

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Factibilidad técnica y económica de dos métodos de análisis microbiano
del insumo acuícola melaza de caña.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero en Acuicultura

Presentado por:

Encalada Quezada Cristhian Andres

Nuñez Villacís María Angélica

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering and Sea Science

Technical and economic practicality of two methods of microbial
analysis of cane molasses aquaculture input.

CAPSTONE COURSE

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for
the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Encalada Quezada Cristhian Andres

Nuñez Villacís María Angélica

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primero a Dios por ser parte de todo el proceso y nunca olvidarse de sus hijos. A mi compañera de vida y nuestra pequeña, que han sido el motor de motivación en este gran camino. A mis padres por su apoyo y su gran esfuerzo para sacarnos adelante. Al resto de mi familia por sus palabras de aliento y su apoyo incondicional. Por último y no menos importante, a mis docentes de carrera que me han impartido sus grandes conocimientos.

Cristhian Andres Encalada Quezada

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico en primer lugar a Dios por nunca dejarme sola y siempre darme las fuerzas necesarias para avanzar y seguir adelante por mis sueños. A mi familia, pero sobre todo a mis padres Javier y Marcela; hermanos Alex, Gigi y Nene; y abuelita Horten; por enseñarme que con educación todo se puede y brindarme su apoyo en cada parte de mi carrera universitaria. A mis hermosos sobrinos a quienes amo con locura y por quienes nunca me dejo vencer, les quiero demostrar que todo esfuerzo tiene su recompensa. A mis amigos César, Jailene, Roy, Nicole, Angélica, Sara y Christopher por brindarme su amistad durante todo este tiempo. A Rony Ruíz y mi pequeña Mili por siempre darme su amor incondicional en cada instante, llegaron en el momento ideal y justo para alumbrar mi vida con felicidad. A mi hermoso ángel del cielo Letty, porque sé que estas feliz por mi logro alcanzado, gracias por nunca dejarme sola, te amo. Por último, a todos mis docentes por compartirme sus conocimientos y ganas de enseñar, en especial a Francisca Burgos, Ph.D.

María Angélica Nuñez Villacís

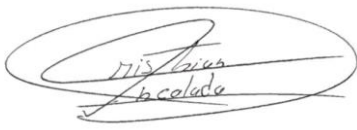
AGRADECIMIENTOS

Nuestro más sincero agradecimiento a nuestro tutor Adrián Márquez, M.Sc.; a nuestra docente quién nos motivó a llevar adelante este proyecto con gran importancia en la industria acuícola y nos dedicó su tiempo y conocimiento Francisca Burgos, Ph.D; y todos nuestros docentes de la facultad de acuicultura, en especial a Marco Álvarez, Ph.D.; Wilfrido Argüello, Ph.D.; Patricia Urdiales, M.Sc.; Marcelo Muñoz, Ph.D.; Eduardo Cervantes, M.Sc.; quienes nos han brindado su tiempo y compartido su conocimiento para poder lograr lo que hoy es un nuevo logro en nuestro rango académico. Por formar en nosotros profesionales de bien y demostrarnos que todo es posible y que las ganas de aprender no tienen límites.

Cristhian Encalada & María Nuñez

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Cristhian Andres Encalada Quezada* y *María Angélica Nuñez Villacís* y damos nuestro consentimiento para que la ESPOLE realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Cristhian Andres
Encalada Quezada



María Angélica
Nuñez Villacís

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**WILFRIDO ERNESTO
ARGUELLO GUEVARA**



Firmado electrónicamente por:
**ADRIAN JOSE
MARQUEZ
MONTEI**

Wilfrido Argüello, Ph.D.
PROFESOR DE LA MATERIA

Adrián Márquez, M.Sc.
PROFESOR TUTOR

RESUMEN

En el país, se conoce poco acerca de los efectos de la adición de melaza como fuente de carbono durante el cultivo. Actualmente, la adición directa de la melaza en dosis frecuentes para la preparación de piscinas y como parte de la formulación de probióticos no ha sido evaluada desde el punto de vista de inocuidad, representando un riesgo al momento de la adición y uso. El estudio tuvo por objetivo evaluar la carga microbiana de tres muestras de melaza de caña comercial de diferente marca mediante dos métodos cultivo dependiente. Hoy en día, la importancia de análisis microbiológicos dentro de la acuicultura radica en encontrar métodos óptimos que permitan el ahorro de dinero y tiempo en el procesamiento de muestras de insumos acuícolas (melaza de caña) destinadas para fertilización o probióticos. Se realizó la siembra de las tres muestras de melaza de caña en los medios de cultivo (tradicionales y rápidos) en diluciones seriadas (10^4 , 10^5 , 10^6), luego incubadas con las condiciones óptimas para el crecimiento, las lecturas fueron pasadas las 24 horas para TSA-TC, MacConkey-CF, mientras que Sabouraud-YM durante 15 días. Se concluyó que aun sin cumplir a cabalidad con los requisitos microbiológicos descritos por la ISO e INEN, la melaza de caña 2 podría ser usada como mejor insumo en base a su calidad e inocuidad por presentar valores de concentraciones únicamente para los medios TSA de $6.67E+03$ (10^4), $4.67E+06$ (10^6); TC de $1.00E+07$ (10^6) y ausencia de contenido bacteriano para el resto de los análisis.

Palabras claves: Análisis microbiológicos, Análisis económico, Melaza de caña, Métodos rápidos, Métodos tradicionales.

ABSTRACT

In the country, little is known about the effects of adding molasses as a carbon source during cultivation. Currently, the direct addition of molasses in frequent doses for the preparation of ponds and as part of the formulation of probiotics has not been evaluated from the point of view of safety, representing a risk at the time of addition and use. The objective of the study was to evaluate the microbial load of three samples of commercial cane molasses of different brands by means of two dependent culture methods. Today, the importance of microbiological analysis within aquaculture lies in finding optimal methods that allow saving money and time in the processing of samples of aquaculture inputs (cane molasses) intended for fertilization or probiotics. The three samples of cane molasses were planted in the culture media (traditional and rapid) in serial dilutions (10^4 , 10^5 , 10^6), then incubated with the optimal conditions for growth, the readings were after 24 hours for TSA-TC, MacConkey-CF, while Sabouraud-YM for 15 days. It was concluded that even without fully complying with the microbiological requirements described by ISO and INEN, the cane molasses No.2 could be used as the best input based on its quality and safety, as it presents concentration values only for media TSA of $6.67E. +03$ (10^4), $4.67E+06$ (10^6); TC of $1.00E+07$ (10^6) and absence of bacterial content for the rest of the analyses.

Keywords: *Microbiological analysis, Economic analysis, Cane molasses, Rapid methods, Traditional methods.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1. Descripción del problema	2
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos.....	3
1.4. Marco teórico.....	4
1.4.1. Melaza	4
1.4.2. Microorganismos de la melaza.....	4
1.4.3. Uso de melaza en acuicultura	5
1.4.4. Costos de melaza comercial	7
1.4.5. Métodos de diagnóstico de conteo microbiano.....	10
1.4.6. Pérdidas económicas causadas por patógenos	14
CAPÍTULO 2	16
2. METODOLOGÍA.....	16
2.1. Análisis microbiano.....	16
2.2. Conteo de colonias	18

2.3.	Análisis presupuestario.....	18
2.4.	Análisis estadístico	18
CAPÍTULO 3		20
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
3.1.	Cuantificación total de bacterias (UFC/mL).....	20
3.2.	Sensibilidad analítica microbiana.....	24
3.3.	Análisis costo beneficio	25
3.3.1.	Costo de oportunidad.....	25
3.3.2.	Valor del dinero en el tiempo.....	27
CAPÍTULO 4		30
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
4.1.	Conclusiones.....	30
4.2.	Recomendaciones.....	32
Bibliografía		33

ABREVIATURAS

AHPND	Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas
CF	Coliformes totales
CIIU	Clasificación Industrial Internacional Uniforme
CNA	Cámara Nacional de Acuacultura
EHP	Enterocytozoon hepatopenaei
IHHNV	Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética
IMNV	Virus de la Mionecrosis Infecciosa
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
ISO	Organización Internacional de Estandarización
M 1,2,3	Melazas 1,2,3
ND	No Determinado
TC	Recuento total
TCBS	Tiosulfato Citrati Bilis Sacarosa
TSA	Agar Trypticase de Soya
TSV	Síndrome del Virus de Taura
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WSSV	Virus del Síndrome de la Mancha Blanca
YHV	Virus de la Cabeza Amarilla
YM	Hongos y Levaduras

SIMBOLOGÍA

NH ₃	Amonio no ionizado
CO ₂	Dióxido de carbono
\$	Dólares
gal	Galones
g	Gramos
°C	Grados Celsius
G (-)	Gram negativa
G (+)	Gram positiva
ha	Hectáreas
hrs	Horas
kg	Kilogramos
Lt	Litros
µL	Microlitros
mL	Mililitros
NO ₂	Nitrito
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
ton ó T	Toneladas

