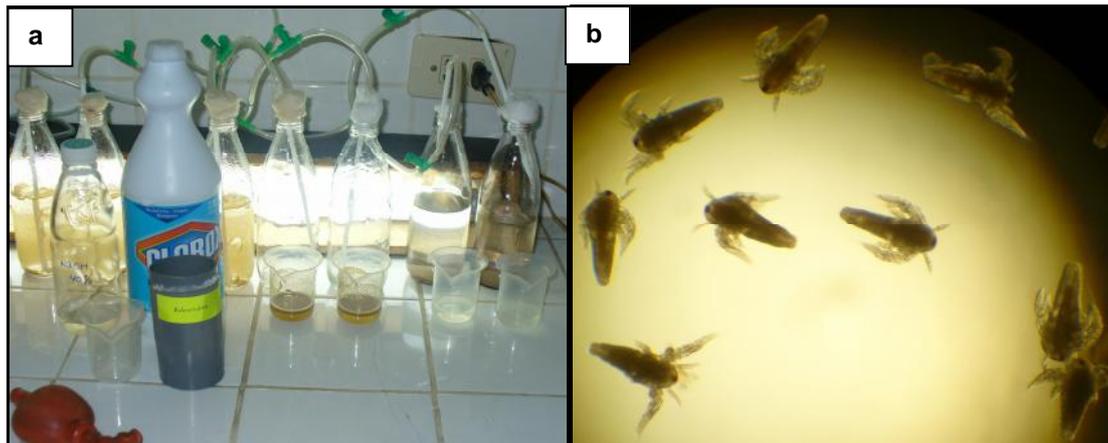


Fig. 4: Obtención de nauplios de *A. franciscana*. a) Sistema para hidratación y decapsulación de cistos e incubación de embriones decapsulados. b) Nauplios recién eclosionados visto al microscopio con 10x.

2.5. Bioencapsulación de probióticos en nauplios de *Artemia*

Para bioencapsular probióticos en nauplios de *A. franciscana* se empleó el método descrito por Agh & Sorgeloos (2005) con las modificaciones que se indican.

La emulsión de lípidos para el proceso de bioencapsulación fue preparada de acuerdo a la metodología de Portugal *et al.* (2003), el cual consistió en mezclar 5 g de aceite crudo de pescado y 1 g de yema cruda de huevo de gallina en 100 ml de agua salobre (5‰) estéril, utilizando una licuadora eléctrica por 2 a 3 minutos. La emulsión resultante fue utilizada en el día, previa pasteurización (64,5°C x 2 min.).

La mezcla conformada por la emulsión de lípidos (150 mg l⁻¹) y la suspensión de levadura *S. cerevisiae* (10⁶ UFC ml⁻¹) o de bacteria *L. casei* (10⁷ UFC ml⁻¹), según el caso, fue adicionada a frascos de vidrio conteniendo 255 ml de agua salobre (5‰) autoclavada (121°C x 20 min.) y en seguida se adicionó los nauplios de *A. franciscana* de 24 h de edad (Instar II) a una densidad de 300 nauplios ml⁻¹. La mezcla de los frascos fue aireada (3 l min⁻¹) en forma continua y para prevenir la contaminación bacteriana el aire fue filtrado haciendo burbujear en una solución salina al 20% (Fig. 5). En esta condición los nauplios utilizados para el grupo experimental (T2 y T3) fueron mantenidos durante una hora, después del cual se obtuvo una concentración promedio de levadura de 0,25 x 10² UFC nauplio⁻¹ y de bacteria de 2,5 x 10² UFC nauplio⁻¹. En cambio, los nauplios para el grupo control (T1) fueron mantenidos solo con la emulsión de lípidos (150 mg l⁻¹) durante una hora. La cosecha de los nauplios se realizó deteniendo la aireación y concentrándolos por atracción con una fuente luminosa (20W) para luego filtrarlos en una malla organza y lavarlos con agua salobre (5‰) estéril. Los nauplios así obtenidos fueron empleados en la alimentación de larvas de camarón.



Fig. 5: Sistema para bioencapsular probióticos en nauplios de *A. franciscana*.

2.6. Larvicultura del camarón de río

El proceso de larvicultura del camarón de río fue realizado en el Laboratorio de Larvicultura de Crustáceos de la Universidad Nacional del Santa.

A) Sistema de crianza de larvas de camarón de río

Se emplearon nueve acuarios de vidrio de 8,5 l de capacidad efectiva. Cada acuario tuvo un sustrato de arcilla (2 cm de espesor) esterilizada por calor (aprox. 200°C) en una cocina eléctrica durante 20 minutos y en constante mezcla; agua salobre (20‰) y aireación continua (2 l min⁻¹). En estas condiciones el agua de cada acuario fue mantenida en maduración durante una semana antes de la siembra de larvas de camarón.

El agua de mar empleada procedió de la playa El Dorado (Nvo. Chimbote) y en el laboratorio fue filtrada en un lecho de arena fina, luego tratada con cloro (20 ppm) durante 12 h, después aireada por 24 h, luego almacenada en un tanque de fibra de vidrio de 1 m³ de capacidad. El agua de caño también fue tratada de la misma manera que el agua de mar y almacenada en un tanque de fibra de vidrio de 1 m³ de capacidad. El tiempo de almacenamiento de las aguas en los tanques no fue mayor de 30 días y durante este tiempo se mantuvieron cubiertos con plástico negro y con aireación constante. El agua salobre deseada se obtuvo por mezcla de agua de mar (35‰) con agua de caño (0‰) y almacenada en un recipiente de plástico de 200 l.

El agua de crianza larval de todos los tratamientos tuvo una salinidad inicial de 20‰, la misma que se incrementó en cada cambio de estadio larval de acuerdo a la metodología empleada por Guerra *et al.* (1983). La salinidad del agua de crianza larval de cada tratamiento fue chequeada diariamente con un refractómetro (VeeGee Modelo A366ATC, ± 1‰) y la evaporación del agua fue compensada con la adición de agua de caño de clorada. La temperatura del laboratorio fue controlada con el uso de una cocina eléctrica (500 W), lo que permitió elevar la temperatura del agua de los acuarios en los meses de Noviembre y Diciembre. El 30% del agua de cada acuario fue renovado tres veces por semana tratando de mantener la temperatura y la salinidad constantes. La limpieza de los acuarios se realizó diariamente por sifoneo de los desechos orgánicos sólidos acumulados en el sustrato.

B) Obtención de larvas de camarón de río

Se empleó una hembra ovífera de camarón de río *C. caementarius* de 6,5 cm de LT y con masa embrionaria completamente llena. Como medida profiláctica del camarón hembra y de las larvas, se siguió las recomendaciones de Gastelú & De Medeiros (1992).

Para la hembra ovífera del camarón se empleó una solución de formaldehído (200 mg l⁻¹ por 10 min). El desarrollo embrionario fue evaluado según Gómez (1985) y próximo a la eclosión de los embriones (masa embrionaria marrón claro y embrión completamente formado), el camarón fue desinfectado con una solución de formaldehído (50 mg l⁻¹ por 24 h) y trasladado a otro acuario de dos compartimentos separado por malla tipo mosquitero, para separar a las larvas de la hembra después de la eclosión, aprovechando la fototaxia positiva de las larvas (Fig. 6a) y evitar depredación. Luego, las larvas fueron concentradas con luz (Fig. 6b) para ser sifoneadas, filtradas en un tamiz de 120 μ m, lavadas con agua de caño estéril, desinfectadas en una solución de formaldehído (50 mg l⁻¹ por 1 h) a una densidad no mayor de 10 larvas ml⁻¹ (Fig. 6c), lavadas nuevamente con agua de caño estéril para ser mantenidas en un acuario y finalmente sembradas en las unidades experimentales a una densidad de 40 larvas l⁻¹.

Para el conteo de larvas de camarón a sembrar en los acuarios, se empleó el método comparativo de la población conocida, el cual consistió en contar larvas una por una hasta alcanzar la población de larvas a ser sembradas en un acuario (340 larvas) siendo depositadas en un vaso de plástico de un litro (población patrón); después se extrajeron otras larvas y se agregaron a otros vasos de plástico tratando de igualar estas poblaciones, en forma visual, con la población patrón.

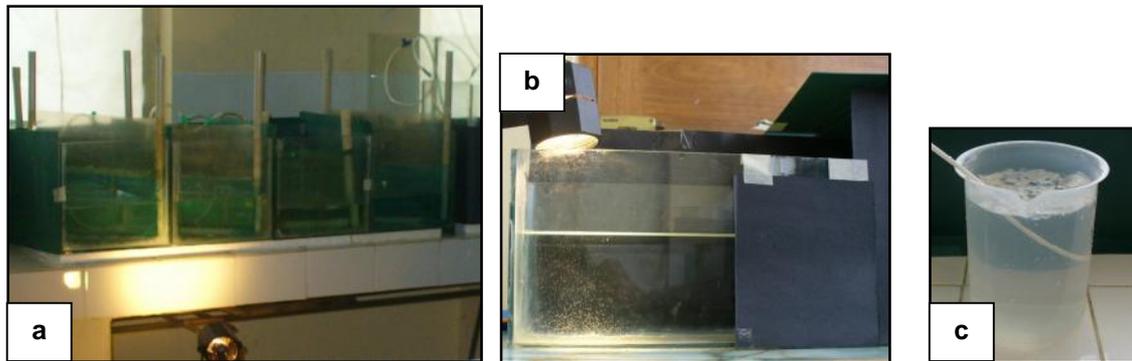


Fig. 6: Estabulación de hembras ovíferas y de larvas recién eclosionadas de *C. caementarius*. a) Hembras ovíferas en acuario acondicionado para colección de larvas. b) Concentración de larvas en acuario. c) Desinfección de larvas recién eclosionadas.

C) Alimentación de larvas de camarón de río

Las larvas de camarón de río fueron alimentadas continuamente con nauplios de *A. franciscana*, desde el día siguiente de la eclosión, a una densidad de 3 nauplios ml^{-1} dos veces por día (08:00 y 18:00 h). Los nauplios que previamente bioencapsularon a los probióticos fueron proporcionados diariamente como alimento durante los primeros siete días de crianza larval y luego cada dos días hasta el final de la experiencia. Además a partir del estadio zoea 8 se alimentó con clara de huevo cocida, la que fue particulada haciendo uso de una malla nylon y administrada *ad libitum* tres veces por semana. El comportamiento alimenticio de las larvas de camarón fue determinado utilizando la misma muestra de larvas extraídas para evaluar los estadios del desarrollo larval.

D) Evaluación del desarrollo de larvas de camarón de río

Estadios del desarrollo larval

Cada dos días se extrajo una muestra al azar de 10 larvas de camarón por acuario para observar, con el microscopio de luz convencional, los estadios larvales según la descripción general realizada por Guerra *et al.* (1986b). Para determinar los cambios de estadio larval de la población de cada acuario, se empleó el Índice de Estadio Larval (IEL) propuesto por Manzi & Maddox (1976) para *M. rosenbergii*:

$$\text{IEL} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ larvas en cada estadio} \times \text{N}^\circ \text{ de estadio larval})}{\text{N}^\circ \text{ total de larvas en la muestra.}}$$

Para aplicar el IEL se consideró un total de 17 estadios larvales de *C. caementarius* (12 estadios zoea y 5 estadios megalopa) según Guerra *et al.* (1986b), considerándose un cambio de estadio larval cuando más del 75% estuvieron en un mismo estadio. Las fotos de los estadios larvales fueron tomadas con una cámara digital Panasonic Lumix 5X.

Tamaño de los estadios larvales

El tamaño de los estadios larvales fue determinado midiendo 10 larvas de cada estadio y de cada acuario, siendo expresado en longitud del cefalotórax (LC= Escotadura post orbital hasta el extremo superior dorsal de cefalotórax). Para obtener la LC, la larva recostada lateralmente fue medida con un ocular micrométrico (EM-15x Lomo) montado en un microscopio de luz convencional.

Supervivencia larval

La supervivencia de las larvas de camarón fue determinada por conteo de la población de larvas cada semana, empleando el método volumétrico.

2.7. Análisis microbiológico de larvas de camarón

El recuento total (UFC larva⁻¹) de levadura, *Lactobacillus*, *Vibrio* y bacterias aerobias mesófilas viables (Bamv) presentes en el tracto digestivo de las larvas del camarón de río, fue determinada en los estadios larvales 1, 2, 7 y 12 de cada tratamiento. Para ello se procesó 10 larvas de dos repeticiones de cada tratamiento. Las larvas fueron colectadas en condiciones estériles, lavadas, maceradas en un mortero y suspendidas en solución salina fisiológica para luego extraer 0,1 ml para ser sembradas en agar Sabouraud suplementado con antibiótico (Cloranfenicol 1 mg l⁻¹) para conteo de levaduras después de 48 h de incubación a 37°C; en agar MRS para conteo de *Lactobacillus* después de 5 días de incubación a 37°C; en agar TCBS para conteo de *Vibrio* total después de 24 h a 37°C y en

agar nutritivo para conteo de Bamv después de 24 h a 37°C. Además se realizó coloración Gram de las larvas de camarón con signos de enfermedad.

2.8. Monitoreo de la calidad del agua de crianza larval

La calidad físico química del agua de crianza de larvas de camarón fue determinada al inicio de la experiencia y luego monitoreada semanalmente midiendo temperatura, oxígeno disuelto, solubilidad del oxígeno (Oxímetro digital Hach LDO10 \pm 0,01 mg l⁻¹) y pH (pHmetro digital 110 \pm 0,01 unidades).

La calidad microbiológica del agua de crianza de larvas de camarón se realizó de solo una repetición de cada tratamiento y fue evaluada al inicio del acondicionamiento de los acuarios, al final del período de maduración del agua (después de 7 días) y luego a los 30 y 50 días de crianza larval. Para ello se empleó la técnica de recuento de microorganismos según Aragón & Bengoechea (2003). Las muestras de agua fueron extraídas con pipeta estéril (0,1 ml) y sembradas en agar Sabouraud suplementado con antibióticos (Cloranfenicol 1 mg l⁻¹) para conteo de levaduras después de 48 h de incubación a 37°C; en agar MRS para conteo de *Lactobacillus* después de 5 días de incubación a 37°C; en agar TCBS para conteo de *Vibrio* total después de 24 h a 37°C y en agar nutritivo para conteo de Bamv después de 24 h a 37°C.

9. Análisis estadístico

Se empleó el diseño estadístico completamente al azar, para lo cual se determinó la homogeneidad de varianza y luego se aplicó análisis de varianza de una vía y se realizó comparación de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el Software SPSS versión 12 para Windows. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

3.1. Duración del desarrollo larval

En la Fig. 7, se muestra los principales estadios larvales de *C. caementarius* obtenidos en la experiencia.

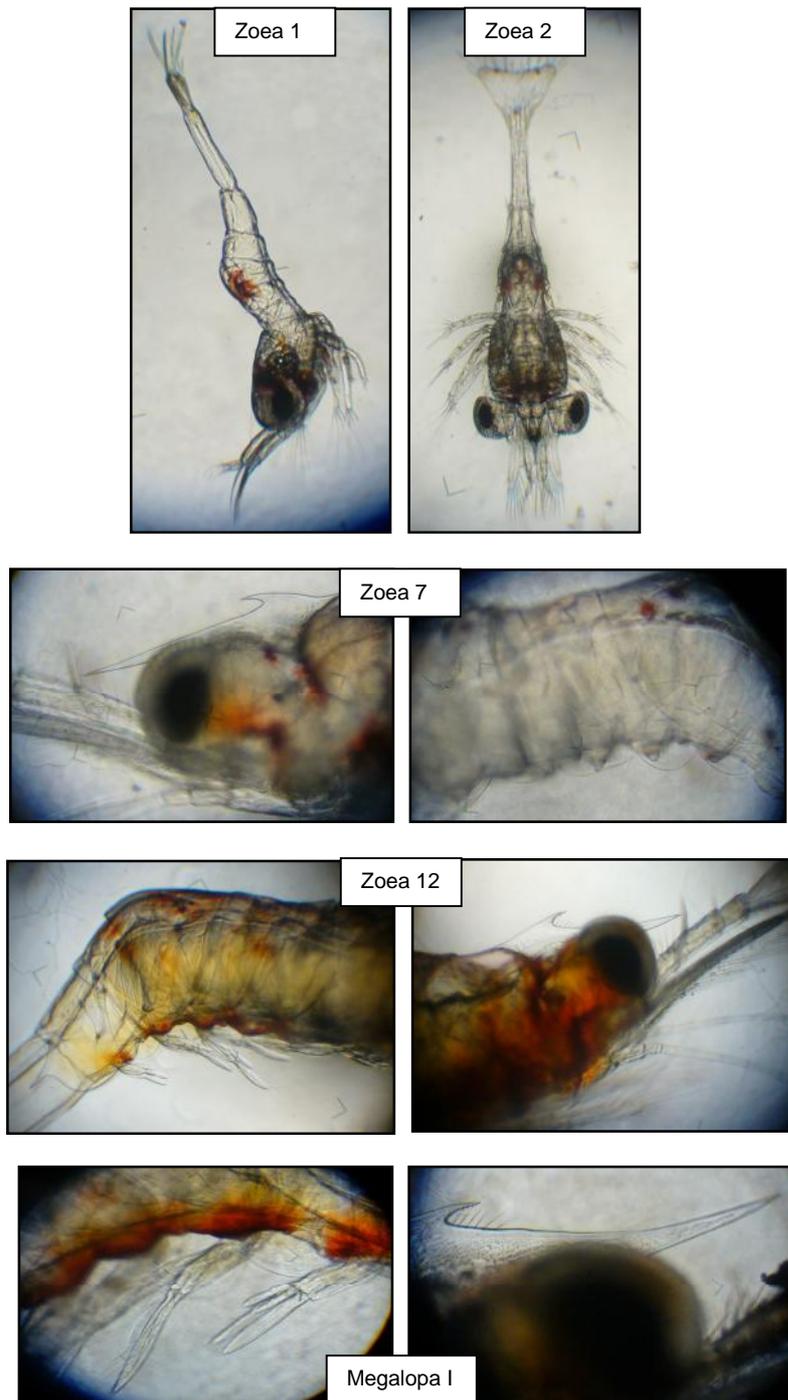


Fig. 7: Principales estadios larvales de *C. caementarius*.

En el Cuadro 1 y en la Fig. 8, se observa que la duración de los estadios larvales recientes (hasta zoea 6) de *C. caementarius* demoró entre 3 a 5 días en todos los tratamientos. En estadios larvales intermedios (desde zoea 7 hasta zoea 12) del tratamiento con aceite de pescado, el paso de zoea 8 a zoea 9 y hacia los siguientes estadios larvales demoró más de seis días. En las larvas alimentadas con el probiótico *L. casei* el paso de zoea 6 a zoea 7 demoró seis días, luego se normalizó a partir de zoea 8 hasta zoea 10 demorando entre tres a cinco días, y desde zoea 11 la demora de cambio de estadio larval fue mayor de seis días. En las larvas alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* los cambios de todos los estadios larvales demoraron entre tres a cinco días. Para el cambio hacia los estadios megalopa I y II en los tratamientos con *L. casei* y *S. cerevisiae*, la demora fue de 19,5 y 12 días, respectivamente.

Cuadro 1: Duración (días ± Ds) de los estadios larvales de *C. caementarius*, según tratamientos.

Estadios larvales	Tratamientos		
	Aceite de pescado	<i>L. casei</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Zoea 1	0,0	0,0	0,0
2	4,0 ± 0,0 ^a	2,7 ± 0,0 ^b	3,0 ± 0,0 ^{ab}
3	3,3 ± 0,6 ^a	3,3 ± 0,0 ^a	4,0 ± 0,0 ^a
4	2,7 ± 0,6 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	3,7 ± 1,0 ^a
5	3,7 ± 0,6 ^a	4,0 ± 0,0 ^a	3,3 ± 1,0 ^a
6	4,3 ± 1,5 ^a	5,0 ± 1,7 ^a	4,7 ± 0,6 ^a
7	3,7 ± 0,6 ^a	6,3 ± 1,1 ^b	3,3 ± 0,6 ^a
8	4,3 ± 1,2 ^a	3,7 ± 1,5 ^a	4,0 ± 0,0 ^a
9	8,0 ± 1,7 ^a	4,0 ± 1,0 ^a	5,3 ± 2,1 ^a
10	6,0 ± 2,0 ^a	5,3 ± 1,5 ^a	4,3 ± 0,6 ^a
11	7,5 ± 3,5 ^a	8,7 ± 2,9 ^a	3,7 ± 0,6 ^a
12		6,5 ± 0,7 ^a	5,3 ± 1,2 ^a
Megalopa I		19,5 ± 0,7 ^a	5,0 ± 1,4 ^b
Megalopa II			12,0

Valores con el mismo superíndice en una fila, indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$). Ds: Desviación estándar.

Además, en la Fig. 8, se observa que en el tratamiento con el probiótico *S. cerevisiae* se alcanzó el estadio zoea 12 y megalopa I a los 44 y 50 días, respectivamente, en cambio con el probiótico *L. casei* se alcanzó a los 52 y 64 días, respectivamente. En el tratamiento control el estadio zoea 12 fue observado a los 50 días de crianza.

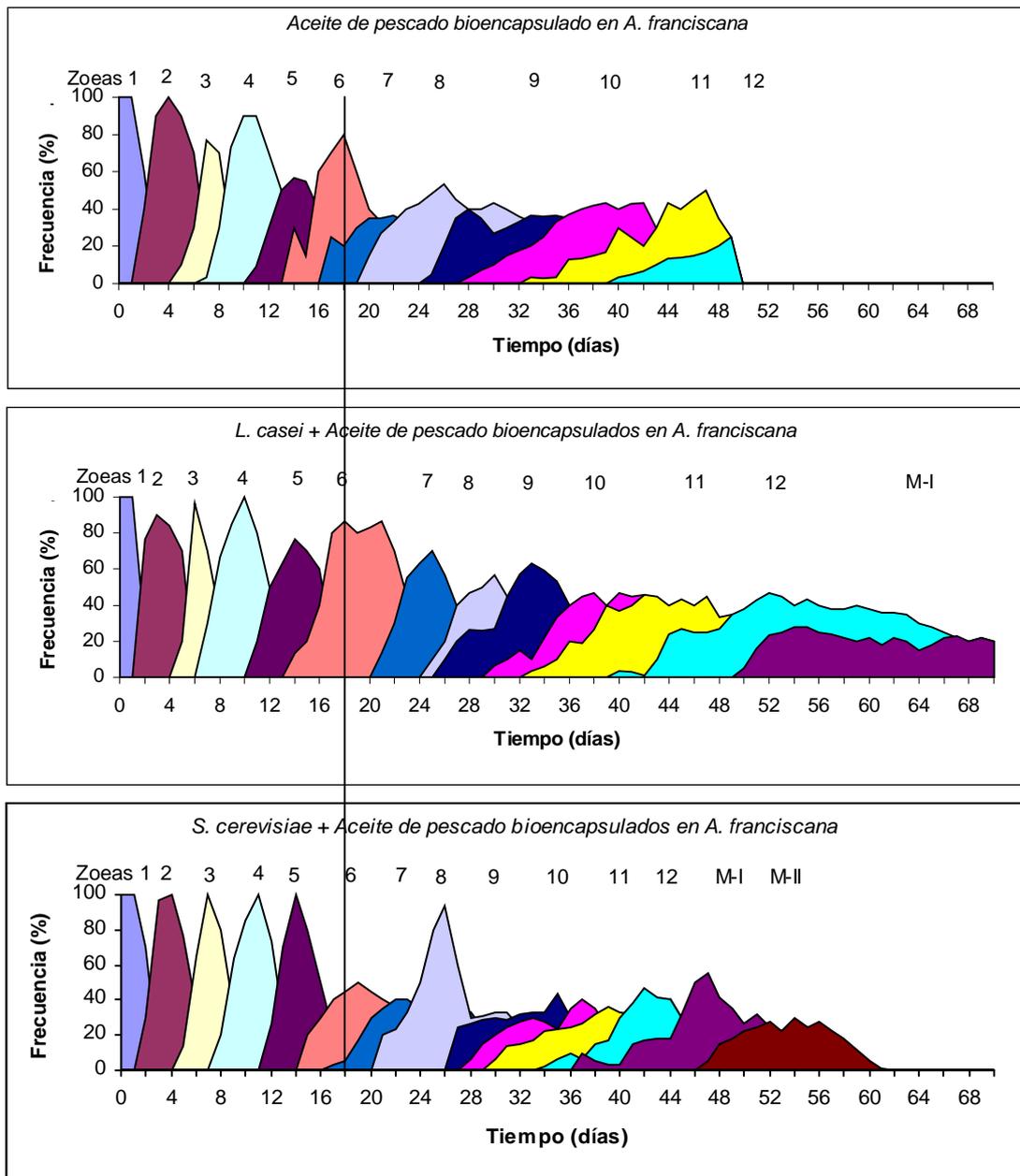


Fig. 8: Desarrollo de los estadios larvales (zoea y megalopa) de *C. caementarius* a través del tiempo, según tratamientos. M-I y M-II : Megalopa I y II respectivamente.

Por otro lado, si observamos las bases de las curvas del desarrollo de cada estadio larval de la Fig. 8, se nota la presencia de tres ó más poblaciones de larvas de diferentes estadios en un tiempo determinado a partir de zoea 7 en el tratamiento con *S. cerevisiae* y en el tratamiento control.

En relación con el comportamiento de las larvas de *C. caementarius*, los primeros estadios larvales (hasta zoea 6) fueron muy gregarios, planctónicos, con vigorosa natación y con

fototaxismo positivo acentuado. Pero a medida que avanzaron en su desarrollo la dispersión larval en los acuarios fue más notoria en todos los tratamientos.

3.2. Tamaño de los estadios larvales

En la Fig. 9, se muestra la longitud del cefalotórax de cada estadio larval de *C. caementarius* por tratamientos. No hubo diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) en el tamaño de las larvas de los tres tratamientos hasta zoea 7, y las larvas crecieron desde un LC promedio de $238,66 \pm 4,26 \mu\text{m}$ (zoea 1) hasta un LC promedio de $648,10 \mu\text{m}$ (zoea 7).

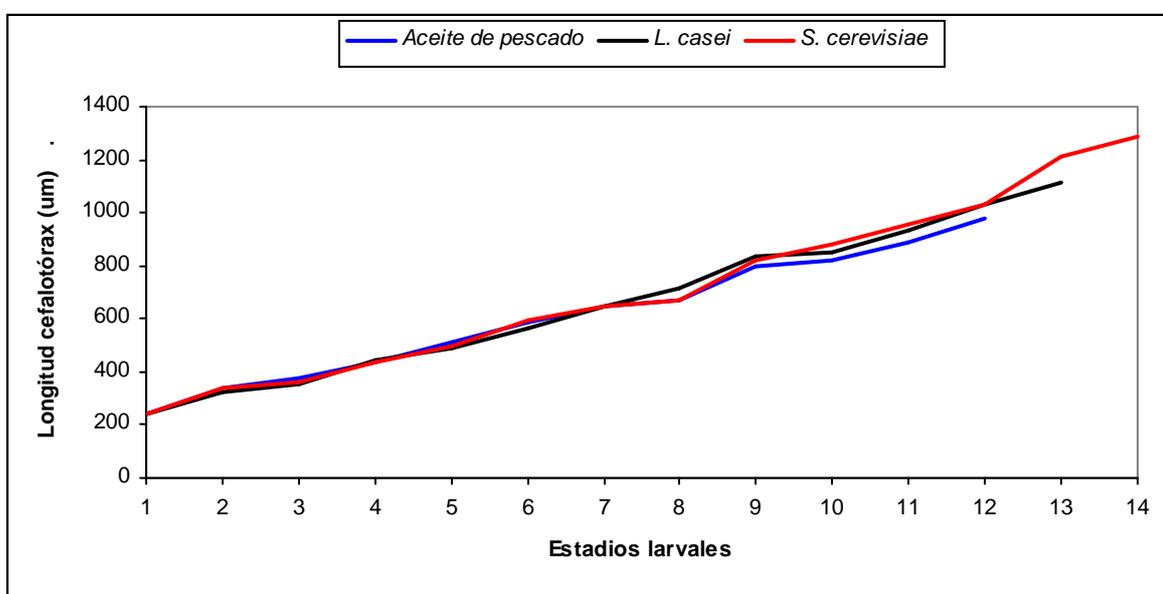


Fig. 9: Longitud del cefalotórax (μm) de los estadios larvales de *C. caementarius*, por tratamientos. Los estadios larvales 13 y 14 corresponden a los estadios de megalopa I y II, respectivamente.

En zoea 8, el tamaño de las larvas alimentadas con aceite de pescado ($\text{LC} = 672,03 \pm 19,51 \mu\text{m}$) y con *S. cerevisiae* ($\text{LC} = 666,75 \pm 7,38 \mu\text{m}$) fue estadísticamente igual ($p > 0,05$), pero significativamente menores a aquellas alimentadas con el probiótico *L. casei* ($\text{LC} = 720,01 \pm 7,0 \mu\text{m}$). En zoea 9 no hubo diferencias estadísticas ($p > 0,05$) en el tamaño de las larvas de los tres tratamientos.