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Tipos de microorganismos existentes en la melaza.	4
Figura 1.2 Usos de la melaza en los cultivos de camarones.....	6
Figura 1.3 Ventajas (+) y desventajas (-) de melaza (carga bacteriana) para la acuicultura.....	7
Figura 1.4 Medios de cultivo más comunes usados en métodos convencionales o tradicionales.	11
Figura 1.5 Medios de cultivo más comunes usados en métodos miniaturizados o rápidos.	12
Figura 1.6 Participación de los principales grupos patógenos en las pérdidas económicas de la industria camaronera durante un año.....	14
Figura 2.1 Diseño experimental de la melaza mediante diluciones seriadas para los métodos tradicional y rápidos.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Ítems de mayor costo (valores expresados en porcentajes) en los cultivos de camarón semi-extensivos o intensivos.	8
Tabla 1.2 Detalle del precio unitario de diferentes presentaciones de melaza.	8
Tabla 1.3 Cálculo del promedio del consumo de melaza en un ciclo de cultivo.	9
Tabla 1.4 Cálculo del promedio del consumo de melaza anual en un ciclo de cultivo.	9
Tabla 1.5 Estimación y proyección de costos del consumo de melaza en áreas productivas de camarón en Ecuador.	10
Tabla 1.6 Distribución de presupuesto de materiales, equipos y reactivos para laboratorio.	13
Tabla 1.7 Pérdidas económicas estimadas en la camaronicultura causadas por algunas de las enfermedades más importantes (montos expresados en millones de dólares; ND = No determinado).	15
Tabla 3.1 Presencia (+) o ausencia (0) del contenido bacteriano (UFC/mL) entre métodos comerciales presentes en 3 muestras de melaza de caña, luego de las 24 horas para los medios vibrios (TCBS), bacterias totales (TSA, TC), enterobacterias (MacConkey, CF) y por 15 días hongos y levaduras (Sabouraud, YM).....	21
Tabla 3.2 Requisitos microbiológicos.....	23
Tabla 3.3 Concentración de bacterias totales (UFC/mL) de los métodos tradicional (TSA) y rápido (TC) respecto al factor de dilución (10^6).....	24
Tabla 3.4 Comparación económica entre métodos comerciales.	25
Tabla 3.5 Evaluación de criterios de calidad de métodos de diagnóstico.....	27
Tabla 3.6 Costos referenciales de materiales empleados entre métodos tradicionales y métodos rápidos para análisis de bacterias totales, enterobacterias, hongos y levaduras.....	28

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cultivo de camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei* como actividad productiva en Ecuador siempre se ha destacado por su calidad y valor agregado, por ello, la industria acuícola está en constante búsqueda de disponibilidad de agua y tierra ofreciendo recursos sostenibles aportando trazabilidad y acceso de la producción nacional a mercados internacionales. El Banco Central del Ecuador detalla que para el año 2021 la camaronicultura creció un 23% en sus exportaciones al mundo, lo que significa un valor de \$ 5,323 millones categorizándose esa cifra como un logro histórico como producto no petrolero (Camara Nacional de Acuicultura (CNA), 2022).

Sin embargo, desde los inicios de la camaronicultura han existido y existen numerosas enfermedades que son un gran desafío que afectan la producción de camarón con pérdidas millonarias, tanto a nivel local como mundial. A pesar de implementar medidas para combatirlas, no dejan de manifestarse nuevas enfermedades (Figueredo A., Fuentes J., Cabrera T., León J., Patti J., Silva, J. & Ron E, 2022).

Dentro de las prácticas comunes de manejo, las empresas camaroneras ecuatorianas en su constante búsqueda de sustentabilidad optan por invertir en la aplicación de insumos comerciales orgánicos amigables para el ambiente y para sus ciclos de cultivos, como la melaza de caña. Este insumo proporciona un alto contenido de carbohidratos mejorando su productividad, nutrición y formando parte de la composición de aditivos para el control de enfermedades mediante fertilizantes o probióticos.

En el país, se conoce poco acerca de los efectos de la adición de melaza como fuente de carbono durante el cultivo. La adición directa de la melaza en dosis frecuentes para la preparación de piscinas y como parte de la formulación de probióticos no ha sido evaluada desde el punto de vista de inocuidad al momento de la adición y uso. Según (Guo, 2022), la adición de una fuente de carbono podría alterar la estabilidad de la comunidad bacteriana, lo que causaría efectos negativos en el rendimiento sobre el crecimiento del camarón. Las comunidades microbianas juegan un papel importante en

el sistema de cultivo, pero también son vectores para el brote de enfermedades (Rodríguez & Sandoval, 2010).

Este proyecto busca dar un aporte al sector camaronero con el fin de brindar información suficiente desde el punto de vista técnico-científico para la toma de decisiones durante la adquisición de insumos acuícolas que se encuentran en venta dentro del mercado.

1.1. Descripción del problema

Los insumos acuícolas son parte esencial del proceso de producción, juegan un papel que impacta directamente en la eficiencia de los cultivos en todas sus fases (preparación de piscinas, buferización de piscinas, preparación de probióticos, prebióticos, quimiotratamientos, alimentación, biorremediación, entre otras). La melaza producto excedente de la producción azucarera. En acuicultura de camarones, la melaza es una fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y micronutrientes, útiles elementos para el manejo de la calidad del agua en el cultivo. Una de las formas de pretratamiento más utilizadas en Ecuador, para el cultivo de camarón es la aplicación de melaza de caña como fuente de carbono para bacterias probióticas. Al ser un insumo de alta demanda y aplicación durante todo el cultivo, aun en la actualidad no existe información acerca de su inocuidad y cuáles son los métodos más efectivos (rentables y sensibles) para determinar su calidad.

Algunos estudios (Yan, 2020) también han reportado que la melaza de caña puede ser un vehículo de contaminación microbiana, sin embargo; en la producción camaronera ecuatoriana no existen datos sobre este tema. Debido principalmente a la falta de estudios y herramientas de control microbiano, probados al respecto. La adición continua de este insumo y la falta de control de inocuidad no permite mantener un control microbiológico adecuado por cada aplicación o al menos de los lotes comprados.

1.2. Justificación del problema

En Ecuador, la venta de melaza no posee una evaluación microbiana previa a su uso y sumado a que la mayor parte de las granjas de producción de camarón poseen un nulo o limitado equipamiento de análisis microbiológico, existe incertidumbre con respecto a su inocuidad y calidad microbiológica.

Estimaciones sobre el consumo mínimo de melaza para fertilizar una piscina de 5.8 ha es de aproximadamente 11 kg/ha, para preparar probiótico 35 kg/ha respectivamente, en total se adiciona por cada semana 166.5 kg (Morales & Guzmán, 2021).

Es evidente el volumen de uso de la melaza como insumo acuícola, y del riesgo que conlleva el no contar con una evaluación inicial de su calidad microbiológica; entendiendo los riesgos asociados a incluir estos volúmenes en sistemas altamente sensibles como los cultivos de camarón.

La mayor consecuencia, son las pérdidas económicas de las corridas debido a la proliferación o inoculación de microorganismos no deseados que provoquen que puedan afectar el crecimiento o supervivencia de los camarones, restando eficiencia al cultivo y poniendo en riesgo todo el proceso de producción.

Una de las limitantes para la evaluación es el equipamiento y tecnificación analítica necesario para la realización de pruebas rápidas y precisas que permitan una evaluación de este insumo.

En el mercado analítico existen pruebas diagnósticas rápidas que son relativamente económicas y que pueden ser implementadas en poco tiempo. La mayoría de las veces, no se usan por desconocimiento de su existencia, dudas sobre su fiabilidad, sensibilidad o una inhabilidad en su aplicación. Debido a la falta de evidencia relacionada a la inocuidad microbiana de la melaza, evaluar la calidad inicial, comparando diferentes métodos de análisis llenarían algunos vacíos de información, permitiendo optimizar la tecnología de cultivo al reducir el riesgo y mejorar los procesos de selección de insumos de calidad.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la carga microbiana de melaza de caña comercial mediante dos métodos cultivo dependiente.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el contenido bacteriano (bacterias totales, enterobacterias, hongos y vibrios) presentes en tres muestras de melazas comerciales.
- Comparar la sensibilidad analítica microbiana entre dos métodos comerciales (tradicional vs rápidos).
- Establecer el costo vs beneficio entre dos métodos de análisis microbiológicos utilizados.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Melaza

El azúcar es un producto muy comercializado a nivel mundial, para obtener su resultado final debe pasar por procesos tales como: corte, molienda, clarificación, cristalización y separación por centrifugación.

La melaza es un subproducto del azúcar, es un líquido que presenta un color marrón oscuro, viscosidad que le da poca fluidez y es generada durante la etapa de cristalización, en ese proceso se forman cristales de azúcar por la ayuda de las calderas generando el calentamiento a vapor (Zhang, S., Wang, J. & Jiang, H, 2020).

La melaza está compuesta por carbohidratos como: glucosa, sacarosa, levulosa, lactosa, maltosa y azúcares retores. Además, posee minerales como: potasio, hierro, calcio, sodio y fósforo (Fuentes, 2014). Cabe mencionar que, contiene aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas, también en cierta cantidad sustancias colorantes como melanoidinas y melaninas (Zhang et al., 2020).

1.4.2. Microorganismos de la melaza

La melaza al ser un medio muy nutritivo, ensayos han demostrado que en soluciones diluidas esta presenta muchos organismos, así como hongos, levaduras y bacterias (Figura 1.1) (Fajardo, 2007).

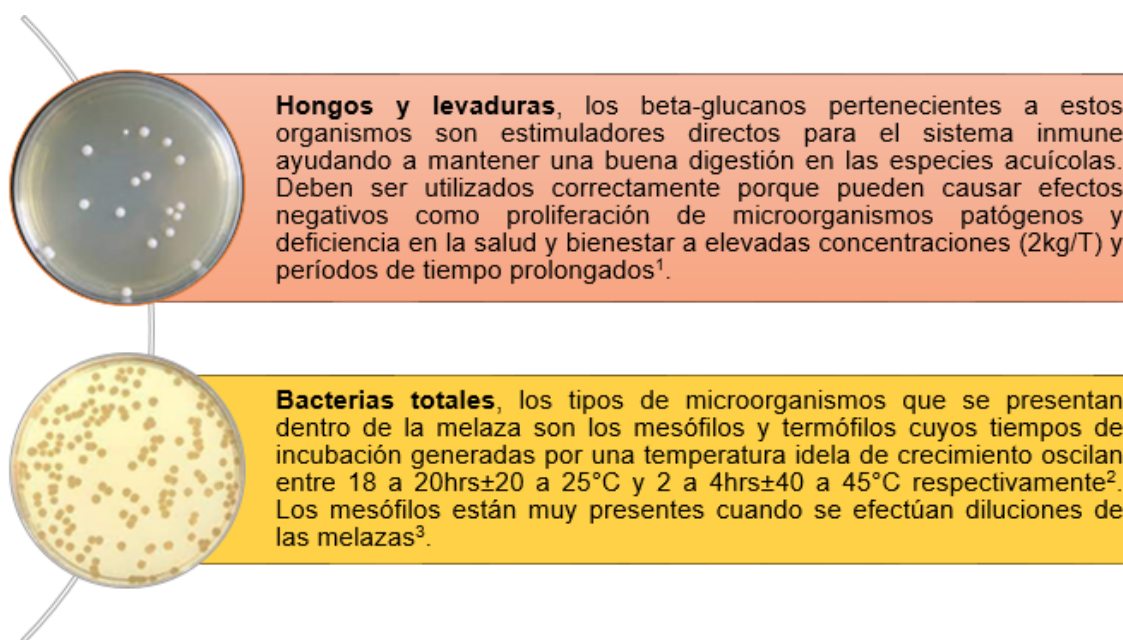


Figura 1.1 Tipos de microorganismos existentes en la melaza.