En zoea 10, el tamaño de las larvas de *C. caementarius* alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* fueron estadísticamente las más grandes ($\text{LC} = 880,49 \pm 1,97 \mu\text{m}$) en comparación con las alimentadas con el probiótico *L. casei* ($\text{LC} = 852,50 \pm 11,19 \mu\text{m}$) y con aceite de pescado ($\text{LC} = 822,83 \pm 4,20 \mu\text{m}$).

En zoea 11, el tamaño de las larvas de *C. caementarius* alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$) y más grandes ($LC = 955,68 \pm 23,44 \mu m$) que aquellas alimentadas con el probiótico *L. casei* ($LC = 934,64 \pm 18,92 \mu m$) y con aceite de pescado ($LC = 886,62 \pm 36,74 \mu m$).

En zoea 12 el tamaño de las larvas de *C. caementarius* alimentadas con los probióticos *S. cerevisiae* ($LC = 1033,79 \pm 19,43 \mu m$) y *L. casei* ($LC = 1034,51 \pm 22,63 \mu m$) fueron estadísticamente iguales ($p > 0,05$), pero ambas a la vez fueron diferentes ($p < 0,05$) a las alimentadas con aceite de pescado ($LC = 978,44 \pm 8,21 \mu m$).

En megalopa I, el tamaño de las larvas de *C. caementarius* alimentadas con los probióticos *S. cerevisiae* ($LC = 1209,77 \pm 40,39 \mu m$) y *L. casei* ($LC = 1111,12 \pm 51,46 \mu m$) fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). En el tratamiento con *S. cerevisiae* la megalopa II obtuvo un LC de $1285,43 \pm 23,00 \mu m$.

3.3. Supervivencia de larvas

En la Fig. 10, se muestra la supervivencia de las larvas de *C. caementarius* durante el tiempo de la experiencia.

En todos los tratamientos hubo alta supervivencia larval (aprox. 95%) hasta la segunda semana de crianza, después del cual disminuyó bruscamente hasta la tercera semana en los tres tratamientos. Entre la tercera y quinta semana la supervivencia fue estadísticamente igual entre tratamientos y en promedio fue de 32%. En la semana 6 de crianza la más alta supervivencia larval fue obtenida en el tratamiento con el probiótico *L. casei* (36,13%) siendo esta similar, estadísticamente que el tratamiento con el probiótico *S. cerevisiae* (24,71%), pero ambas fueron diferentes que el tratamiento control (22,54%). En la semana 7, la supervivencia de las larvas del tratamiento con el probiótico *L. casei* (29,60%) fue estadísticamente mayor que las del tratamiento con el probiótico *S. cerevisiae* (11,01%) y con las del tratamiento control (13,23%). En la semana 8, la supervivencia de las larvas del tratamiento con *L. casei* fue del 30%, significativamente superior a la del tratamiento con *S. cerevisiae* que fue del 4,8%. En la semana 10 la supervivencia de las larvas alimentadas con *L. casei* fue del 0,78%.

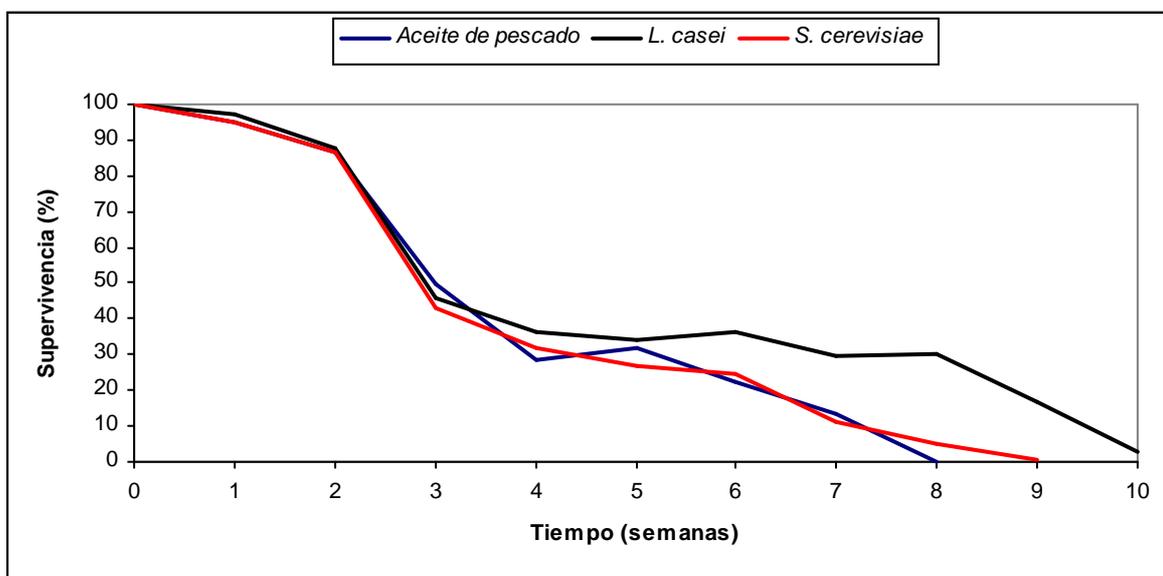


Fig. 10: Supervivencia de larvas de *C. caementarius* a través del tiempo de crianza, según tratamientos.

A partir de los 32 días de crianza la disminución de la supervivencia de las larvas de *C. caementarius* fue ocasionada por la aparición fortuita de una enfermedad bacteriana (bacilos Gram negativos), cuyos signos más evidentes fueron las manchas oscuras y amarillentas que afectó el cuerpo de las larvas, el telson y los apéndices cefalotorácicos (Fig. 11), presentándose en todos los tratamientos en tiempos distintos (Fig. 12).



Fig. 11. Larva de *C. caementarius* enferma. Note la presencia de manchas oscuras y amarillentas en todos los apéndices cefalotorácicos.

En la Fig. 12, se muestra la frecuencia con que las larvas de *C. caementarius* se enfermaron. En las larvas del tratamiento control la enfermedad fue detectada a los 36 días de crianza, en cambio en las larvas alimentadas con el probiótico *L. casei* la enfermedad fue detectada

a los 32 días y en las larvas alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* la enfermedad apareció a los 34 días de crianza. A los 50 días de crianza el 100% de las larvas de todos los tratamientos estuvieron enfermas.

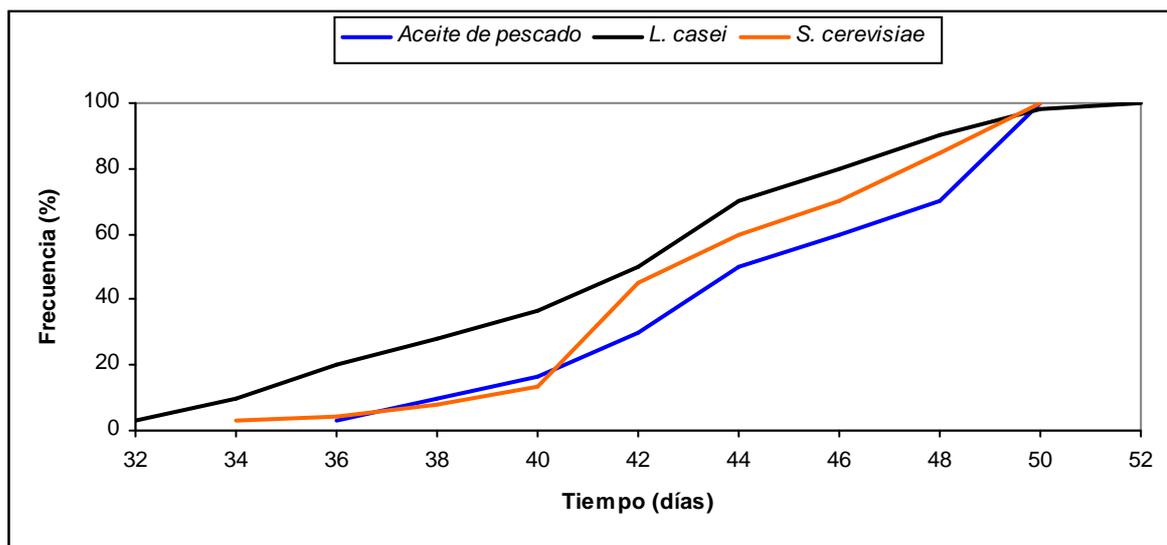


Fig. 12. Frecuencia de aparición de larvas enfermas de *C. caementarius* por tratamientos, a través del tiempo.

La muerte de toda la población de larvas del tratamiento control se produjo a los 50 días de crianza habiendo desarrollado hasta el estadio zoea 12; las del tratamiento con el probiótico *S. cerevisiae* se produjo a los 62 días de crianza, estando en estadio megalopa II y la del tratamiento con el probiótico *L. casei* se produjo a los 75 días, habiendo alcanzado el estadio megalopa I.

El comportamiento natatorio y alimenticio de las larvas enfermas de *C. caementarius* fue normal al comienzo de la enfermedad, pero después las larvas tuvieron dificultad para nadar y comer, permaneciendo sobre el sustrato pero con signos de vida.

3.4. Comportamiento alimentario de larvas de camarón

Los primeros estadios larvales de *C. caementarius* (zoea 2 a zoea 6) consumieron generalmente las partes blandas del abdomen de los nauplios de *A. franciscana* mas no la cabeza ni el intestino de los nauplios (Fig. 13).



Fig. 13. Larvas recientes de *C. caementarius* alimentándose de las partes blandas de los nauplios de *A. franciscana*.

De manera similar sucedió con los estadios más avanzados (zoeas 10 a zoea 12) además de recoger materia orgánica particulada del sustrato, aunque en algunas oportunidades se les observó ingerir parte del tracto digestivo pero no a los nauplios completos (Fig. 14).

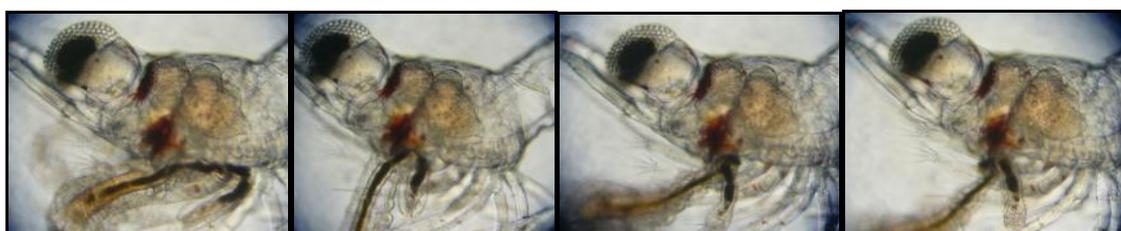


Fig. 14. Larvas recientes de *C. caementarius* alimentándose de una parte del tracto digestivo de los nauplios de *A. franciscana*.

La alimentación de las larvas de *C. caementarius* desde zoea 8 en los tres tratamientos, con partículas de clara de huevo cocida fue muy bien aceptada (Fig. 15).



Fig. 15. Larvas recientes de *C. caementarius* alimentándose de partículas de clara de huevo cocida.

3.5. Análisis microbiológico de larvas de camarón

En la Fig. 16, se muestra las colonias aisladas del tracto digestivo de las larvas de *C. caementarius*. En la Fig. 17, se muestra el recuento total de bacterias y levaduras de diferentes estadios larvales de *C. caementarius*. Desde zoea 1 hasta zoea 7, hubo un incremento considerable de las bacterias aerobias mesófilas viables (Fig. 16a) para luego disminuir en zoea 12. No se detectó levaduras en ninguno de los tratamientos, excepto en zoea 12 en el tratamiento con el probiótico *S. cerevisiae*. No se observó crecimiento de *Lactobacillus* en ninguno de los tratamientos sino hasta zoea 7, pero en baja concentración. *Vibrio* estuvo presente desde zoea 2 hasta zoea 7 en todo los tratamientos, observándose colonias amarilla (Fig. 16b), aunque hubieron también colonias verdes.

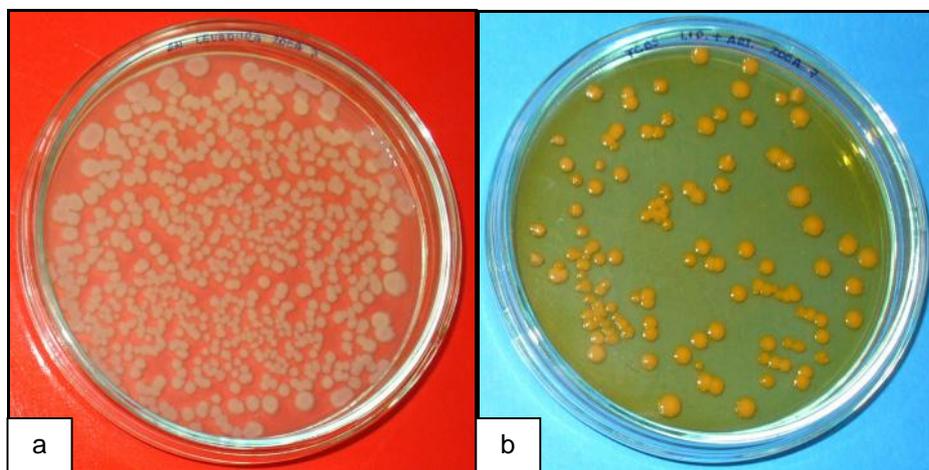


Fig. 16. Colonias aisladas del tracto digestivo de larvas de *C. caementarius*. a) Colonias de bacterias aerobias mesófilas viables. b) Colonias de *Vibrio*.

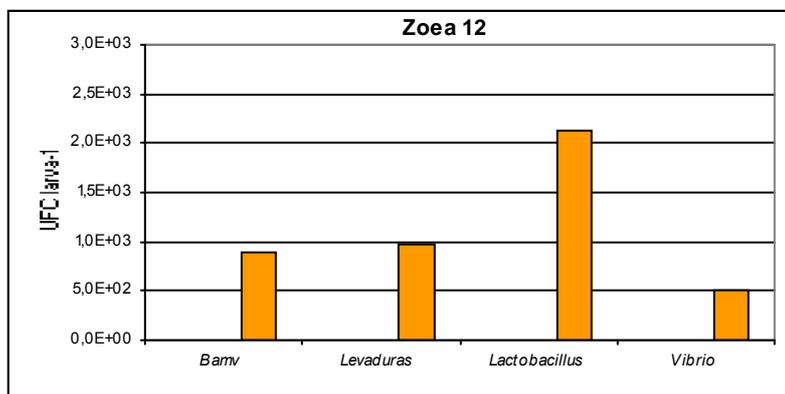
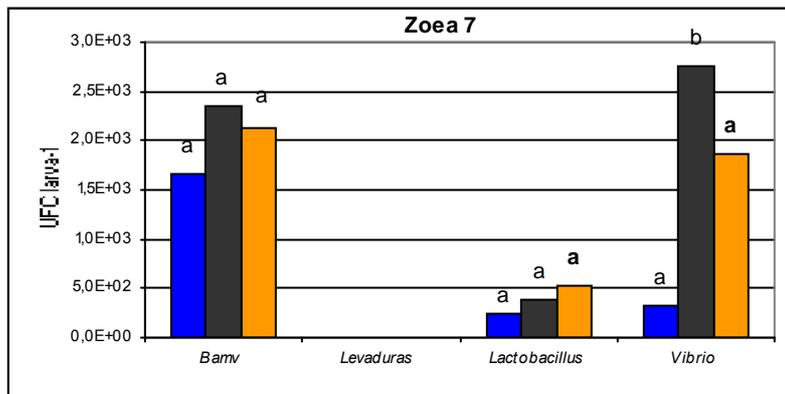
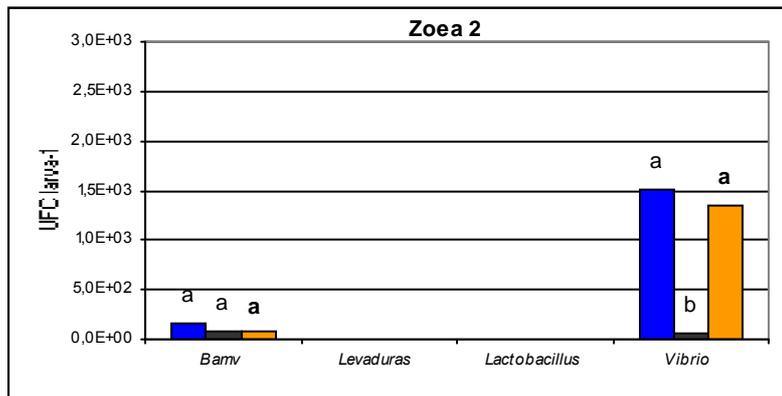
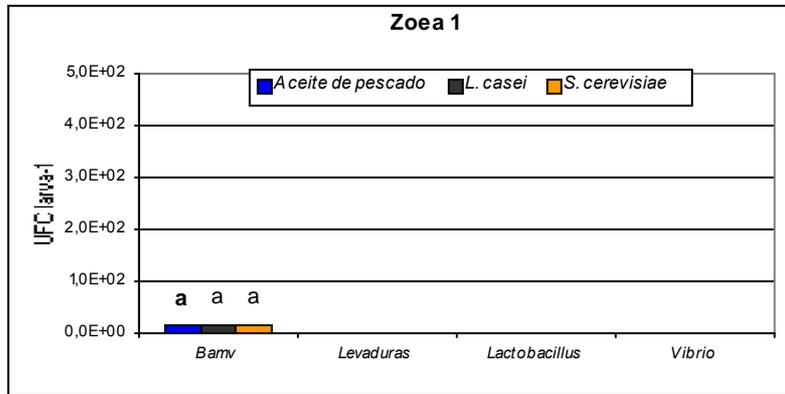


Fig. 17. Recuento total de bacterias y levaduras (UFC larva⁻¹) en los estadios de zoeas 1, 2, 7 y 12, según tratamientos. Valores con igual letra indican que no hay diferencias estadísticas significativas (p>0,05).

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó que el desarrollo larval de *C. caementarius* fue mejorado cuando las larvas fueron alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* en comparación con aquellas alimentadas con el probiótico *L. casei*, pero cuando las larvas mostraron signos de estar enfermas en todos los tratamientos, las larvas alimentadas con *L. casei* fueron las que sobrevivieron más tiempo. Aunque en el presente trabajo no estudiamos los mecanismos por el cual los probióticos ocasionaron efectos diferentes en el desarrollo larval del camarón, sin embargo, por los resultados obtenidos y como se explicará más adelante, las cepas probióticas contribuyeron con el desarrollo y la salud de las larvas.

El desarrollo larval de *C. caementarius* alimentado con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* fue homogéneo y acelerado porque los cambios de estadios larvales demoraron entre 3 a 5 días y los estadios zoea 12 y megalopa I se obtuvieron a los 44 y 50 días de crianza, es decir 8 y 14 días antes que con el probiótico *L. casei*, respectivamente (Cuadro 1, Fig. 8). Estos resultados sugieren que las larvas de camarón alimentadas con *S. cerevisiae* utilizaron mejor los nutrientes del alimento proporcionado. Se conoce que la levadura degrada las macromoléculas proteicas hasta aminoácidos y produce vitaminas (Lara *et al.*, 2002) y los compuestos difíciles de digerir los hace asimilables (Irianto & Austin, 2002), lo cual es de importancia para estadios larvales críticos debido al inicio de la función del aparato digestivo como las zoeas 2, 3 y 4 de *C. caementarius* reportados por Morales (1997), pero en la experiencia estos estadios recientes fueron superados con el probiótico *S. cerevisiae*. Además, en estadios larvales recientes de carídeos hay cambios fisiológicos normales del sistema digestivo que ocasiona limitada capacidad digestiva por falta del divertículo anterior en el intestino medio (Kumlu, 1999) y en larvas de especies como *M. rosenbergii* y *Palaemon elegans* hay un incremento de la actividad de la tripsina en estadios zoeas 5 y 6, que esta relacionado con el desarrollo del intestino y con la expansión del hepatopáncreas (Kumlu & Jones, 1995).

Considerando lo mencionado anteriormente también es probable que la presencia del probiótico *S. cerevisiae* dentro del tracto gastrointestinal de las larvas de *C. caementarius* permitió mejorar la asimilación de los ácidos grasos esenciales del aceite de pescado por

cuanto el desarrollo de las larvas obtenido con este probiótico fue mejor que con aquellas del tratamiento control que solo fueron alimentadas con aceite de pescado (Fig. 8). Salas *et al.* (2002) determinaron que el aceite crudo de pescado producido en el Perú, posee mayor contenido de eicosapentanoico (EPA) (10,7 a 17,4%) respecto al ácido docosahexanoico (DHA) (4,9 a 15,9%), siendo el EPA requerido como componente estructural celular para el crecimiento del hepatopáncreas de *M. rosenbergii* desde el estadio larval 5 hasta los estadios 6 y 7 (Roustaian *et al.*, 1999) y para mejorar la larvicultura de *M. rosenbergii* en términos de supervivencia, vitalidad, metamorfosis, tamaño larval (Romdhane *et al.*, 1995) y también el desarrollo y crecimiento de larvas de *C. caementarius* pero solo hasta zoea 8 (Portugal *et al.*, 2003), porque los nauplios de *Artemia* sin enriquecer son deficientes en estos ácidos grasos esenciales (Devresse *et al.*, 1990).

Así mismo, se ha reportado que *S. cerevisiae* produce poliaminas como espermidina y espermina, que favorecen tanto la maduración del tracto digestivo (Tovar-Ramírez *et al.*, 2000) como el crecimiento y el metabolismo en peces (Gatesoupe, 2007), siendo probable que estas sustancias contribuyeron también con el desarrollo homogéneo de las larvas de *C. caementarius*, así como con el crecimiento principalmente desde zoea 10 (Fig. 9), por cuanto se ha informado que la espermina es un buen promotor del crecimiento en *L. stylirostris* (Smith *et al.*, 2000). Esto explicaría el mayor tamaño del estadio megalopa I (1209,77 µm de LC) en el tratamiento con *S. cerevisiae*, en comparación con aquellas del mismo estadio alimentadas con *L. casei* (1111,12 µm de LC).

En cambio el desarrollo fue heterogéneo y lento en las larvas de *C. caementarius* alimentadas con el probiótico *L. casei* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* porque los cambios de estadio larval demoraron entre 4 a 9 días y los estadios zoea 12 y megalopa I se obtuvieron a los 52 y 64 días de crianza, es decir 8 y 14 días más que con el probiótico *S. cerevisiae*, respectivamente (Cuadro 1, Fig. 8), lo que indica que hubo una deficiente contribución de la cepa probiótica bacteriana en el tracto gastrointestinal de las larvas de camarón que no mejoró la asimilación de los nutrientes del alimento proporcionado en los estadios larvales con deficiencias digestivas ya explicada anteriormente.

En relación con la supervivencia de las larvas de *C. caementarius* se observó que disminuyó de manera similar hasta la quinta semana de crianza en los tres tratamientos, pero una

brusca disminución fue observada entre la segunda y tercera semana de crianza (Fig. 10) cuando las larvas estuvieron en zoeas 6 y 7 (Fig. 8) siendo estos los estadios zoeas críticos de la especie que no fue superado con los probióticos proporcionados, con excepción de los estadios zoeas recientes (zoeas 2 a zoea 4) que según Morales (1997) también son críticos en el desarrollo larval de la especie. Sin embargo, entre la tercera y quinta semana de crianza, la supervivencia larval llegó a estabilizarse en aproximadamente 32% en los tres tratamientos, pero al final de este período las larvas de camarón mostraron signos de estar enfermas y por esta condición de salud la supervivencia fue diferente entre tratamientos.

Desde la aparición de larvas de *C. caementarius* con signos de enfermedad en los tres tratamientos (Fig. 11 y 12), la sobrevivencia fue disminuyendo a través del tiempo (Fig. 10), prolongándose por 16 días más en el tratamiento control, por 28 días en el tratamiento con *S. cerevisiae* y por 43 días más en el tratamiento con *L. casei*. Estos resultados y los obtenidos en el desarrollo larval, sugieren que las cepas probióticas tuvieron limitada participación para mejorar la supervivencia de las larvas enfermas, probablemente por la escasa ingestión de probióticos pues las larvas de camarón mostraron ser selectivas al ingerir las partes blandas (Fig. 13) y en algunos casos parte del tracto digestivo de los nauplios de *A. franciscana* (Fig. 14). Así mismo es probable también que la baja concentración de probióticos bioencapsulados en los nauplios de *A. franciscana* no contribuyeron con el mejoramiento de la salud de las larvas. Con *S. cerevisiae* los nauplios bioencapsularon $0,25 \times 10^2$ UFC nauplio⁻¹, en cambio Espinosa *et al.* (2002) reportan bioencapsulación de la levadura *P. pastoris* hasta $0,84 \times 10^2$ UFC nauplio⁻¹. Con *L. casei* se logró bioencapsular $2,5 \times 10^2$ UFC nauplio⁻¹, siendo este el primer reporte sobre la bioencapsulación de esta cepa bacteriana, sin embargo con especies de *Vibrio* se llega a bioencapsular $2,7 \times 10^3$ UFC nauplio⁻¹ en 45 minutos (Gómez-Gil, 1988).

Además de lo mencionado, la acción de los probióticos empleados en la experiencia debe haber estado limitado porque levadura fue detectada recién en zoea 12 y *Lactobacillus* desde zoea 7 en los tres tratamientos (Fig. 17), lo cual sugiere que los probióticos no colonizaron el tracto digestivo de las larvas de *C. caementarius* y por consiguiente su acción fue realizada durante el tiempo de permanencia en el tracto digestivo. En este caso, el tiempo de evacuación gástrica y la frecuencia de muda de las larvas de camarón fue lo que contribuyó a la eliminación de los probióticos. En el caso del tiempo de evacuación

gástrica de las larvas que no fue medida pero de acuerdo a lo observado fue similar a la de *M. rosenbergii* que es de 20 y 50 minutos en zoea 2 y 10, respectivamente (Kumlu & Jones, 1995). Así mismo, se conoce que la muda es más frecuente en estadios larvales y durante la ecdisis hay desprendimiento de la cutícula del intestino anterior y posterior, como sucedió en las zoeas de *L. vannamei* lo cual impidió la colonización bacteriana (Simões *et al.*, 2002). Por consiguiente es necesario tener en cuenta este comportamiento alimentario de las larvas para futuros trabajos en donde se debe incrementar tanto la concentración de probióticos bioencapsulados en los nauplios de *A. franciscana* como la frecuencia de alimentación para mejorar el efecto probiótico deseado.

La diferente duración de la supervivencia de las larvas de *C. caementarius* desde que estuvieron enfermas, corrobora primero la mejor condición nutricional de aquellas alimentadas con *S. cerevisiae* (sobrevivieron 28 días más), en comparación con las del tratamiento control (sobrevivieron 16 días más), al tener mayores defensas para resistir la enfermedad, pues la presencia de varias poblaciones de larvas de diferentes estadios a partir de zoea 7 (Fig. 8) fue indicadora de un retraso del desarrollo por deficiente condición larval. Estos resultados sugieren además que las larvas de camarón fueron estimuladas levemente por la presencia de glucanos como consecuencia de una mayor digestibilidad de la cepa probiótica *S. cerevisiae* al pasar primero por el tracto gastrointestinal de los nauplios de *A. franciscana* y luego por el de las larvas, pues es conocido que los glucanos se encuentran en la pared interna de la levadura (Zlatkovic *et al.*, 2003) y mantiene el estado activo de protección inmunológica en langostinos (Burgents *et al.*, 2004). Sin embargo, esto no fue suficiente para una prolongada resistencia de las larvas enfermas.

En segundo lugar, la mayor duración de la supervivencia (43 días más) de larvas enfermas de *C. caementarius* alimentadas con el probiótico de *L. casei*, sugiere que el efecto probiótico de dicha cepa fue eventualmente expresado en presencia de patógenos, lo cual según Marques *et al.* (2005) lo presentan algunas bacterias. Por consiguiente, esta cepa bacteriana aún en baja concentración, fue capaz de dar protección a las larvas de camarón para resistir el ataque de patógenos pero no fue suficiente para mantener la supervivencia por más tiempo. Aunque no fue comprobada en la experiencia los mecanismos que permitieron el mantenimiento de la supervivencia de estas larvas enfermas, pero por la información disponible sobre las BAL, el probiótico *L. casei* debe haber tenido limitaciones

para activar con eficiencia ciertos mecanismos que permiten suprimir el crecimiento de patógenos como la producción de ácidos orgánicos (Ajitha *et al.*, 2004; El-Naggar, 2004), de bactericidas (Yang, 2000; Estrada *et al.*, 2005; Pabmanadha *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2006) o de mejorar la respuesta inmune de los organismos (Balcázar *et al.*, 2006). También es probable que el origen de la cepa bacteriana haya contribuido con dichos resultados debido a que no fue aislada del tracto digestivo o del ambiente del camarón, por cuanto Ramírez *et al.* (2006) consideran que los microorganismos aislados del intestino de un animal tienen mayor adaptabilidad a las condiciones intestinales que los obtenidos de otras fuentes.