Fuente. (Tacon, 2022)¹, (Parra Huertas, 2010)², (Fajardo, 2007)³.

1.4.3. Uso de melaza en acuicultura

En el cultivo de engorde de camarón, estos crustáceos solo pueden asimilar del 20-30% de la cantidad de alimento para retención dentro del organismo, el 70-80% se excreta mediante las heces hacia el entorno del estanque. En ese instante, cerca del 50% del nitrógeno es introducido en el estanque debido al alimento y pasa a convertirse en gases tóxicos como NH_3 y NO_2 (Tom, 2018).

Según la Figura 1.2 la melaza es aplicada como fuente de carbono orgánico el cual constituye un desarrollo para la productividad natural de microorganismos presentes en la columna de agua del estanque y así obtener una fuente adicional de alimento para los organismos en cultivo (Hernández et al., 2019), permite que los cultivos de camarones sean resistentes o no a las variabilidades de los factores de producción, al tiempo que mejora su bienestar y salud (Figura 1.3).

La melaza también es usada para controlar y estabilizar el pH, por consecuencia del consumo del carbono proveniente de la molécula de CO_2 aprovechadas por la densidad de algas, lo que reduciría la acidez del agua causando que el pH aumente (Chephamsinhhocbio, 2021).

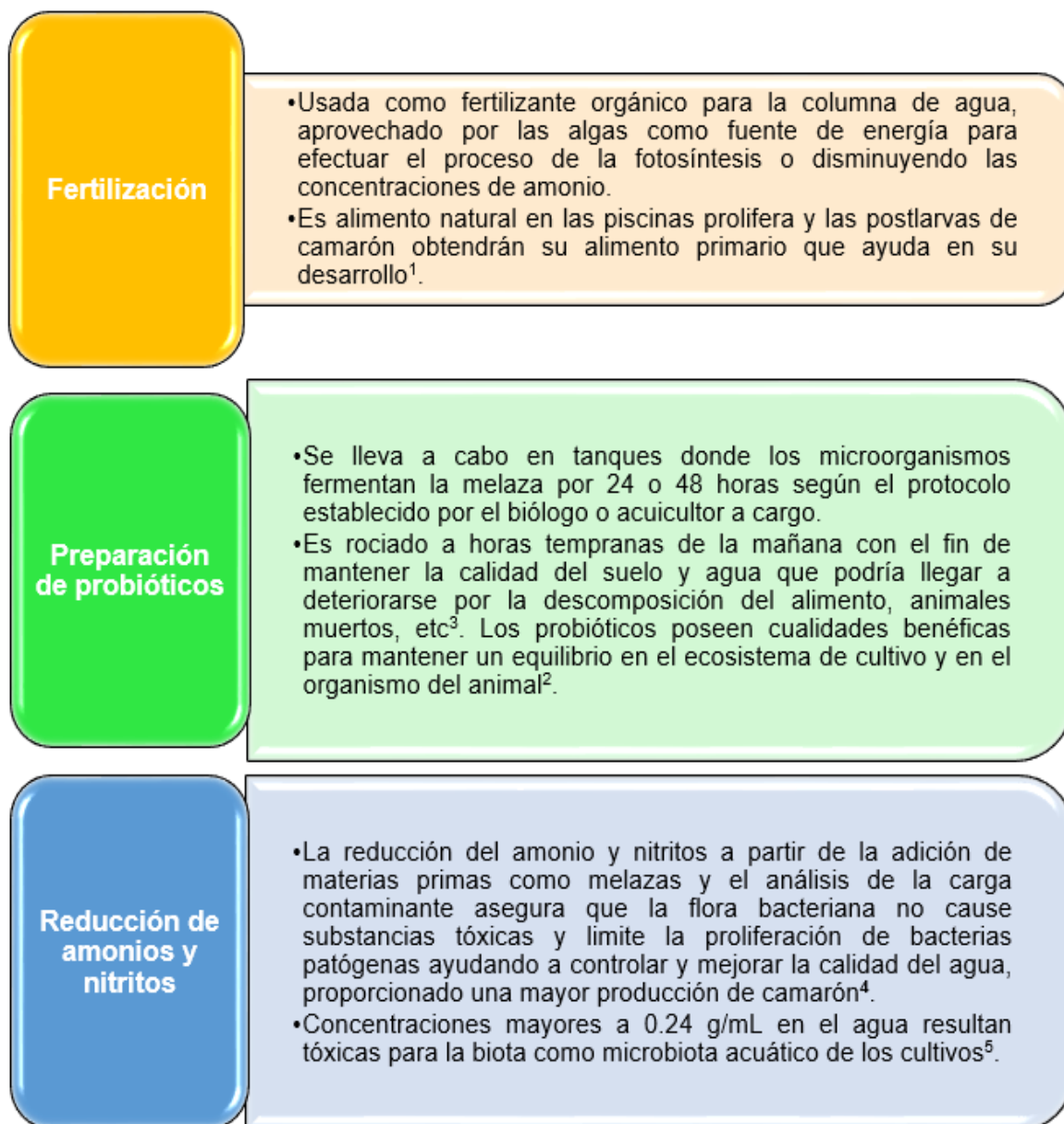


Figura 1.2 Usos de la melaza en los cultivos de camarones.

Fuente. (Fuentes, 2014)¹, (Popov et al., 2020)², (Rajasekar et al., 2018)³, (Hernández et al., 2019)⁴, (Ortega Mendoza, 2020)⁵.



Aplicar melaza, ayuda a que exista una competencia entre las algas y las bacterias heterótrofas por la fuente de carbono, lo que permitiría mantener una densidad de algas estables (chephamsinhhocbio, 2021).

El sustrato para el crecimiento de bacterias y disminuir la concentración de nitrógeno inorgánico que puede llegar a provocar mortalidades dentro de sus sistemas por el deterioro del agua y metabolitos tóxicos.

Posee una fácil y rápida asimilación con otros alimentos previniendo la fermentación alcohólica y favorece la absorción de grasas.

Fuente de carbono para bacterias probióticas.

La aplicación de melaza tiene un efecto sobre el oxígeno disuelto, ya que su uso aumenta el número de microorganismos en el sistema de cultivo, produciendo una reducción de la concentración de DO, por esa razón se debe mantener el OD en un alto nivel, no inferior a 4 ppm (Gayuh, 2020).

Crecimiento de bacterias patógenas que causan enfermedades.

Hongos y levaduras en aumento excesivo mueren, elevan la carga orgánica en descomposición y pueden generar cepas no específicas.

Figura 1.3 Ventajas (+) y desventajas (-) de melaza (carga bacteriana) para la acuicultura.

Fuente. (chephamsinhhocbio, 2021), (Gayuh, 2020).

1.4.4. Costos de melaza comercial

Según la Tabla 1.1 los costos de producción en todo el mundo varían; donde la melaza usada como fertilizante en camaroneras es una alternativa viable y de bajo costo, representando al segundo ítem más importante al igual que el alimento ya que busca suplir las necesidades de los sistemas productivos (Shang, 1992). En consecuencia, con respecto a la Tabla 1.2 en el mercado se estima que los costos de la melaza comercial en el país varían según sus presentaciones, indicador sobre los gastos representativos de consumo en producción para la acuicultura.

Tabla 1.1 Ítems de mayor costo (valores expresados en porcentajes) en los cultivos de camarón semi-extensivos o intensivos.

Fuente. (Shang, 1992).

<i>Ítem</i>	<i>Ecuador</i>	<i>China</i>	<i>Japón</i>	<i>Indonesia</i>	<i>Filipinas</i>	<i>Taiwán</i>	<i>Texas</i>	<i>Tailandia</i>
<i>Postlarvae</i>	27	6	5	30	9	15	27	20
<i>Alimento y fertilizante</i>	25	77	43	45	32	43	30	29
<i>Electricidad y combustible</i>	4	-	12	-	-	5	3	7
<i>Personal</i>	3	12	9	13	11	7	10	9
<i>Mantenimiento</i>	4	-	11	-	-	2	2	3
<i>Intereses</i>	24	-	-	-	-	7	6	8
<i>Depreciación</i>	9	-	3	-	-	3	9	18
<i>Otros</i>	4	5	17	12	48	18	13	6

Tabla 1.2 Detalle del precio unitario de diferentes presentaciones de melaza.

Fuente. (Álvarez, 2017).

<i>Detalle</i>	<i>Unidad de medida</i>	<i>Precio unitario</i>
<i>A granel</i>	1000 kilos	\$ 240
<i>Fundas</i>	30 kilos	\$ 8,00 (camaroneras)
<i>Canecas</i>	30 kilos	\$ 8,50 (ganaderos)

1.4.4.1. Consumo promedio melaza por hectárea

En Ecuador los sectores camaroneros de más área productiva son las provincias de Guayas, El Oro, Manabí y Esmeraldas. El área que se mantiene para cultivar el camarón blanco *Penaeus vannamei* que es la principal especie de Ecuador es aproximadamente de 240.000 hectáreas (Morales & Guzmán, 2021).