Por consiguiente, de acuerdo a la manera como ambas cepas probióticas contribuyeron con el desarrollo y la salud de las larvas de *C. caementarius* y de no haberse enfermado las larvas de todos los tratamientos, aquellas larvas alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* que en 50 días desarrollaron hasta megalopa I (incluso fue observada megalopa II), hubiesen alcanzado la metamorfosis en menor tiempo que las alimentadas con el probiótico *L. casei*, por cuanto Guerra *et al.* (1986b) describen cinco estadios megalopa antes de la metamorfosis a juvenil de la misma especie y Guerra *et al.* (1986a) obtuvieron los primeros juveniles en 60 días de crianza larval.

La presencia de *Lactobacillus* en el estadio zoea 7 de *C. caementarius* (Fig. 17) en los tres tratamientos, sería indicadora de contaminación cruzada, cuya principal fuente de contaminación fue el agua (Fig. 22), pero esto no alteró los resultados obtenidos, debido a que no hubo mejoría en la salud de las larvas de camarón alimentadas con *S. cerevisiae* ni en aquellas del tratamiento control, probablemente porque *Lactobacillus* no tuvieron una permanencia estable en el agua de crianza larval y más bien disminuyó con el tiempo porque hubo cambios de agua frecuentes; de igual manera, *Saccharomyces* solo fue detectado en el agua casi al final de la experiencia. Esto indicaría que las condiciones ambientales del agua de crianza larval dificultaron la proliferación de las cepas probióticas empleadas aún cuando Gatesoupe (2007) considera que las levaduras crecen en ambientes donde los sustratos orgánicos están disponibles.

En cambio las bacterias aerobias mesófilas viables incrementaron con el tiempo de crianza en todos los tratamientos, alcanzando a los 50 días entre $4,0 \times 10^2$ UFC ml⁻¹ y $1,1 \times 10^3$

UFC ml⁻¹ (Fig. 22), probablemente por la acumulación de materia orgánica observada en el sustrato, lo que ocasionó que el oxígeno (Fig. 19) y el pH (Fig. 21) del agua de crianza larval disminuyan con el tiempo en todos los tratamientos. Kennedy *et al* (2006) encontraron que el incremento del conteo de bacterias totales de $1,38 \times 10^3$ a $3,0 \times 10^5$ UFC ml⁻¹ en el agua de crianza de larvas de *M. rosenbergii* fue atribuido a la alta carga de materia orgánica.

Por otro lado, la ausencia de *Vibrio* en el agua de crianza larval (Fig. 22) podría ser consecuencia de la frecuencia con que se realizó los cambios de agua. Sin embargo, esto no limitó la presencia de *Vibrio* en el tracto gastrointestinal de las larvas de *C. caementarius* desde zoea 2 (Fig. 17), lo cual sugiere que *Vibrio* ingresa fácilmente, pero no fue patógeno para las larvas de camarón, de lo contrario estas hubiesen muerto en estadios recientes del desarrollo, principalmente en el tratamiento control. Vandenberghe *et al.* (1999) consideran que *V. alginolyticus* está presente en estadios recientes del desarrollo de *L. vannamei* y está asociado con larvas saludables. Además, Moriarty (1999) considera que la flora intestinal de langostinos es frecuentemente dominada por especies de *Vibrio* sacarosa negativo (colonias verdes en agar TCBS) y luminosas en presencia de tratamiento con antibióticos, mientras que las especies sacarosa positivo (colonias amarillas en agar TCBS) son usualmente más abundantes cuando es usado probióticos. Similar color amarillo de las colonias fue encontrado en este trabajo (Fig. 17).

Los parámetros ambientales del agua de crianza de los acuarios de todos los tratamientos se encontraron dentro de los rangos normales (Cuadro 2) sugeridos por New & Singholka (1982) para *M. rosenbergii*, no existiendo diferencias significativas en concentración y saturación de oxígeno y de pH entre tratamientos, lo cual significa que los probióticos que crecieron en el agua no alteraron la calidad. En cambio la temperatura del agua del tratamiento control (24,92°C) fue estadísticamente ($p < 0,05$) superior a la de los tratamientos con *L. casei* (24,45°C) y con *S. cerevisiae* (24,49°C), mostrando una amplia variación principalmente en los primeros 36 días de crianza larval (Fig. 18), ocasionado por una deficiente distribución del calor generado por el uso de una cocina eléctrica que fue utilizado para elevar la temperatura dentro del laboratorio, no obstante en el tratamiento control, los resultados obtenidos en el desarrollo larval de *C. caementarius* fueron inferiores a las de los otros tratamientos.

V. CONCLUSIONES

El efecto de los probióticos bioencapsulados en nauplios de *A. franciscana* mejoró el desarrollo larval del camarón de río *C. caementarius*, lo que se puso de manifiesto en las siguientes características:

- a. Los cambios de estadios larvales de *C. caementarius* demoraron entre 3 a 5 días cuando las larvas fueron alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* y entre 4 a 9 días cuando fueron alimentadas con el probiótico *L. casei*.
- b. Los estadios larvales zoea 12 y megalopa I de *C. caementarius* fueron alcanzados en 44 y 50 días de crianza, respectivamente, cuando las larvas fueron alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* y en 52 y 64 días cuando fueron alimentadas con el probiótico *L. casei*.
- c. El tamaño del estadio larval megalopa I de *C. caementarius* fue de 1209,77 μm de LC cuando las larvas fueron alimentadas con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* y de 1111,12 μm de LC cuando fueron alimentadas con el probiótico *L. casei*.
- d. Las larvas de *C. caementarius* alimentado con el probiótico *S. cerevisiae* bioencapsulado con nauplios de *A. franciscana* sobrevivieron 28 días más desde que mostraron signos de estar enfermas, muriendo a los 62 días de crianza en megalopa II.
- e. Las larvas de *C. caementarius* alimentado con el probiótico *L. casei* bioencapsulado en nauplios de *A. franciscana* sobrevivieron 43 días más desde que mostraron signos de estar enfermas, muriendo a los 75 días de crianza en megalopa I.

VI. RECOMENDACIONES

1. Emplear alternadamente las cepas de *S. cerevisiae* MITL51 y de *L. casei* 475 CECT bioencapsuladas en nauplios de *A. franciscana* como alimento a larvas de *C. caementarius*, de tal manera que con dicha combinación se aproveche las propiedades benéficas que posee cada cepa.
2. Determinar el tiempo de máxima bioencapsulación y de permanencia de *L. casei* y de *S. cerevisiae* en nauplios de *A. franciscana* con la finalidad de incrementar la concentración de los probióticos a ser proporcionados bioencapsulados para mejorar la larvicultura de *C. caementarius*.
3. Estudiar el potencial probiótico de la cepa de levadura *S. cerevisiae* MITL51 ensayando su uso en el alimento balanceado para larvas, postlarvas, juveniles y adultos del camarón *C. caementarius*.
4. Aislar una cepa de bacteria ácido láctica del tracto digestivo de ejemplares sanos de *C. caementarius* o del ambiente natural del camarón, para su estudio como probiótico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi, R. 2003. Use of probiotics in larval rearing of new candidate species. *Aquaculture Asia*, VIII (2): 15-16.
- Agh, N. & P. Sorgeloos. 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. Artemia & Aquatic Animals Research Center. Urmia University. Urmia. Iran. 60 p.
- Ajitha, S.; M. Sridhar; N. Sridhar; I.S.B. Singh & V. Varghese. 2004. Probiotic effects of lactic acid bacteria against *Vibrio Alginolyticus* in *Penaeus (Fenneropenaeus) indicus* (H. Milne Edwards). *Asian Fisheries Science*, 17: 71-80
- Amores, R.; A. Calvo; J.P. Maestre & D. Martínez-Hernández. 2004. Probióticos. Revisión. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 17 (2): 131-139.
- Aragón, V. & J.A. Bengoechea. 2003. Recuento de microorganismos por diluciones seriadas. p.: 55-58. In Díaz, R., C. Gamazo & I. López-Goñi (Ed.). *Manual práctico de microbiología*. 2da. Edic. Edit. Masson, S.A. Barcelona. España.
- Balcázar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: Aspectos generales. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>): 877-881.
- Balcázar, J.L.; I. De Blas; I. Ruyiz-Zarzuela; D. Cunningham; D. Vendrell & J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 114: 173-186.
- Burgents, J.E.; K.G. Burnett & L.E. Burnett. 2004. Disease resistance of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, following the dietary administration of a yeast culture food supplement. *Aquaculture*, 231: 1-8.
- Castro, G.; J. Castro; T. Castro; A. Estrada & V. García. 2005. Importancia de los probióticos en la acuicultura, utilizando *Artemia franciscana* como bioencapsulante. *Contactos*, 57: 39-43.
- Chair, M.; H.J. Nelis; P. Legar; P. Sorgeloos & P. De Leenheer. 1996. Accumulation of trimethoprim, sulfamethoxazole and N.aceylsulfamethoxazole in fish and shrimp fed medicated *Artemia franciscana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 (7): 1649-1652.
- Devresse, B.; M.S. Romdhane; M. Buzzi; J. Rasowo; P. Léger; J. Brown & P. Sorgeloos. 1990. Improved larviculture outputs in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed a diet of *Artemia* enriched with n-3 HUFA and phospholipids. *World Aquaculture*, 21 (2): 123-125.

- El-Naggar, M.Y. 2004. Comparative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Biotechnology*, 3(2):173-180.
- Espinosa, A.; C. García; E. Cabrera; A. Arenal; E. Pimentel; O. Carrillo & J. Fajardo. 2002. Bioencapsulación de levadura *Pichia pastoris* en nauplios de *Artemia salina*. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 748-753
- Estrada, A.C.; L. A. Gutiérrez, & O. I. Montoya. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp contra *Salmonella* sp y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 58 (1): 2601-2609.
- Gastelu, J.C. & J. De Medeiros 1992. Viabilidae da producao de pos-larvas do camarao *Macrobrachium rosenbergii* na larvicultura de Aquinor. Pendencias-RN-Brasil. Aquinor Aquicultura Ltda.. Brasil. 24 p.
- Gatesoupe, F.J. 2007. Live yeast in the gut: natural occurrence, dietary introduction and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267 (1-4): 20-30.
- Gómez, A. 1985. Desarrollo embrionario y larval de *Macrobrachium digueti* Bouvier (1988) en condiciones de laboratorio. Trabajo de habilitación. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 59 p.
- Gómez-Gil, B.; M.A. Herrera; F.A. Abreu-Grobois & A. Roque. 1998. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Applied and Enviromental Mircobiology*, 64 (6): 2318-2322.
- Gómez-Gil, B.; A. Roque & J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191: 259-270.
- Guerra, A.; A. Gómez; J. Montes & E. Velásquez. 1983 Desarrollo postembrionario de *Cryphiops caementarius*, Molina 1872 (Decapoda, Palaemonidae), en condiciones de laboratorio. Informe Final de Proyecto. Dirección General de Investigación. Universidad Nacional de Trujillo. 7p.
- Guerra A.; A. Gómez; W. Reyes & E. Velásquez. 1986a. Obtención de juveniles del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina (1872), en eclosería piloto. Resumen VIII Congreso Nacional de Biología. Arequipa. Perú. p. 45.
- Guerra A.; A. Gómez; W. Reyes & E. Velásquez. 1986b. Descripción de los estadios del desarrollo postembrionario del camarón de río *Cryphiops caementarius* Molina (1872) obtenidos en laboratorio. Resumen VIII Congreso Nacional de Biología. Arequipa. Perú. p. 264.

- Gullian, M. 2001. Estudio del efecto inmunoestimulante de bacterias probióticas asociadas al cultivo de *Penaeus vannamei*. Tesis Magíster en Ciencias Especialidad Acuicultura Marina. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Ecuador. 46 p.
- Hori, T.; J. Kiyoshima & H. Yasui. 2003. Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. *Biosci. Biothechnol. Biochem.* 6 (2): 420-422.
- Irianto, A. & B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. Review. *Journal of Fish Disease*, 25: 633-642.
- Kennedy, B.; N.M. Venugopal; I. Karunasagar & I. Karunasagar. 2006. Bacterial flora associated with the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in the hatchery system. *Aquaculture* 261: 1156-1167.
- Kumlu, M. & D.A. Jones. 1995. Feeding and digestion in the caridean shrimp larva of *Palaemon elegans* Rathke an *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) (Crustacea: Palaemonidae) on live and artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 1 (1): 3-12.
- Kumlu, M. 1999. Feeding and digestion in larval decapod crustaceans. *Tr. J. of Biology*, 23: 215-229.
- Lara, M.; L. Briones & M. Olivera. 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). p: 314-335. In Cruz-Suárez, L.E. et al. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Mahious, A.S. & F. Ollevier. 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: Review. 1st. *Regional Workshop on techniques for enrichment on live food for used in larviculture*. AAARC, Urmia, Irán. 3p.
- Marquez, A.; T. Dinh; C. Ipakeimidis; G. Huys; J. Swings; W. Verstraete; J. Dhont; P. Sorgeloos & P. Bossier. 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Applies and Enviromental Microbiology*, 71 (8): 4307-4317.
- Makridis, P.; Ø. Bergh; J. Skjermo & O. Vadstein. 2001. Addition of bacteria bioencapsulated in *Artemia metanauplii* to a rearing system for halibut larvae. *Aquaculture International*, 9: 225-235.
- Manzi, J.J. & M.B. Maddox. 1976. Algal supplement enhancement of static and culture of

- Macrobrachium rosenbergii* larvae. *Helgoländer Wiss. Meeresunters*, 28: 447-455.
- Martins, F.S.; F. C. Pereira; F. H. Ferreira; F. J. Penna; C. A. Rosa; R.M. Drummond; M. J. Neves & J. R. Nicoli. 2005. Estudio do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. *Revista de Biología e Ciências da Terra*, 5 (2): 1-13.
- Méndez, M. 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. *Bol. Inst. Mar Perú*, 5: 1-170.
- Merchie, G. ; P. Lavens ; J. Radull ; H. Nelis ; A. De Leenheer & P. Sorgeloos. 1995. Evaluation of vitamin C-enriched *Artemia* nauplii for larvae of the giant freshwater prawn. *Aquaculture International*, 3: 355-363.
- Morales, M.C. 1997. Desarrollo larval del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Crustacea, Decapoda) en laboratorio. Tesis. Universidad Católica del Norte. Facultad de Ciencias del Mar. Coquimbo. Chile. 120 p.
- Moriarty, D.J. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. *Microbial Interactions in Aquaculture. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds)*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- New, M.B. & S. Singholka. 1982. Freshwater prawn farming. A manual for the culture of *Macrobrachium rosenbergii*. FAO Fish. Teach. Pap., 225: 1-118.
- Padmanabha V.; M.D. Christopher & I. Sankara. 2006. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences*, 2 (4): 142-144.
- Patra, S.K. & K.S. Mohamed. 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International*, 11 (5): 505-514
- Pérez-Sotelo, L.S.; M. Talavera-Rojas; H.G. Monroy-Salazar; S. Lagunas-Bernabé; J.A. Cuarón-Ibargüengoytia; R. Montes de Oca & J.C. Vázquez-Chagoyán. 2005. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. *Rev Latinoam Microbiol*, 47 (3-4): 70-75.
- Phianphak, W.; S. Rengpipak; S. Piyatiratitivorakul & P. Menasveta. 1999. Probiotic use of *Lactobacillus* spp for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Sci. Res. Chula. Univ.*, 24 (1): 41-58.