A continuación, se presenta un cálculo del consumo de melaza en función de las hectáreas totales por cada piscina en un ciclo de cultivo (90 días aproximadamente), donde se detalla que el consumo promedio de melaza como fertilizante es de 11 kg/ha, probiótico directo al agua y al fondo de las piscinas 30 lt/ha respectivamente, todos los valores son obtenidos según Morales & Guzmán, 2021 (Tabla 1.3).

Tabla 1.3 Cálculo del promedio del consumo de melaza en un ciclo de cultivo.

Fuente. (Morales & Guzmán, 2021).

<i>Piscina</i>	<i>Hectáreas (ha)</i>	<i>Promedio (kg/ha)</i>	<i>Consumo por ciclo (kg)</i>
<i>P1</i>	5.8	148.00	858.4
<i>P2</i>	5.5	149.35	821.4
<i>P3</i>	3.5	148.00	518
<i>P4</i>	2.5	148.00	370
Total	17.3	148.34	2567.8

Realizado por: Autores, 2022.

1.4.4.2. Consumo anual melaza

En base a los valores obtenidos en la sección anterior, se procede a calcular el consumo anual de melaza de acuerdo con el tiempo de precría y engorde de los cultivos, suponiendo que al año se realizan 4 ciclos. (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Cálculo del promedio del consumo de melaza anual en un ciclo de cultivo.

<i>Piscina</i>	<i>Hectáreas (ha)</i>	<i>Promedio (kg/ha)</i>	<i>Consumo por ciclo (kg)</i>	<i>Consumo anual (kg)</i>
<i>P1</i>	5.8	148.00	858.4	3.433,6
<i>P2</i>	5.5	149.35	821.4	3.285,6
<i>P3</i>	3.5	148.00	518	2.072
<i>P4</i>	2.5	148.00	370	1.480
Total	17.3	148.34	2567.8	10.271,2

Realizado por: Autores, 2022.

1.4.4.3. Estimación y proyección de costos

Para el año 2022, existen 1.498 empresas en estado legal que pertenecen a la clasificación CIIU, sobre la explotación de criaderos de camarón y criaderos de larvas (Durán, 2022).

Considerando el consumo anual en las 4 piscinas pequeñas con un total de 17.3 ha del cálculo anterior se estima que los gastos generados por la empresa para la obtención del insumo comercial (melaza) en sacos de 30 kilos a \$8, sería de aproximadamente \$2.744,00 lo que equivale a la compra de 343 sacos.

Para tener una estimación como referencia del consumo total anual si se aplican las dosis de melaza descritas con anterioridad, en todas las camaroneras del Ecuador, se presenta la siguiente Tabla 1.5 donde se evidencia el elevado valor de este insumo en la industria camaronera.

Tabla 1.5 Estimación y proyección de costos del consumo de melaza en áreas productivas de camarón en Ecuador.

Fuente. (Alvarado, 2020); (Bernabé, 2016).

<i>Pais</i>	<i>Hectáreas en producción</i>	<i>Número de camaroneras</i>	<i>Número de laboratorios</i>	<i>Costo melaza comercial</i>	<i>Consumo anual (kg)</i>	<i>Total costo anual</i>
<i>Ecuador</i>	240.000	3.000	205	\$8	142.404.000	\$37.974.400

Realizado por: Autores, 2022.

1.4.5. Métodos de diagnóstico de conteo microbiano

Los medios de cultivos son una herramienta necesaria al momento de realizar un análisis presuntivo o específico, se los puede encontrar de manera comercial y de acuerdo con su preparación pueden ser medios en forma líquida, semisólido y sólido; y por su uso pueden ser medios generales, selectivos, diferencial, enriquecimiento, mínimo y de transporte (Rovira, 2019).

Los métodos tradicionales o convencionales se caracterizan por tener un tiempo más prolongado con respecto a la obtención, preparación, lectura y análisis de resultados (Figura 1.4).

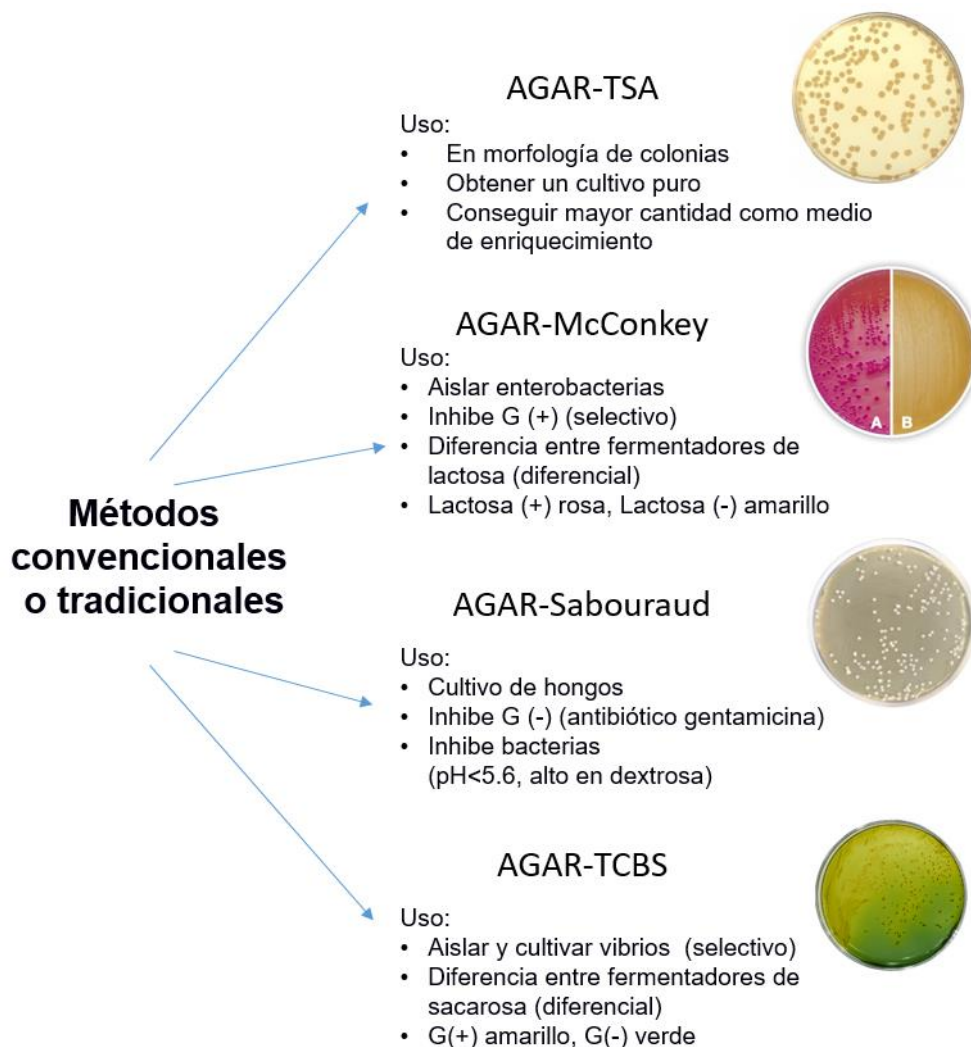


Figura 1.4 Medios de cultivo más comunes usados en métodos convencionales o tradicionales.

Fuente. (Claudio Rodríguez Martínez, 2018).

Por el contrario, los métodos miniaturizados o rápidos son medios de cultivos secos para el conteo de bacterias, sin necesidad de requerir una preparación en su uso (Figura 1.5). Se pueden mantener a temperatura ambiente, de 1-30°C. Vida útil de 18 a 24 meses, optimizando su uso en los laboratorios (MicroPlanet, 2019).

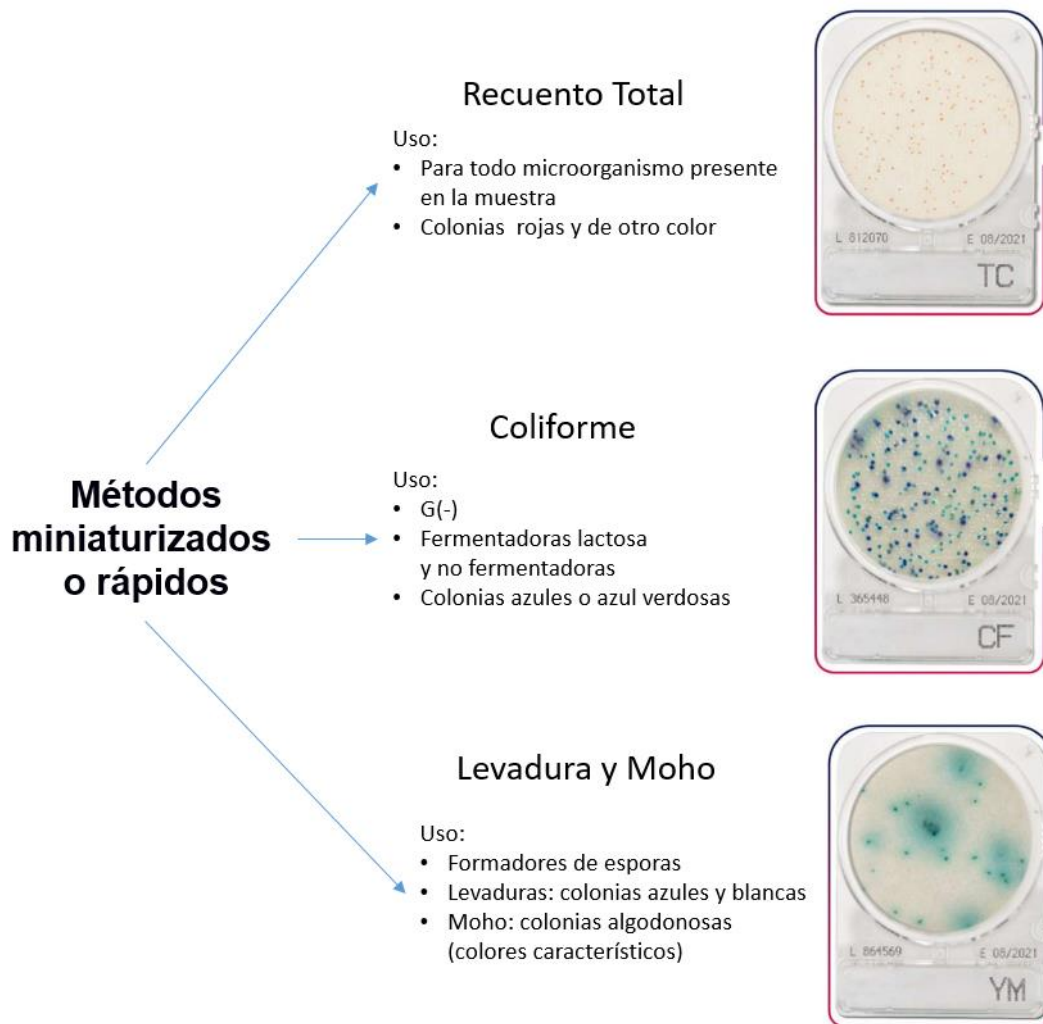


Figura 1.5 Medios de cultivo más comunes usados en métodos miniaturizados o rápidos. Fuente. (Compact Dry, 2022).