- Portugal, S.; J. Vargas & E. Vega. 2003. Utilización del rotífero *Brachionus plicatilis* en los primeros estadios del cultivo larval del camarón de río *Chryphiops caementarius*, CIVA 2003. (<http://www.civa2003.org>): 837-850.
- Quesada, A.; M. Pozo & J. Rosa. 2004. Selección de probióticos bacterianos para su uso en el cultivo de camarón. Comunicación Técnica CIVA 2004. (<http://www.civa2004.org>): 97-100.
- Ramírez, C. 2005. Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imun. Tese da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial obtenção do Título de Doutor em Processos Biotecnológicos. 153 p.
- Ramírez, C.; B.G. Ciffoni; E.M. Pancheniak & E.F. Soccol. 2006. Microorganismos lácticos probióticos para ser aplicados en la alimentación de larvas de camarón y peces como sustituto de antibiótico. *La Alimentación Latinoamericana*, 264: 70-78.
- Romdhane, M.S.; B. Devresse; P. Léger & P. Sorgeloos. 1995. Effects of feeding (-3) HUFA-enriched *Artemia* during a progressively increasing period on the larviculture of freshwater prawns. *Aquaculture International*, 3: 236-242.
- Roustaian, P.; M.S. Kamarudin; H. Omar; C.R. Soad & M.H. Ahmad. 1999. Changes in fatty acid profile during larval development of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Aquaculture Research*, 30: 815-824.
- Salas, A.; M.E. Ayala & M. Albrecht. 2002. Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante el período 1996 – 2000. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3 (5): 283-287.
- Simões, N.; D. Jones; S. Soto-Rodríguez; A. Roque & B. Gómez-Gil. 2002. Las bacterias en el inicio de la alimentación exógena en larvas de camarones Peneidos: Efectos de la calidad del agua, tasas de ingestión y rutas de colonización del tracto digestivo. p: 243-276. In Cruz-Suárez, L. E. et al. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Skjermo, H. & Ø. Bergh. 2004. High-M alginate immunostimulation of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae using *Artemia* for delivery, increases resistance against vibriosis. *Aquaculture*, 238: 107-113.
- Smith, T.K.; M. Tapia- Salazar; L.E. Cruz-Suarez & D. Ricque-Marie. 2000. Feed-borne biogenic amines: Natural toxicants or growth promotor? p: 24-32. In Cruz -Suárez,

- L.E., et al. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Sorgeloos, P.; P. Lavens; P. Legar; W. Tackaert & D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. Administración Belga para el desarrollo y la cooperación, FAO. Universidad Estatal de Gante, Facultad de Agricultura, Bélgica. 319 p.
- Tovar-Ramírez, D.; J.L. Zambonino-Infante; C. Cahu; F.J. Gatesoupe & R. Vázquez-Juárez. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. p: 33-46. In Cruz -Suárez, L.E., et al. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Vandenbergh, J.; L. Verdonck; R. Robles; G. Rivera; A. Bolland; M. Balladares; B. Gómez; L. Calderón; P. Sorgeloos & J. Swings. 1999. *Vibrio* associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock and bacterias probionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6): 2592-2597.
- Venkat, H.K., N.P. Sahu & K.K. Jain. 2004. Effects of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Abstract. *Aquaculture Research*, 35 (5): 501.
- Verschuere, L.; G. Rombaut; P. Sorgeloos & W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64 (4): 655-671.
- Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties. Academic Dissertation. University Helsinki. 61 p.
- Yépez V. & R. Bandín. 1997. Evaluación del recurso camarón de río *Cryphiops caementarius* en los ríos Ocoña, Majes-Camaná y Tambo, Octubre 1997. *Inf. Prog. Inst. Mar Perú*, 77: 3-21.
- Zlatkovic, D.; D. Jakovljevic; D. Zekovic & M.M. Vrvic. 2003. A glucan from active dry baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A chemical and enzymatic investigation of the structure. *J. Serb. Chem. Soc.*, 68 (11): 805-809.

ANEXO

Anexo 1: Calidad del agua de crianza larval

La temperatura promedio del agua de crianza larval no fue uniforme en los tratamientos durante el período de crianza (Fig. 18). En el tratamiento control, la temperatura del agua fue de 24,92°C significativamente ($p < 0,05$) mayor que la del los tratamiento con *L. casei* (24,45°C) y con *S. cerevisiae* (24,49°C) (Cuadro 2).

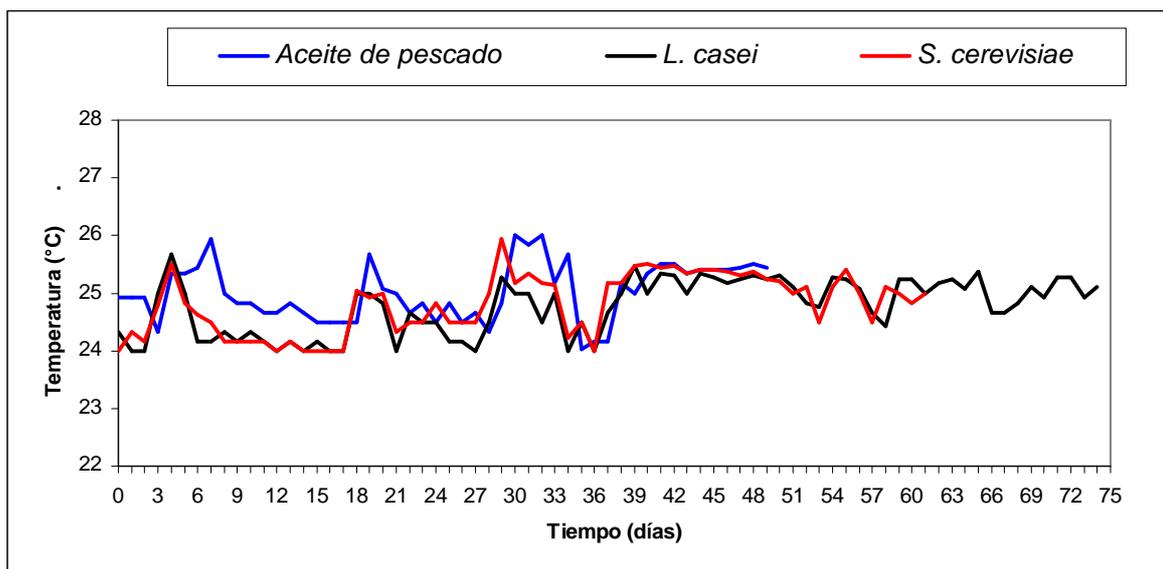


Fig. 18: Variación de la temperatura del agua de crianza de larvas de *C. caementarius* a través del tiempo, según tratamientos.

La concentración promedio de oxígeno disuelto en el agua fue uniforme en todos los tratamientos durante el periodo de crianza, pero con tendencia a disminuir con el tiempo (Fig. 19). En el tratamiento control la concentración de oxígeno del agua fue de 7,10 mg l⁻¹, en el tratamiento con *L. casei* fue de 7,16 mg l⁻¹ y en el tratamiento con *S. cerevisiae* fue de 7,08 mg l⁻¹ (Cuadro 2).

El porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en el agua se mantuvo casi constante en los tratamientos durante el periodo de crianza, con excepción del tratamiento con *S. cerevisiae* donde hubo disminución brusca en la primera quincena (Fig. 20). En el tratamiento control el porcentaje de saturación de oxígeno fue de 96,95%, en el tratamiento con *L. casei* fue de 97,36% y en el tratamiento con *S. cerevisiae* fue de 96,56% (Cuadro 2).

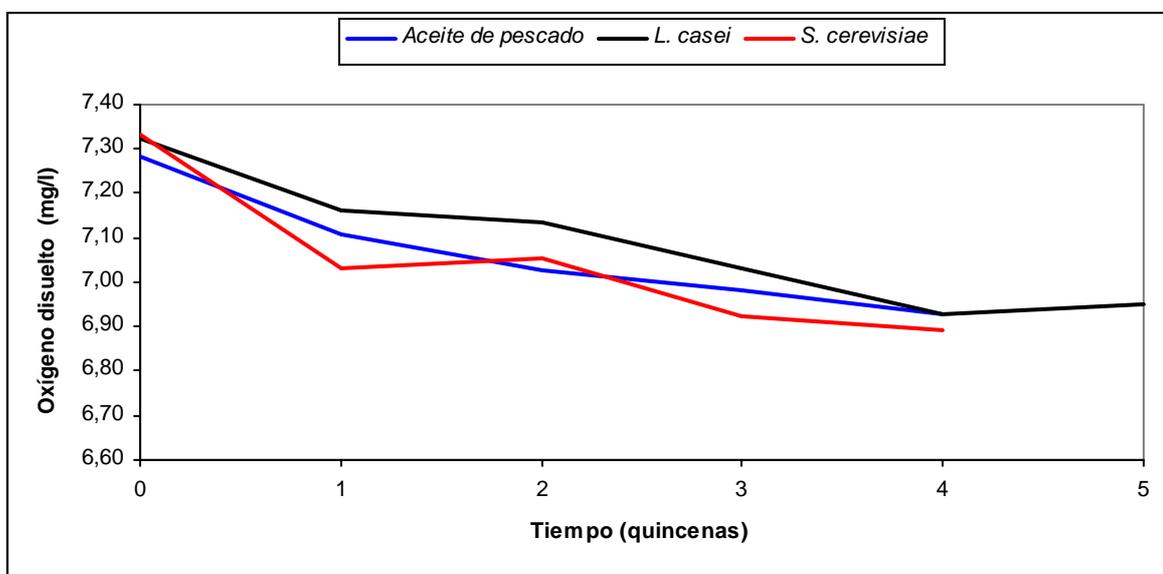


Fig. 19: Variación de la concentración de oxígeno disuelto en el agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, a través del tiempo, según tratamientos.

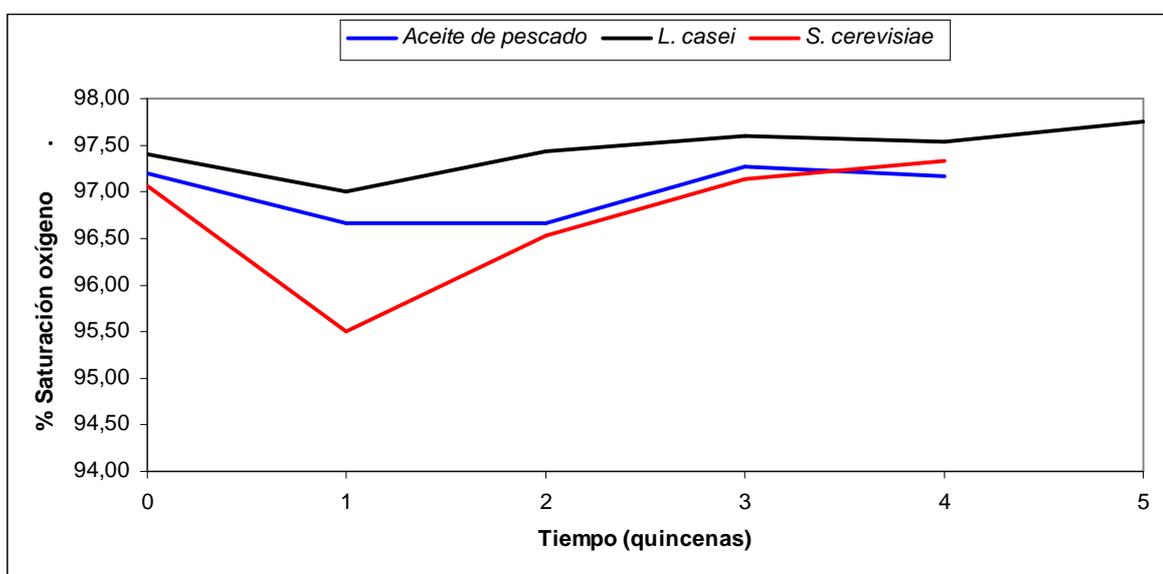


Fig. 20: Variación del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto en el agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, a través del tiempo, según tratamientos.

El pH en el agua también fue uniforme en todos los tratamientos durante el periodo de crianza, pero con tendencia a disminuir con el tiempo (Fig. 21). En el tratamiento control el pH fue de 7,15, en el tratamiento con *L. casei* fue de 7,25 y en el tratamiento con *S. cerevisiae* fue de 7,26 (Cuadro 2).

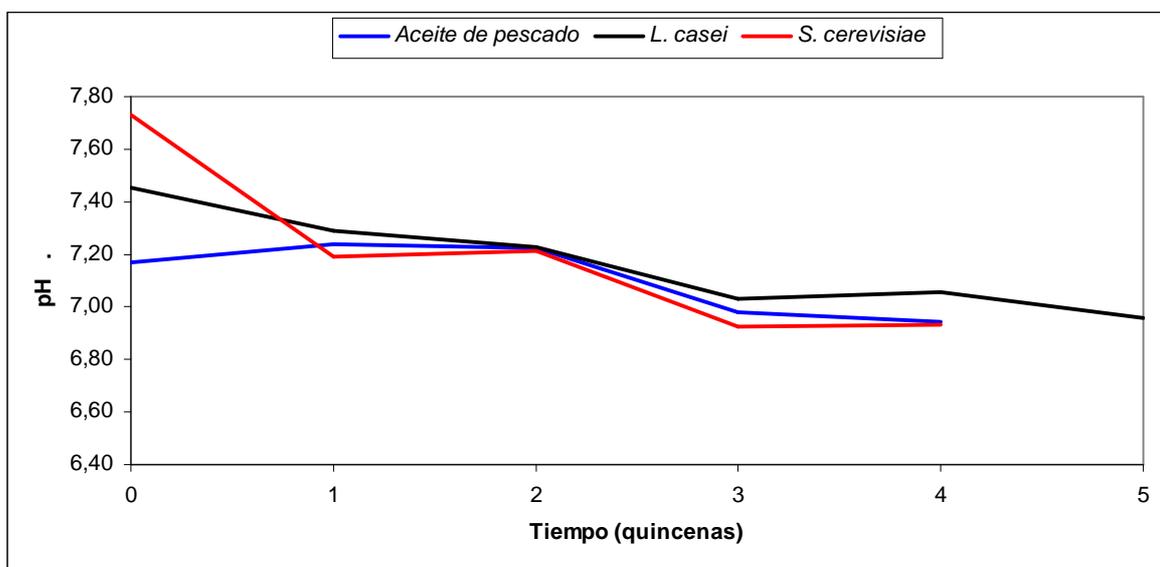


Fig. 21: Variación del pH del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, a través del tiempo, según tratamientos.

Cuadro 2: Parámetros físico y químicos del agua de crianza de larvas de *C. caementarius*, según tratamientos. Valores expresados como Media \pm desviación estándar (rango).

Tratamiento	Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (mg l ⁻¹)	Saturación de oxígeno (%)	pH
Aceite de pescado bioencapsulado en <i>A. franciscana</i> .	24,92 \pm 0,52 ^a (24,03 – 26,00)	7,10 \pm 0,13 ^a (6,98 – 7,28)	96,95 \pm 0,33 ^a (96,67 – 97,27)	7,15 \pm 0,12 ^a (6,98 – 7,24)
<i>L. casei</i> mas aceite de pescado bioencapsulados en <i>A. Franciscana</i> .	24,45 \pm 0,44 ^b (24,00 – 25,67)	7,16 \pm 0,12 ^a (7,03 – 7,32)	97,36 \pm 0,25 ^a (97,00 – 97,60)	7,25 \pm 0,17 ^a (7,03 – 7,45)
<i>S. cerevisiae</i> mas aceite de pescado bioencapsulados en <i>A. franciscana</i> .	24,57 \pm 0,49 ^b (24,00 – 25,93)	7,08 \pm 0,17 ^a (6,92 – 7,33)	96,56 \pm 0,75 ^a (95,50 – 97,13)	7,26 \pm 0,34 ^a (6,92 – 7,73)

Valores con el mismo superíndice en una columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

Por otro lado, se observó acumulación progresiva de materia orgánica en todos los acuarios debido a la muerte de los nauplios de *A. franciscana* y a la acumulación de alimento proporcionado que no fue consumido; así como por el incremento de exuvias de las larvas de camarón.

En la Fig. 22, se muestra el recuento total de bacterias y levaduras en el agua de crianza de larvas de *C. caementarius*. No hubo crecimiento de levadura en el agua de todos los tratamientos, excepto a los 50 días de crianza larval. *Lactobacillus* estuvo presente en el agua antes de la siembra de las larvas en los tratamientos con probióticos y a apartir de los 30 días de crianza larval se detectó en los tres tratamientos. *Vibrio* fue detectado en el agua a los 50 días de crianza larval en todos los tratamientos. Las bacterias aerobias mesófilas viables (Bamv) fue detectado en el agua al final del período de maduración o sea antes de la siembra de las larvas de camarón tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con el probiótico *L. casei*, pero a partir de los 30 días ya estuvo presente en los tres tratamientos.

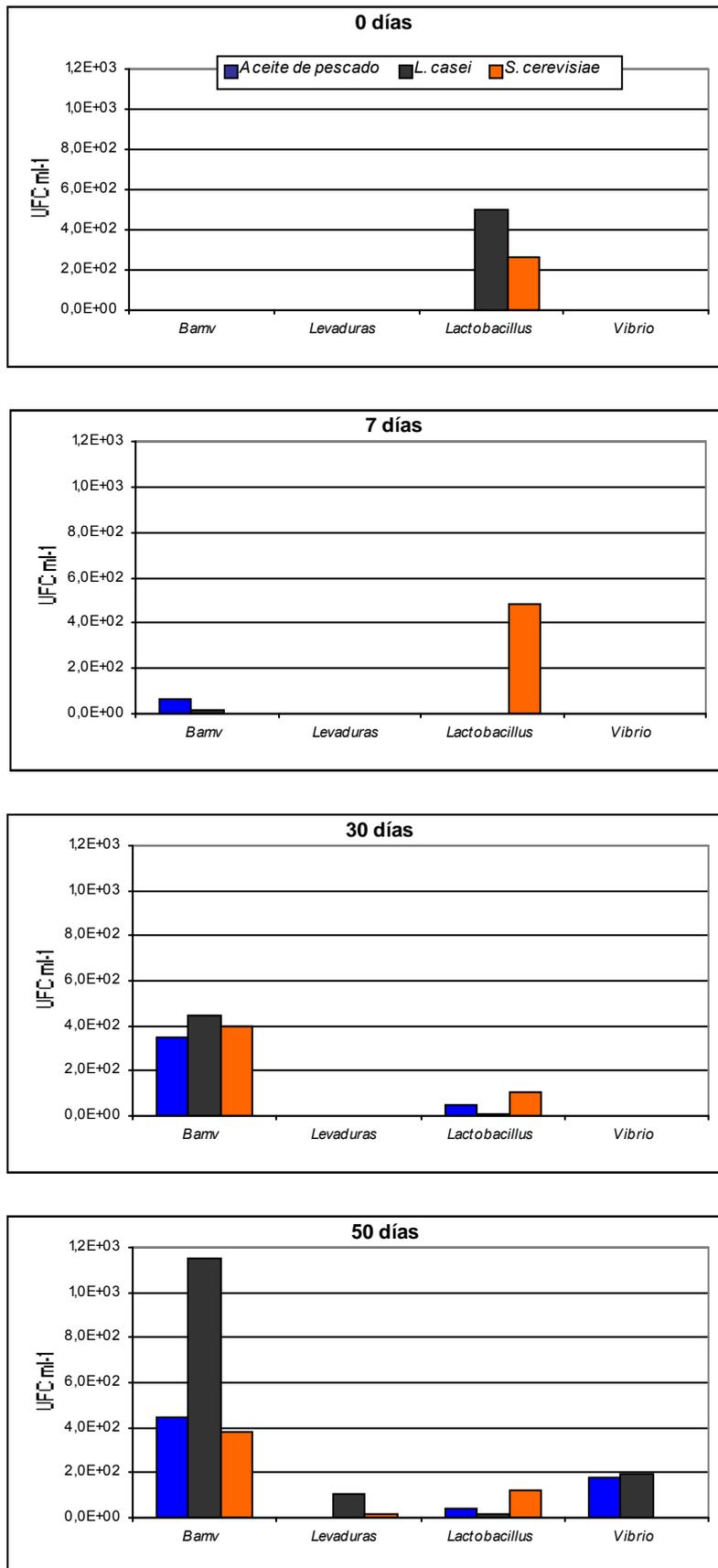


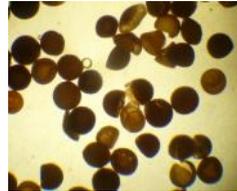
Fig. 22: Recuento total de bacterias y levaduras (UFC ml⁻¹) en el agua de crianza de larvas de *C. caementarius* en diferentes tiempos de muestreo, según tratamientos. Bamv: Bacterias aerobias mesófilas viables.

Anexo 2: Hidratación de cistos, decapsulación de cistos, incubación de embriones y bioencapsulación de probióticos en *A. franciscana*

Hidratación de cistos de *A. franciscana*



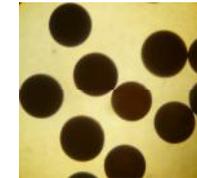
Cistos secos



Hidratación de cistos



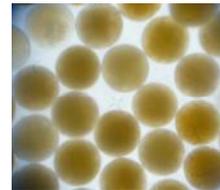
Cistos hidratados



Decapsulación de cistos de *A. franciscana*



Cistos decapsulados



Incubación de embriones de *A. franciscana*



Bioencapsulación de probióticos en nauplios de *A. franciscana*



Anexo 3: Obtención de larvas del camarón de río *C. caementarius*

Desinfección de hembras con
Formaldehído 200 ppm x 10'



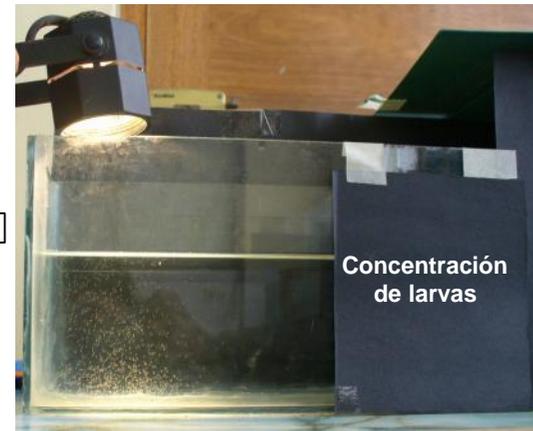
Acondicionamiento de hembras
durante Incubación de embriones



Larvas recién eclosionadas



Desinfección de larvas con
Formaldehído 200 ppm x 1 h.



Anexo 4: Análisis estadístico del tamaño de zoea 8 de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de zoea 8 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	672,0333	19,51367	11,26622	623,5587	720,5080	653,94	692,71
2	3	720,0133	7,00326	4,04333	702,6163	737,4104	715,97	728,10
3	3	666,7500	7,37822	4,25982	648,4215	685,0785	660,14	674,71
Total	9	686,2656	27,69366	9,23122	664,9783	707,5528	653,94	728,10

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de zoea 8 (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
1,882	2	6	,232

ANOVA

Tamaño de zoea 8 (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	5166,977	2	2583,488	16,005	,004
Dentro de grupos	968,534	6	161,422		
Total	6135,511	8			

Comparaciones Múltiples

Variable dependiente: Tamaño de zoea 8 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-47,98000(*)	10,37376	,009	-79,8095	-16,1505
	3	5,28333	10,37376	,870	-26,5462	37,1129
2	1	47,98000(*)	10,37376	,009	16,1505	79,8095
	3	53,26333(*)	10,37376	,005	21,4338	85,0929
3	1	-5,28333	10,37376	,870	-37,1129	26,5462
	2	-53,26333(*)	10,37376	,005	-85,0929	-21,4338

* La diferencia media es significativa al nivel de .05

Subsets Homogéneos

Tamaño de zoea 8 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset para alpha = .05	
		1	2
3	3	666,7500	
1	3	672,0333	
2	3		720,0133
Sig.		,870	1,000

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 5: Análisis estadístico del tamaño de zoea 9 de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de zoea 9 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de Confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	796,5767	20,51937	11,84687	745,6037	847,5496	777,10	818,00
2	3	835,0433	15,62113	9,01886	796,2383	873,8484	818,00	848,68
3	3	822,5467	20,82562	12,02368	770,8129	874,2804	804,37	845,27
Total	9	818,0556	23,73772	7,91257	799,8091	836,3020	777,10	848,68

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de zoea 9 (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,139	2	6	,873

ANOVA

Tamaño de zoea 9 (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	2310,292	2	1155,146	3,154	,116
Dentro de grupos	2197,542	6	366,257		
Total	4507,834	8			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Tamaño de zoea 9 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-38,46667	15,62598	,107	-86,4115	9,4781
	3	-25,97000	15,62598	,293	-73,9148	21,9748
2	1	38,46667	15,62598	,107	-9,4781	86,4115
	3	12,49667	15,62598	,717	-35,4481	60,4415
3	1	25,97000	15,62598	,293	-21,9748	73,9148
	2	-12,49667	15,62598	,717	-60,4415	35,4481

* La diferencia media es significativa al nivel de .05

Subsets Homogéneos

Tamaño de zoea 9 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset para alpha = .05
		1
1	3	796,5767
3	3	822,5467
2	3	835,0433
Sig.		,107

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 6: Análisis estadístico del tamaño de zoea 10 de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de zoea 10 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	822,8300	4,20444	2,42743	812,3856	833,2744	818,00	825,67
2	3	852,5000	11,19090	6,46107	824,7003	880,2997	840,72	862,99
3	3	880,4867	1,96876	1,13667	875,5960	885,3773	879,35	882,76
Total	9	851,9389	25,69395	8,56465	832,1888	871,6890	818,00	882,76

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*. T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de zoea 10 (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	Df1	df2	Sig.
2,744	2	6	,142

ANOVA

Tamaño de zoea 10 (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	4987,854	2	2493,927	50,969	,000
Dentro de grupos	293,579	6	48,930		
Total	5281,433	8			

Comparaciones Múltiples

Variable dependiente: Tamaño de zoea 10 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-29,67000(*)	5,71138	,005	-47,1941	-12,1459
	3	-57,65667(*)	5,71138	,000	-75,1808	-40,1326
2	1	29,67000(*)	5,71138	,005	12,1459	47,1941
	3	-27,98667(*)	5,71138	,006	-45,5108	-10,4626
3	1	57,65667(*)	5,71138	,000	40,1326	75,1808
	2	27,98667(*)	5,71138	,006	10,4626	45,5108

* La diferencia media es significativa al nivel de .05

Subsets Homogéneos

Tamaño de zoea 10 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	3	822,8300		
2	3		852,5000	
3	3			880,4867
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 7: Análisis estadístico del tamaño de zoea 11 de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de zoea 11 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	886,6167	36,74222	21,21313	795,3439	977,8894	848,90	922,30
2	3	934,6400	18,92234	10,92482	887,6343	981,6457	913,43	949,79
3	3	955,6800	23,43741	13,53160	897,4582	1013,9018	935,98	981,60
Total	9	925,6456	38,78367	12,92789	895,8338	955,4573	848,90	981,60

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de zoea 11 (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,515	2	6	,622

ANOVA

Tamaño de zoea 11 (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	7518,666	2	3759,333	4,996	,053
Dentro de grupos	4514,717	6	752,453		
Total	12033,383	8			

Comparaciones Múltiples

Variable dependiente: Tamaño de zoea 11 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-48,02333	22,39721	,161	-148,2810	52,2343
	3	-69,06333	22,39721	,049	-169,3210	31,1943
2	1	48,02333	22,39721	,161	-52,2343	148,2810
	3	-21,04000	22,39721	,638	-121,2977	79,2177
3	1	69,06333	22,39721	,049	-31,1943	169,3210
	2	21,04000	22,39721	,638	-79,2177	121,2977

* La diferencia media es significativa al nivel de .05

Subsets Homogéneos

Tamaño de zoea 11 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .01	
			1
1	3	886,6167	
2	3	934,6400	
3	3	955,6800	
Sig.			,049

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000

Anexo 8: Análisis estadístico del tamaño de zoea 12 de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de zoea 12 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	978,4367	8,20506	4,73719	958,0542	998,8192	971,38	987,44
2	3	1034,510	22,63276	13,06703	978,2871	1090,7329	1008,87	1051,71
3	3	1033,786	19,43010	11,21798	985,5196	1082,0537	1014,32	1053,18
Total	9	1015,577	31,86407	10,62136	991,0849	1040,0707	971,38	1053,18

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de zoea 12 (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
1,334	2	6	,332

ANOVA

Tamaño de zoea 12 (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	6208,364	2	3104,182	9,730	,013
Dentro de grupos	1914,187	6	319,031		
Total	8122,552	8			

Comparaciones Múltiples

Variable dependiente: Tamaño de zoea 12 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-56,07333(*)	14,58381	,020	-100,8205	-11,3262
	3	-55,35000(*)	14,58381	,021	-100,0971	-10,6029
2	1	56,07333(*)	14,58381	,020	11,3262	100,8205
	3	,72333	14,58381	,999	-44,0238	45,4705
3	1	55,35000(*)	14,58381	,021	10,6029	100,0971
	2	-,72333	14,58381	,999	-45,4705	44,0238

* La diferencia media es significativa al nivel de .05

Subsets Homogéneos

Tamaño de zoea 12 (Longitud del cefalotórax en μm)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	3	978,4367	
3	3		1033,7867
2	3		1034,5100
Sig.		1,000	,999

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 9: Análisis estadístico del tamaño de megalopa I de *C. caementarius*, según tratamientos.