Los análisis microbianos requieren de costos de inversión en la implementación de un laboratorio con equipos básicos que oscilan entre \$899,1 y \$27.720 cuyo valor adicional en base a los reactivos e implementos necesarios que se requieren para un diagnóstico por medio de métodos tradicionales tiene un valor de \$498 a comparación de los métodos rápidos con un valor de \$98 (Tabla 1.6).

Tabla 1.6 Distribución de presupuesto de materiales, equipos y reactivos para laboratorio.

Realizado por: Autores, 2022.

Materiales de laboratorio	Cantidad	Costo (\$)	Costo total
Pipetas (10ml)	5	4	20
Matraz Erlenmeyer (1000ml)	2	15	30
Lysol	4	6	24
Cintas químicas de esterilización	1 rollo	9.50	9.50
Probeta (100 ml)	1	100	100
Papel aluminio	2	4	8
Micropipeta (1000 µl)	1	-	600
Matraz Erlenmeyer (500 ml)	4	6	24
Toallas desechables	4	3.15	12.6
Tubos falcon	Paquete de 100	-	11
Puntas plásticas azules	Paquete de 500	-	9
Gradilla	1	5	5
Agua destilada	10 gl	3	30
Alcohol	2	3	6
Mechero de alcohol	2	5	10
TOTAL			\$899,1
Equipos de laboratorios			
Placa calefactora y agitadora	1	600	600
Vortex	1	400	400
Balanza	1	120	120
Autoclave	1	6000	6000
Incubadora	1	500	500
Cabina de flujo laminar	1	20000	20000
TOTAL			\$27.620
Reactivos			
Frasco Merck cloruro de sodio	1	100	100
TOTAL			\$100
Materiales y Reactivos Método Tradicional			
Cajas Petri	4 paquetes	23	92
Dispensor celular de acero	2	3	6
Frasco Merck TCBS	1	100	100
Frasco Merck TSA	1	100	100
Frasco Merck Sabouraud	1	100	100
Frasco Merck Mac Conkey	1	100	100
TOTAL			\$498
Materiales y Reactivos Método Rápido			
Paquete Dry CF	7	4.5	31.5
Paquete Dry TC	7	4.5	31.5
Paquete Dry YM	7	5	35
TOTAL			\$98

1.4.6. Pérdidas económicas causadas por patógenos

Las bacterias promueven la estabilidad ecológica y reciclaje de nutrientes, algunas de ellas generan un gran impacto perjudicial sobre la salud de los camarones debido a factores estresantes en el cultivo causando enfermedades (Revista Acuicultura, 2015). La producción acuícola ha aumentado en los últimos años, sin embargo; el monitoreo de parámetros productivos ha disminuido, dando pie a la multiplicación de enfermedades causadas por diversos agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos y parásitos que perjudican la salud y rentabilidad del sistema productivo, lo que suscitan la principal amenaza para el sector acuícola con importantes pérdidas económicas en las producciones a nivel mundial (Figura 1.6) (Varela & Choc-Martínez, 2020).

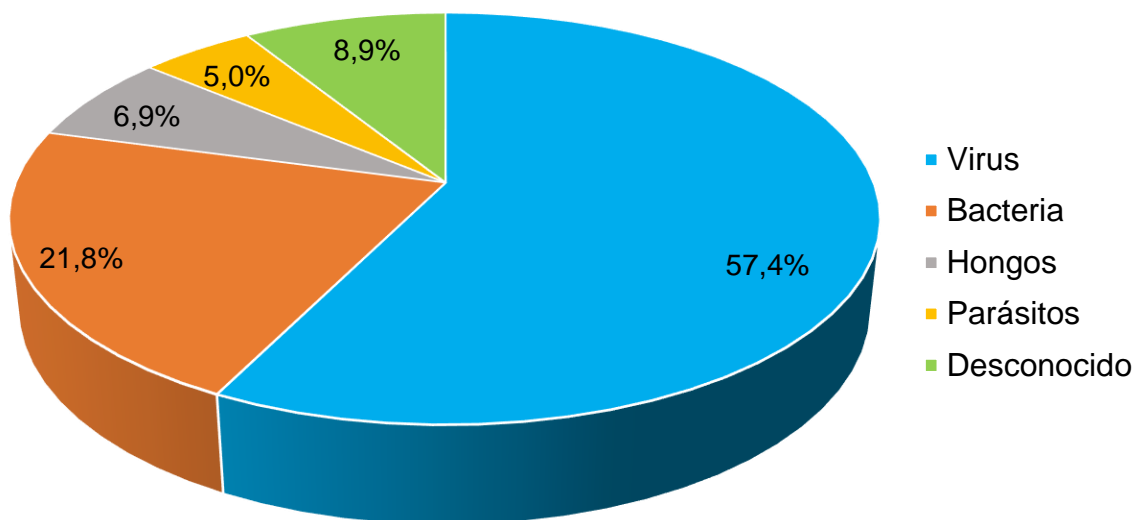


Figura 1.6 Participación de los principales grupos patógenos en las pérdidas económicas de la industria camaronera durante un año.

Fuente. (Figueredo A., y otros, 2022).

Algunas de estas enfermedades son causadas por patógenos que poseen rápida dispersión, fácil colonización y su proceso de eliminarla en su totalidad es poco probable causando mortalidades severas y pérdidas millonarias dentro de sus actividades productivas (cosechas, empleos, exportaciones, etc.) de la industria camaronera (Tabla 1.7) (Moss M., Moss R., Arce M., Lightner V., & Lotz M., 2012)

Tabla 1.7 Pérdidas económicas estimadas en la camaronicultura causadas por algunas de las enfermedades más importantes (montos expresados en millones de dólares; ND = No determinado).

Fuente. (Figueredo A., y otros, 2022).

Enfermedades ¹	Región		Totales
	América	Asia	
<i>IHHNV</i>	500-1.000		500-1.000
<i>TSV</i>	2.000	1.200	3.200
<i>WSSV</i>	>2.000	>6.000	>8.000
<i>YHV</i>	ND	500	500
<i>IMNV</i>	ND	ND	1.200
<i>AHPND</i>	ND	ND	>6.00
<i>EHP</i>	ND	ND	1.000

¹ (**IHHNV**) Virus de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética; (**TSV**) Síndrome del Virus de Taura; (**WSSV**) Virus del Síndrome de la Mancha Blanca; (**YHV**) Virus de la Cabeza Amarilla; (**IMNV**) Virus de la Mionecrosis Infecciosa; (**AHPND**) Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas; (**EHP**) *Enterocytozoon hepatopenaei*.

La carga bacteriana a niveles observados comúnmente en cultivos con sistemas extensivos de camarón, de 10^5 a 10^6 UFC/mL (Abraham & Sasmal, 2009).

En juveniles, preadultos o adultos, se consideran niveles de seguridad los conteos de colonias de 10^2 UFC/g en hepatopáncreas (Cuéllar-Anjel, 2013).

Es importante detectar las enfermedades que afectan directamente a los sistemas acuícolas para prevenir la introducción de agentes infecciosos, protegiendo el beneficio económico que es generado dentro sector productivo y garantizar a largo plazo la sostenibilidad de la industria, reconociendo los valores permisibles mínimos de carga microbiana.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El problema sobre la incertidumbre de la calidad de las melazas comerciales nace en respuesta a una problemática indicada por una de las corporaciones camaroneras más grande de Ecuador, que ha observado debilidades en la melaza de caña para su uso como insumo acuícola.

La selección de las tres muestras de melazas de caña comerciales se obtuvo por la corporación camaronera quien realizó la elección de los insumos acuícolas provenientes de diferentes marcas en base a sus intereses de inocuidad en sus ciclos de cultivo (fertilización, preparación de probióticos, costos, manipulación, entre otras) para la obtención de resultados con respecto al estudio del objeto de investigación. La evaluación y el análisis se basó en la composición de las 3 muestras analizadas y determinar si los métodos microbiológicos clásicos (TCBS, TSA, Mc Conkey, Sabouraud) o rápidos (TC, CF, YM) tienen diferencias en costos y sensibilidad de detección con la intención de optimizar el proceso de producción.

2.1. Análisis microbiano

El análisis microbiano de 3 muestras de melazas de caña comerciales fue evaluado mediante dos métodos (tradicional en placa y compacto) y comparada su sensibilidad analítica en términos de recuperación bacteriana en medios selectivos tradicionales y métodos rápidos.

La preparación de los medios tradicionales se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida por el fabricante. Los métodos rápidos no necesitan preparación para su uso, ya que son elaborados directamente por el fabricante.