Descriptivas

Tamaño de megalopa I (Longitud del cefalotórax en μm)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
2	3	1111,116	51,46470	29,71316	983,2713	1238,9621	1063,40	1165,65
3	3	1209,766	40,39793	23,32375	1109,4127	1310,1207	1163,61	1238,69
Total	6	1160,47	68,05726	27,78426	1089,0200	1231,8634	1063,40	1238,69

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Tamaño de megalopa I (Longitud del cefalotórax en μm)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,107	1	4	,760

ANOVA

Tamaño de megalopa I (Longitud del cefalotórax en μm)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	14597,734	1	14597,734	6,820	,059
Dentro de grupos	8561,217	4	2140,304		
Total	23158,950	5			

Anexo 10: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 3 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	49,9700	7,47737	4,31706	31,3952	68,5448	41,67	56,18
2	3	45,8167	4,16512	2,40473	35,4699	56,1634	41,67	50,00
3	3	42,9067	7,31419	4,22285	24,7372	61,0761	35,39	50,00
Total	9	46,2311	6,41407	2,13802	41,3008	51,1614	35,39	56,18

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,607	2	6	,575

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	75,609	2	37,804	,895	,457
Dentro de grupos	253,514	6	42,252		
Total	329,122	8			

Compariciones Múltiples

Variable Dependiente: Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	4,15333	5,30737	,727	-12,1311	20,4378
	3	7,06333	5,30737	,431	-9,2211	23,3478
2	1	-4,15333	5,30737	,727	-20,4378	12,1311
	3	2,91000	5,30737	,851	-13,3745	19,1945
3	1	-7,06333	5,30737	,431	-23,3478	9,2211
	2	-2,91000	5,30737	,851	-19,1945	13,3745

Subsets Homogéneos

Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
		1
3	3	42,9067
2	3	45,8167
1	3	49,9700
Sig.		,431

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 11: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 4 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	28,4300	6,38618	3,68706	12,5658	44,2942	22,84	35,39
2	3	36,0767	1,18934	,68667	33,1222	39,0312	35,39	37,45
3	3	31,6367	3,15985	1,82434	23,7872	39,4862	28,73	35,00
Total	9	32,0478	4,90959	1,63653	28,2739	35,8216	22,84	37,45

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
2,892	2	6	,132

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	88,468	2	44,234	2,543	,159
Dentro de grupos	104,365	6	17,394		
Total	192,833	8			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-7,64667	3,40531	,141	-18,0951	2,8017
	3	-3,20667	3,40531	,636	-13,6551	7,2417
2	1	7,64667	3,40531	,141	-2,8017	18,0951
	3	4,44000	3,40531	,443	-6,0084	14,8884
3	1	3,20667	3,40531	,636	-7,2417	13,6551
	2	-4,44000	3,40531	,443	-14,8884	6,0084

Subsets Homogéneos

Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
1	3	1
3	3	1
2	3	1
Sig.		,141

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 12: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 5 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	31,7967	6,78336	3,91638	14,9459	48,6475	26,76	39,51
2	3	34,0167	1,18934	,68667	31,0622	36,9712	33,33	35,39
3	3	26,9133	3,82797	2,21008	17,4041	36,4225	23,78	31,18
Total	9	30,9089	5,04228	1,68076	27,0331	34,7847	23,78	39,51

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
4,465	2	6	,065

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	79,233	2	39,616	1,914	,227
Dentro de grupos	124,164	6	20,694		
Total	203,396	8			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-2,22000	3,71429	,826	-13,6165	9,1765
	3	4,88333	3,71429	,438	-6,5131	16,2798
2	1	2,22000	3,71429	,826	-9,1765	13,6165
	3	7,10333	3,71429	,215	-4,2931	18,4998
3	1	-4,88333	3,71429	,438	-16,2798	6,5131
	2	-7,10333	3,71429	,215	-18,4998	4,2931

Subsets Homogéneos

Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
		1
3	3	26,9133
1	3	31,7967
2	3	34,0167
Sig.		,215

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 13: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 6 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	22,5367	5,86532	3,38635	7,9664	37,1069	18,00	29,16
2	3	36,1267	5,77221	3,33259	21,7877	50,4656	30,15	41,67
3	3	24,7100	4,36945	2,52270	13,8557	35,5643	20,15	28,86
Total	9	27,7911	7,85316	2,61772	21,7546	33,8276	18,00	41,67

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,224	2	6	,806

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	319,752	2	159,876	5,525	,044
Dentro de grupos	173,625	6	28,938		
Total	493,377	8			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-13,59000(*)	4,39223	,048	-27,0666	-,1134
	3	-2,17333	4,39223	,876	-15,6499	11,3032
2	1	13,59000(*)	4,39223	,048	,1134	27,0666
	3	11,41667	4,39223	,090	-2,0599	24,8932
3	1	2,17333	4,39223	,876	-11,3032	15,6499
	2	-11,41667	4,39223	,090	-24,8932	2,0599

* The mean difference is significant at the .05 level.

Subsets Homogéneos

Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	3	22,5367	
3	3	24,7100	24,7100
2	3		36,1267
Sig.		,876	,090

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 14: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 7 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	13,2333	5,15978	2,97900	,4157	26,0509	9,40	19,10
2	3	29,6000	8,29638	4,78992	8,9906	50,2094	20,20	35,90
3	3	11,0067	1,45761	,84155	7,3858	14,6276	9,87	12,65
Total	9	17,9467	10,08522	3,36174	10,1945	25,6989	9,40	35,90

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
4,332	2	6	,069

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	618,538	2	309,269	9,508	,014
Dentro de grupos	195,156	6	32,526		
Total	813,694	8			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-16,36667(*)	4,65661	,029	-30,6544	-2,0789
	3	2,22667	4,65661	,884	-12,0611	16,5144
2	1	16,36667(*)	4,65661	,029	2,0789	30,6544
	3	18,59333(*)	4,65661	,017	4,3056	32,8811
3	1	-2,22667	4,65661	,884	-16,5144	12,0611
	2	-18,59333(*)	4,65661	,017	-32,8811	-4,3056

* The mean difference is significant at the .05 level.

Subsets Homogéneos

Supervivencia de larvas (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	3	11,0067	
1	3	13,2333	
2	3		29,6000
Sig.		,884	1,000

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa armónica media para tamaño de muestra = 3,000.

Anexo 15: Análisis estadístico de la supervivencia de larvas de *C. caementarius* en la semana 8 de crianza, según tratamientos.

Descriptivas

Supervivencia de larvas (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
2	3	30,0000	38,78260	22,39114	-66,3413	126,3413	5,30	74,70
3	3	4,6667	8,08290	4,66667	-15,4124	24,7457	,00	14,00
Total	6	17,3333	28,64093	11,69261	-12,7235	47,3901	,00	74,70

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianzas

Supervivencia de larvas (%)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
9,302	1	4	,038

ANOVA

Supervivencia de larvas (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	962,667	1	962,667	1,227	,330
Dentro de grupos	3138,847	4	784,712		
Total	4101,513	5			

Anexo 16: Análisis estadístico de la temperatura del agua de crianza de larvas de *C. caementarius* según tratamientos

Descriptivas

Temperatura del agua (°C)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	50	25,0194	,49826	,07046	24,8778	25,1610	24,03	26,00
2	76	24,7609	,47759	,05478	24,6518	24,8701	24,00	25,67
3	63	24,8021	,51170	,06447	24,6732	24,9309	24,00	25,93
Total	189	24,8430	,50360	,03663	24,7708	24,9153	24,00	26,00

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Temperatura del agua (°C)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,323	2	186	,724

ANOVA

Temperatura del agua (°C)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	2,173	2	1,087	4,442	,013
Dentro de grupos	45,505	186	,245		
Total	47,679	188			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Temperatura del agua (°C)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,25848(*)	,09007	,013	,0457	,4713
	3	,21734	,09368	,056	-,0040	,4387
2	1	-,25848(*)	,09007	,013	-,4713	-,0457
	3	-,04114	,08428	,877	-,2403	,1580
3	1	-,21734	,09368	,056	-,4387	,0040
	2	,04114	,08428	,877	-,1580	,2403

* The mean difference is significant at the .05 level.

Temperatura del agua (°C)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
2	76	24,7609	
3	63	24,8021	
1	50		25,0194
Sig.		,890	1,000

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa Armónica Media del tamaño de muestra = 61,186.

b El tamaño de los grupos son diferentes. Usa la armónica media del tamaño de los grupos. Los niveles de error Tipo I no esta garantizado.

Anexo 17: Análisis estadístico del oxígeno del agua de crianza de larvas de *C. caementarius* según tratamientos

Descriptivas

Oxígeno del agua (mg l⁻¹)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	5	7,0660	,13686	,06120	6,8961	7,2359	6,93	7,28
2	5	7,1160	,14673	,06562	6,9338	7,2982	6,93	7,32
3	6	7,0283	,16030	,06544	6,8601	7,1966	6,89	7,33
Total	16	7,0675	,14387	,03597	6,9908	7,1442	6,89	7,33

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Oxígeno del agua (mg l⁻¹)

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,006	2	13	,994

ANOVA

Oxígeno del agua (mg l⁻¹)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	,021	2	,010	,471	,635
Dentro de grupos	,290	13	,022		
Total	,311	15			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Oxígeno del agua

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,05000	,09438	,858	-,2992	,1992
	3	,03767	,09037	,909	-,2009	,2763
2	1	,05000	,09438	,858	-,1992	,2992
	3	,08767	,09037	,608	-,1509	,3263
3	1	-,03767	,09037	,909	-,2763	,2009
	2	-,08767	,09037	,608	-,3263	,1509

Oxígeno del agua (mg l⁻¹)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
		1
3	6	7,0283
1	5	7,0660
2	5	7,1160
Sig.		,616

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa Armónica Media del tamaño de muestra = 5,294.

b El tamaño de los grupos son diferentes. Usa armónica media del tamaño de los grupos. Los niveles de error Tipo I no esta garantizado.

Anexo 18: Análisis estadístico del porcentaje de saturación de oxígeno del agua de crianza de larvas de *C. caementarius* según tratamientos

Descriptivas

Saturación de oxígeno del agua (%)

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	5	96,9960	,29980	,13407	96,6237	97,3683	96,67	97,27
2	6	97,4517	,25467	,10397	97,1844	97,7189	97,00	97,75
3	5	96,7120	,73941	,33067	95,7939	97,6301	95,50	97,33
Total	16	97,0781	,54233	,13558	96,7891	97,3671	95,50	97,75

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

Saturación de oxígeno del agua (%)

Nivel Estadístico	df1	Df2	Sig.
3,494	2	13	,061

ANOVA

Saturación de oxígeno del agua (%)

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	1,541	2	,771	3,490	,061
Dentro de grupos	2,871	13	,221		
Total	4,412	15			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: Saturación de oxígeno del agua (%)

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,45567	,28455	,280	-1,2070	,2957
	3	,28400	,29720	,616	-,5007	1,0687
2	1	,45567	,28455	,280	-,2957	1,2070
	3	,73967	,28455	,054	-,0117	1,4910
3	1	-,28400	,29720	,616	-1,0687	,5007
	2	-,73967	,28455	,054	-1,4910	,0117

Saturación de oxígeno del agua (%)

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
		1
3	5	96,7120
1	5	96,9960
2	6	97,4517
Sig.		,058

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa Harmónica Media del tamaño de muestra = 5,294.

b El tamaño de los grupos son diferentes. Usa harmónica media del tamaño de los grupos. Los niveles de error Tipo I no esta garantizado.

Anexo 19: Análisis estadístico del pH del agua de crianza de larvas de *C. caementarius* según tratamientos

Descriptivas

pH del agua

Tratamientos (T)	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% Intervalo de confianza para la Media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	5	7,1100	,14000	,06261	6,9362	7,2838	6,94	7,24
2	6	7,1700	,18558	,07576	6,9752	7,3648	6,96	7,45
3	5	7,1960	,32876	,14702	6,7878	7,6042	6,92	7,73
Total	16	7,1594	,21641	,05410	7,0441	7,2747	6,92	7,73

T1: Aceite de pescado bioencapsulado en *A. franciscana*. T2: *L. casei* bioencapsulado en *A. franciscana*.

T3: *S. cerevisiae* bioencapsulado en *A. franciscana*.

Test de Homogeneidad de Varianza

pH del agua

Nivel Estadístico	df1	df2	Sig.
,725	2	13	,503

ANOVA

pH del agua

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F	Sig.
Entre grupos	,020	2	,010	,186	,832
Dentro de grupos	,683	13	,053		
Total	,702	15			

Comparaciones Múltiples

Variable Dependiente: pH del agua

Tukey HSD

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Media (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de Confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,06000	,13879	,903	-,4265	,3065
	3	-,08600	,14496	,826	-,4688	,2968
2	1	,06000	,13879	,903	-,3065	,4265
	3	-,02600	,13879	,981	-,3925	,3405
3	1	,08600	,14496	,826	-,2968	,4688
	2	,02600	,13879	,981	-,3405	,3925

pH del agua

Tukey HSD

Tratamientos	N	Subset for alpha = .05
		1
1	5	7,1100
2	6	7,1700
3	5	7,1960
Sig.		,817

Se muestra las Medias para grupos en subset homogéneos.

a Usa Harmónica Media del tamaño de muestra = 5,294.

b El tamaño de los grupos son diferentes. Usa harmónica media del tamaño de los grupos. Los niveles de error Tipo I no esta garantizado.