Diluciones seriadas en solución salina estéril de cada una de las muestras de melaza comercial analizadas fueron preparadas según se indica la Figura 2.1. Un mililitro de las diluciones indicadas fue sembrado en réplicas (n=3) tanto en los medios de cultivo tradicionales y en los medios de auto difusión rápidos. Para determinar bacterias totales se sembró en medio Agar Tripticosa de Soya (TSA) y Recuento Total (TC); coliformes se sembró en medio MacConkey y Coliformes Fecales (CF); Vibrios fue solo en tradicional mediante

medio selectivo Tiosulfato Citrati Bilis Sacarosa (TCBS); levaduras y hongos fueron simultáneamente inoculados en medio tradicional Sabouraud y Yeast-Mold (YM). Solamente en los métodos tradicionales fue necesario durante el plaqueo esparcir la muestra sobre la superficie del medio con ayuda del asa de vidrio, a diferencia del método rápido no requería esparcir la muestra debido a que no se generan burbujas en la siembra por poseer membranas de filtración.

La selección de las concentraciones (10^4 , 10^5 y 10^6) fueron considerada porque mientras mayor sea el factor de dilución, se puede inferir la calidad microbiológica de las muestras debido a que el número de colonias a generarse debe ser menor o nula. Se emplearon 3 réplicas por cada dilución para evitar errores estadísticos de muestreo (Láñez, 2005).

Las placas tradicionales y medios rápidos para bacterias totales, enterobacterias y vibrios fueron incubadas por 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, mientras que hongos y levaduras se mantuvieron durante 15 días a temperatura ambiente.

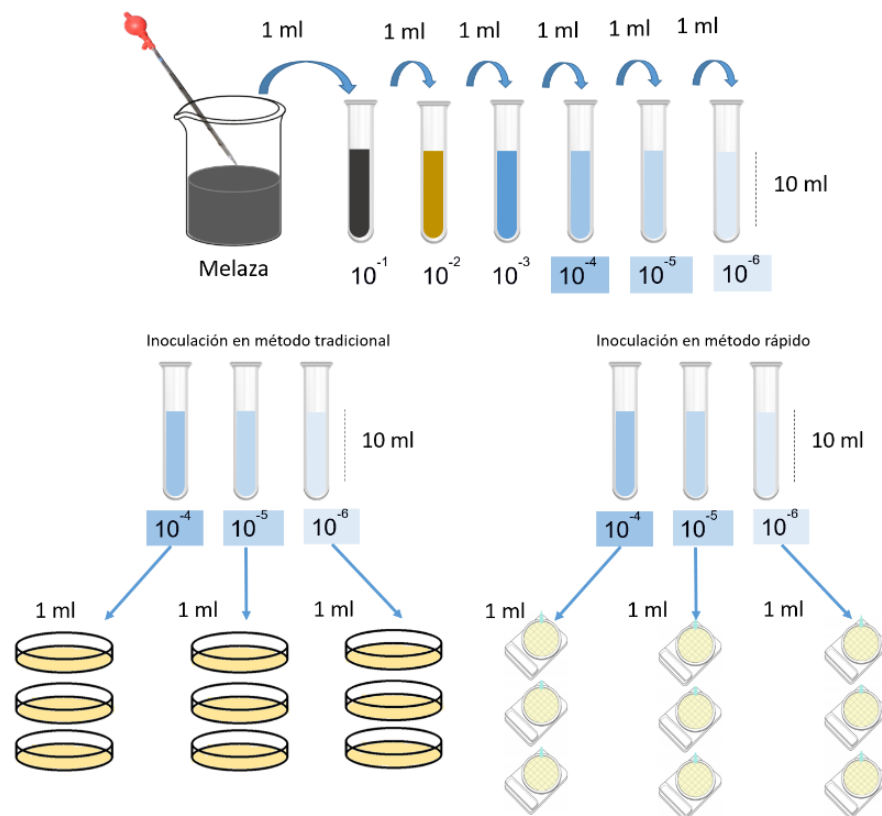


Figura 2.1 Diseño experimental de la melaza mediante diluciones seriadas para los métodos tradicional y rápidos.

Fuente. Autores, 2022.

2.2. Conteo de colonias

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) aislado en ambos métodos fueron contabilizados y expresados en UFC/mL.

2.3. Análisis presupuestario

La evaluación de los materiales y reactivos usados independientemente en los métodos tradicionales y rápidos (Tabla 1.6) permitió la asignación y distribución de los recursos en la obtención del contenido microbiano de las tres melazas de caña comercial con el fin de conocer los gastos unitarios por cada placa (tradicional) y cada lámina (rápido) que se empleó entre los métodos, cuyo propósito se basó en analizar en el menor tiempo los posibles contaminantes microbiológicos como bacterias, entero bacterias, vibrios, hongos y levaduras; garantizando la inocuidad de las muestras a partir de la selección del más económico, rentable y prever riesgos en los ciclos de cultivo.

El costo referencial por cada placa para medios de cultivos convencionales es de \$0.70; mientras que el costo total referencial de preparación para una placa corresponde a \$1.05 TCBS (vibrios), \$0.95 TSA (bacterias totales), \$0.90 Sabouraud (hongos y levaduras) y \$1.20 MacConkey (enterobacterias).

Por otro lado, el costo total referencial por cada lámina para medios más comunes en los paquetes CF (coliformes totales) y TC (recuento total) son de \$1.13 respectivamente, mientras que \$1.25 para YM (hongos y levaduras).

2.4. Análisis estadístico

El conteo total de UFC/mL por cada medio de análisis microbiano (tradicionales y rápidos) respecto a los valores referenciales permitidos a usar de melaza de caña comercial en camaroneras, donde se llevó a cabo la agrupación del conteo de las colonias de las tres muestras de melazas y sus réplicas (n=3), para cada medio de bacteriano (bacterias totales, enterobacterias, vibrios, hongos y levaduras) con su respectiva concentración microbiológica (10^4 , 10^5 y 10^6) mediante el uso de la herramienta de Microsoft Excel.

Se procedió al análisis estadístico por medio del software libre R-Studio. Se utilizó las transformaciones $\log(x)$, x^2 , $1/x$, \sqrt{x} , $\arcsin(x/100)$ para las variables que no cumplieron con la característica de normalidad. Se realizó una comparación de medias entre los dos métodos de diagnóstico por microorganismos cuantificados mediante la prueba Tukey Test y determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) para el análisis de sensibilidad analítica microbiana

No obstante, se estableció el costo beneficio entre los dos métodos de análisis microbiológicos utilizados basado en criterios (tiempo, costo, lectura, manipulación, entre otros) para la selección de lo más rentable, económico y eficaz en la identificación de microorganismos y obtención de mayor beneficio en calidad del insumo acuícola, donde si cumple el 80% será el indicado.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

La interpretación de los resultados microbiológicos utilizados define la aceptabilidad de un producto y/o ingrediente en base a la concentración en UFC o presencia/ausencia de contenido microbiológico. Los resultados obtenidos, se compararon con la normativa o reglamentos técnicos obligatorios y recomendados como requisitos para evaluar la inocuidad de productos alimenticios (ISO) y acuícolas (INEN). Su incumplimiento estará sujeto sobre la necesidad de corregir o controlar el número de muestras, identificar problemas de manera temprana y alertar al responsable sobre los factores causantes del problema. Por lo cual se llevaron a cabo los siguientes análisis microbiológicos, comparación estadística entre métodos y análisis económico.

3.1. Cuantificación total de bacterias (UFC/mL)

La cuantificación permitió el conteo de las unidades formadoras de colonias en las tres muestras de melazas de caña comerciales sembradas en réplicas (n=3). Sin embargo, para un mejor control de este análisis se comparó los resultados siguiendo protocolos estándar de inocuidad, analizando bacterias totales (TSA, TC), enterobacterias (MacConkey, CF), vibrios (TCBS), hongos y levaduras (Sabouraud, YM), además, se corrobora sobre la calidad microbiana que presentan las melazas.

Tabla 3.1 Presencia (+) o ausencia (0) del contenido bacteriano (UFC/mL) entre métodos comerciales presentes en 3 muestras de melaza de caña, luego de las 24 horas para los medios vibrios (TCBS), bacterias totales (TSA, TC), enterobacterias (MacConkey, CF) y por 15 días hongos y levaduras (Sabouraud, YM).

Fuente. Autores, 2022.

Factor	Melaza 1							Melaza 2							Melaza 3							
	Tradicional				Rápido			Tradicional				Rápido			Tradicional				Rápido			
	TCBS	TSA	Mc	Sa	TC	CF	YM	TCBS	TSA	Mc	Sa	TC	CF	YM	TCBS	TSA	Mc	Sa	TC	CF	YM	
10 ⁴	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	
10 ⁵	0	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0
10 ⁶	0	0	0	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	0	

* El análisis para TCBS no estuvo disponible en los métodos rápidos.

*TSA-TC: métodos para detección de bacterias totales.

*MacConkey-CF: métodos para detección de enterobacterias.

*Sabouraud-YM: método para detección de hongos y levaduras.

Según la Tabla 3.1 expone la evaluación de presencia o ausencia del contenido microbiano para cada una de las tres muestras del insumo acuícola melaza de caña comercial entre métodos aplicados. Para la melaza 1 bajo los métodos tradicionales no se observó crecimiento de colonias en ninguna de las tres diluciones con respecto a los cuatro medios de cultivo TCBS (vibrios), TSA (bacterias totales), MacConkey (enterobacterias), Sabouraud (hongos y levaduras); sin embargo, los métodos rápidos presentaron crecimiento de colonias en las diluciones con respecto a los tres medios, los valores promedios del contenido de bacterias totales (TC) fue de (3.33E+03, 2.00E+05, 1.00E+06); para enterobacterias (CF) fue de (0, 2.67E+05, 2.83E+07); para hongos y levaduras (YM) fue de (0, 3.67E+05, 0), para las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 respectivamente.

Mientras que para la melaza 2 bajo los métodos tradicionales se observó que existe crecimiento de colonias en dos de las tres diluciones, los valores promedios de contenido de bacterias totales (TSA) en la dilución 10^4 fue de (6.67E+03) y para la dilución 10^6 fue de (4.67E+06), por otro lado, los métodos rápidos mostraron crecimiento en una sola dilución (10^6) presentes en el medio TC, dando resultados de crecimiento altos (1.00E+07), que al ser comparado con el método tradicional para la misma dilución (10^6) resultó ser más alto.

Por otro lado, en la melaza 3 se puede observar que existe a menores diluciones (10^4), menores concentraciones de bacterias, también que los métodos tradicionales presentaron crecimiento de colonias para bacterias totales (TSA) de (3.33E+04) y (4.00E+06) en diluciones (10^5) y (10^6), pero en hongos y levaduras (Sabouraud) únicamente en la dilución (10^5) con (6.60E+06). Los métodos rápidos mostraron crecimiento en dos diluciones (10^4 y 10^6) con respecto a bacterias totales (TC) en concentraciones de hasta (1.00E+05) y enterobacterias (CF) en diluciones mayores (10^6) dando resultados de crecimientos altos hasta de (1.00E+07).

En las tres muestras de melazas de caña es importante destacar que al comparar los resultados obtenidos en los métodos tradicionales las diluciones más altas de melaza resultan con crecimientos más bajos de contenido bacteriano, correspondientemente con el hecho que las altas concentraciones de sacarosa inhiben el crecimiento de

microorganismos, mientras que a concentraciones bajas sucede todo lo contrario, esto quiere decir, que existe una estimulación del crecimiento bacteriano, y lleva a convertir a la sacarosa en un sustrato que beneficia el crecimiento para las bacterias como lo demuestra (Mizzi, y otros, 2020). Los análisis de crecimiento de bacterias en las tres muestras de melazas exhiben que en la concentración más baja solo se observó crecimiento de bacterias totales (TSA) en los métodos tradicionales, la cual resultó ser la mayor concentración (UFC) inclusive en comparación con los métodos rápidos (TC). Además, en nuestro estudio el medio TCBS que corresponde a vibrios no presentó ningún crecimiento bacteriano en las tres muestras de melazas comerciales.

La melaza de caña según el (Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN)., 1990) se considera como un alimento zootécnico compuesto para camarones y que al ser un producto de consumo humano debe a su vez cumplir con la normativa de la (Organización Internacional de Estandarización (ISO)., 2013), deberá cumplir con las especificaciones establecidas descritas en la Tabla 3.2, donde mencionan el máximo contenido microbiológico en UFC para cada parámetro.

Tabla 3.2 Requisitos microbiológicos.

Fuente. INEN (1990), ISO (2013).

<i>Parámetros</i>	<i>Máximo UFC</i>	<i>Método de ensayo</i>
<i>Bacterias totales</i>	1x10 ⁵	INEN 1 529
<i>Enterobacterias</i>	1x10 ³	INEN 1 529
<i>Vibrios</i>	No detectable	ISO 21872-1:2017
<i>Hongos y Levaduras</i>	1x10 ⁴	INEN 1 563

En base a lo examinado, el conteo de microorganismos (bacterias, enterobacterias, hongos y levaduras) en cada una de las muestras de melazas de caña destinadas como insumo acuícola contienen niveles que superan lo establecido en las normas ISO e INEN. Lo que podría conducir a un riesgo en la homeostasis microbiana del sistema de cultivo, en caso de que las bacterias presentes sean patógenas. Debido a las concentraciones encontradas de bacterias totales (hasta 10⁷) en las tres muestras de melazas, estas podrían generar una incidencia negativa dentro del cultivo. Por lo tanto, según (Cai, Choi, & J.G., 2021) conocer la diversidad y realizar evaluaciones preliminares de inocuidad, frecuencia de muestreo, así como cantidad de melaza administrada a los sistemas de producción de camarón, nos permitirá tener un mejor control sobre la calidad

de la melaza como insumo acuícola, reduciendo el riesgo de uso y elevando los estándares de calidad para ese insumo.

Algo importante de destacar es que, debido a las concentraciones de microorganismos obtenidos en nuestro estudio, mayores a lo reportado por el INEN e ISO, podría considerarse que la comercialización y venta de las melazas de caña muestreadas no logra alcanzar el estándar adecuado para su consumo humano o como insumo acuícola.

3.2. Sensibilidad analítica microbiana

Aun cuando en la mayoría de los métodos de detección de bacterias presentaron crecimiento, los métodos específicos para vibrios como el TCBS, no mostraron ningún crecimiento. Al comparar los métodos tradicionales con los rápidos podemos identificar que existen diferencias ($p < 0.05$) entre estos en UFC, con una clara tendencia a generar valores más altos en los métodos rápidos y más bajos en los tradicionales. Debido a que las diluciones menores (10^6), se observó un mayor número de colonias principalmente de bacterias totales para todos los métodos (TSA y TC) en los tres tipos de melaza (Tabla 3.3), se puede recomendar esta dilución como la más adecuada para realizar comparaciones analíticas entre métodos, permitiendo contribuir a la determinación de la sensibilidad de diagnóstico.

Tabla 3.3 Concentración de bacterias totales (UFC/mL) de los métodos tradicional (TSA) y rápido (TC) respecto al factor de dilución (10^6).

Fuente. Autores, 2022.

<i>Melazas</i>	<i>UFC/mL</i>	
	TSA	TC
<i>M1</i>	0	1.00E+06
<i>M2</i>	4.67E+06	1.00E+07
<i>M3</i>	4.00E+06	3.33E+05

Por lo cual se puede inferir que los métodos rápidos contribuyeron con una mayor sensibilidad de diagnóstico a diferentes concentraciones, aunque en la melaza 1 no hubo crecimiento de colonias para el método tradicional (TSA), se puede considerar que presenta mejor calidad. En general la sensibilidad de los resultados obtenidos por todas las tres muestras y medios (exceptuando TCBS) en base a sus tres diluciones reflejan que la melaza 2 presenta mejor calidad e inocuidad como insumo acuícola debido a la aproximación de sus análisis entre métodos aplicados aun cuando no ha alcanzado las normas o requisitos microbiológicos por la ISO e INEN.

3.3. Análisis costo beneficio

Es importante tener presente lo siguiente: costo de oportunidad y valor del dinero en el tiempo.

3.3.1. Costo de oportunidad

Las decisiones en algunos casos no son tan importantes, pero en ciertas ocasiones pueden afectar lo que pase en el futuro. Cuando se elige una opción y descartamos el resto de las alternativas, estamos renunciando a los beneficios y costos que pueden ser cuantitativos como cualitativos de aquellas alternativas, a esta acción se la conoce como costo de oportunidad (Esperanza, 2022).

Para dar respuesta a este análisis se han desarrollado dos situaciones (A y B). Estas situaciones nos brindan una proyección económica de lo que podría llegar a ocurrir, y aproximarnos a las decisiones reales que se toman en el mundo laboral (cualquier parecido con la realidad es pura coincidencia).

Analicemos las siguientes situaciones:

En el laboratorio llegan tres muestras de melaza de caña de diferente marca para su análisis microbiológico de bacterias totales, enterobacterias, hongos y levaduras, las cuales son procesadas según el método tradicional (Estimación A) y método rápido (Estimación B). En la Tabla 3.4, se conocen los costos para el conteo microbiano por cada placa empleando el método tradicional (plaqueo) y por lámina en el método rápido (autodifusión), por ello se requiere conocer y evaluar el conteo microbiano entre métodos según las muestras mencionadas.

Tabla 3.4 Comparación económica entre métodos comerciales.

Variables	Número de muestras (n)	Métodos tradicionales			Métodos rápidos		
		Número de placas $(n \cdot x) + 1$; $x=3$	Costo unitario por placa	Costo total por muestras	Número de láminas $(n \cdot x)$; $x=3$	Costo unitario por lámina	Costo total por muestras
Bacterias totales	3	10	\$0.95	\$9.50	9	\$1.13	\$10.17
Enterobacterias	3	10	\$1.20	\$12	9	\$1.13	\$10.17
Hongos y levaduras	3	10	\$0.90	\$9	9	\$1.25	\$11.25
Costo total por análisis				\$30.50			\$31.59

*n, número de muestras.

*x, número de réplicas por muestras.

*+1, placa en esterilidad.

Estimación A:

Estas muestras se procesan para el Agar TSA, Agar Mac Conkey y Agar Sabouraud. Se utilizaron placas Petri de 90 mm x 15 mm. Como prueba de esterilidad se prepara una placa más por cada agar.

En el laboratorio se puede observar que una de las tres muestras de melaza no presenta crecimiento en los agares, en la siguiente melaza se obtuvo crecimiento solo en el agar TSA y en la última muestra de melaza se obtuvo crecimiento en el agar TSA y Sabouraud. Después de 8 horas de preparación y 24 horas de espera para la lectura, el encargado de los análisis reporta los resultados comentando que una de las melazas no presenta crecimiento en los agares y que esta puede ser la mejor en cuanto a su inocuidad microbiológica.

Estimación B:

Estas muestras se procesan en láminas miniaturizadas TC, CF y YM. Estas laminas ya vienen preparadas y esterilizadas, listas para su uso.

En el laboratorio se puede observar que una de las tres muestras de melaza presento crecimiento en las tres laminas TC, CF y YM, en la siguiente melaza se obtuvo crecimiento solo en la lámina TC y en la última muestra de melaza se obtuvo crecimiento en las láminas TC y CF. Después de 1 hora de preparación y 24 horas para la lectura, el encargado reporta el resultado comentado que las tres melazas presentan crecimiento en las láminas y que no puede considerarse como inocuas.

El costo de oportunidad de elegir el método tradicional para realizar los análisis microbiológicos y no a los métodos rápidos, es que se renuncia al beneficio de poder tener buenas lecturas de los crecimientos bacterianos presentes en las tres muestras de melaza, que su costo no es muy relevante y su tiempo con respecto a la preparación favorece en obtener resultados más rápidos.

Además de las estimaciones previas se logró obtener criterios y suministrar información sobre las características microbianas de los métodos comerciales, con el fin de permitir aceptación o rechazo del uso en cultivo de las melazas analizadas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Evaluación de criterios de calidad de métodos de diagnóstico.

Fuente. Autores, 2022.

Criterios*	Rango	Métodos tradicionales	Métodos rápidos
Eficiencia y sensibilidad	mayor recuento de colonias detectadas		X
Lectura	fácil	X	X
Costo	menor	X	
Manipulación	fácil	X	X
Tiempo elaboración	mínima		X
Ocupación de espacio	mínima		X
Caducidad y vida útil	18 – 24 meses		X
Interpretación resultados	fácil		X
Transporte	fácil		X
Volumen de material de desecho	mínimo		X
TOTAL		30%	90%

*Si se cumple el 60% de los criterios mencionados, será el indicado.

*Métodos tradicionales cumplieron el 30% de los criterios.

*Métodos rápidos cumplieron el 90% de los criterios.

La comparación de las estimaciones resultó significativamente más económica para los métodos tradicionales, sin embargo, la comparación técnica y analítica que brinda este método para los análisis microbianos en base a los criterios establecidos consta con el 30%, mientras que los métodos rápidos el 90%.

3.3.2. Valor del dinero en el tiempo

El valor del dinero en el tiempo se lo puede relacionar como una inversión a futuro para obtener ganancias y rentabilidad del negocio. Medir el valor del dinero es fundamental, ya que nos ayuda a tomar buenas decisiones y con ello tener en cuenta los costos de oportunidad (Esperanza, 2022).

Para realizar análisis microbiológicos con medios de cultivo tradicionales se necesita personal capacitado (microbiólogo) para realizar las distintas preparaciones, dependiendo de lo que se vaya a analizar (Tabla 3.6). Este personal capacitado requiere de una remuneración y dicho pago corre por la empresa, así como también los costes por material directo e indirectos a usar dentro de un laboratorio automatizado y

requeridos en ese momento. Mientras que, las pruebas realizadas por los métodos rápidos no requieren de procesamientos extensos debido a su alta rentabilidad de eficiencia en aplicación, constituyéndose como herramienta básica con estrategias en costo y efectividad, reduciendo las inversiones por recursos o servicios y aumentando la rapidez en lectura de análisis sin tener la necesidad de la actuación de un microbiólogo.

Tabla 3.6 Costos referenciales de materiales empleados entre métodos tradicionales y métodos rápidos para análisis de bacterias totales, enterobacterias, hongos y levaduras.

<i>Métodos*</i>	<i>Material</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Costo (\$)</i>	<i>Costo total (\$)</i>	<i>Costo unitario (\$)</i>	
					Por placa	Por lámina
<i>Tradicionales</i>	Frasco Merck TCBS	500 g	100	100	1.05	
	Frasco Merck TSA	500 g	100	100	0.95	
	Frasco Merck Sabouraud	500 g	100	100	0.90	
	Frasco Merck MacConkey	500 g	100	100	1.20	
TOTAL				\$400	\$4.10	
<i>Rápidos</i>	Paquete Dry CF	7	4.5	31.5		1.125
	Paquete Dry TC	7	4.5	31.5		1.125
	Paquete Dry YM	7	5	35		1.25
TOTAL				\$98		\$3.50

*En los métodos tradicionales se consideró en el costo de preparación por placa el costo por caja Petri siendo de \$0.70

*No existieron costos referenciales para análisis de vibrios, debido a que el análisis TCBS no estuvo disponible en los métodos rápidos.

*Para cada uno de los métodos tradicionales, sin importar la cantidad de réplicas que se realicen por muestras siempre se necesitará 2x por placa debido a que una siempre se lleva a esterilidad.

Es importante el ahorro del tiempo y dinero en los análisis microbiológicos, además, impactar positivamente en la entrega de resultados rápidos para cada uno de sus análisis. Por tal motivo, los métodos rápidos son los indicados para determinar la calidad del procesamiento de las muestras destinadas como insumo acuícola, valiendo la pena

invertir por obtener resultados más confiables, evitando la contaminación por microorganismos no deseables y mejorar la productividad.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Dentro del estudio, la cuantificación total (UFC/mL) mostro que los métodos tanto tradicional como rápidos presentaron los valores de crecimiento microbiano más altos con respecto al recuento de bacterias totales (TSA y TC) para las tres muestras de melaza. Sin embargo, fue el método rápido, el que mostró un mayor valor en UFC/ml en las tres muestras de melaza, identificándose como el más sensible.
- El método rápido tanto en crecimiento bacteriano como sensibilidad para las tres muestras de melazas de caña comercial, mostro crecimiento de colonias en los medios de cultivo analizados (exceptuando TCBS) para las tres diluciones (10^4 , 10^5 , 10^6), sin embargo, la melaza que presentó mejor inocuidad, presentando los menores valores de crecimiento de microorganismos, aun cuando sobrepasan sus valores las normas microbiológicos de la ISO e INEN en cuanto a contenido de microorganismos en insumos para acuicultura destinados a consumo humano.
- Las tres muestras de melazas de caña comercial de distintas marcas analizadas presentaron valores de contenido de microorganismos por encima del máximo permitido por las normas o reglamentos técnicos emitidos por la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).
- La falta de normas sanitarias no permite que las actividades sean ejercidas sin riesgos de contaminación microbiológica, por ello, los análisis microbiológicos son indicadores importantes que nos permite actuar de manera inmediata y disminuir la carga de bacterias patógenas evitando pérdidas en los cultivos.

- El control de crecimiento bacteriano y su impacto económico entre los métodos de análisis (tradicional y rápido) evaluados mediante la aplicación de criterios que sugieren conteos permisibles de colonias de bacterias, demostrando que es necesario aplicar medidas estrictas para el control de inocuidad de los insumos acuícolas, como la melaza de caña el cual posee muy poca información.
- La sensibilidad analítica entre los métodos comerciales arrojó diferencias significativas ($p < 0.05$), generando una evaluación de mayor efectividad de análisis microbiano en los métodos rápidos. Esta evaluación debe alcanzar los requerimientos microbiológicos de inocuidad establecidas por las normativas o instituciones encargadas de emitir los niveles de inocuidad máximos.
- Ninguna de las muestras analizadas (tipos de melaza de caña comercial y diluciones) mostraron crecimientos de colonias para el medio TCBS (tradicional) específicos para vibrios, siendo importante que, cuyos valores estén sujetos a investigaciones debido a que este medio no estuvo presente para el método rápido.
- Los métodos rápidos son capaces de simplificar el proceso de toma de muestra y análisis, lo que tiene un impacto en la veracidad de los resultados además de que muestran una mayor sensibilidad.
- Los métodos rápidos aun cuanto tienen un mayor costo representarían una mejora en los procesos de análisis en especial para grandes volúmenes de muestras microbiológicas a analizar.
- Es importante destacar que el proceso de análisis tradicional conlleva mayor tiempo de preparación y análisis, junto con la necesidad de tener microbiólogo personal capacitado para evitar solubilidad incompleta, oscurecimiento, falta de dureza en el agar, pérdidas de propiedades nutricionales y contaminación por dejar los frascos abierto por un tiempo prolongado; lo que puede alterar el pH, crear grumos, decoloración, etc.

4.2. Recomendaciones

- Se deben desarrollar protocolos de manejo sobre la forma de adición de melaza de caña idónea durante cada ciclo de cultivo (balance entre fertilización, activación de bacterias que mejoren la producción de camarones).
- Según (Yan, 2020), la fermentación no se recomienda si las condiciones de fermentación probiótica son incorrectas debido a que la melaza no se proporciona solo para el consumo de las bacterias benéficas, sino también a las bacterias dañinas (*Vibrios*), causando el desequilibrio en el número de probióticos, ya que, después de 24 horas de fermentación, el número de *Vibrio* puede alcanzar más de 10^4 UFC/mL.
- La Organización Internacional de Normalización (2013) recomienda que todos los productos destinados al consumo humano y alimentación requieren un recuento inferior a 10^2 UFC/g o 10^2 UFC/mL en caso de muestras líquidas o inferior a 10^3 UFC/mL para muestras sólidas.
- Es recomendable el desarrollo de protocolos de análisis con normativas microbiológicas basados en los métodos rápidos para mejorar la efectividad de evaluación de la melaza de caña destinadas como insumos acuícolas, como método de verificación de calidad e inocuidad.
- La falta de información sobre los riesgos de ingresar insumos comerciales acuícolas (melaza) destinados para la fertilización o preparación de probióticos, donde no se considera el índice de variabilidad que esta puede generar sobre el crecimiento bacteriano en las piscinas, plantea la importancia de evaluar y verificar su contenido sin alterar la homeostasis microbiana del cultivo evitando errores productivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, T. J., & Sasmal, D. (2009). Influence of salinity and management practices on the shrimp (*Penaeus monodon*) production and bacterial counts of modified extensive brackish water ponds. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 91-98.
- Alvarado, P. (2020). Producción de Larvas de Camarón cae en Ecuador. *AquaFeed*. Obtenido de Producción de Larvas de Camarón cae en Ecuador: <https://aquafeed.co/entrada/produccion-de-larvas-de-camaron-cae-en-ecuador-23751#:~:text=Las%20camaroneras%20pasaron%20de%20adquirir,cr%C3%ADan%20las%20larvas%20del%20crust%C3%A1ceo.>
- Álvarez, M. A. (2017). Proyecto para la industrialización y comercialización de melaza en la empresa FREIMIEL S.A. *Universidad tecnológica INDOAMÉRICA*, 30. Ambato, Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.uti.edu.ec/bitstream/123456789/760/1/TESIS%20MYRIAM%20CARDENAS.pdf>
- Aquacultura. (2015). Control de vibrio en las maduraciones y laboratorios de camarón. *REVISTA AQUACULTURA* , 108, 46-47. Obtenido de https://issuu.com/revista-cna/docs/aqua_cultura__108
- Bernabé, L. (2016). Sector Camaronero: Evolución y proyección a corto plazo. *FCSHOPINA*, 87, 100-107. Obtenido de <http://www.revistas.espol.edu.ec/index.php/fenopina/article/view/100/107>
- Cai, J., Choi, H., & J.G., J. (2021). Relationship between sucrose concentration and bacteria proportion in a multispecies biofilm. *National Library Medicine*, 13(1910443). doi:10.1080/20002297.2021.1910443
- Camara Nacional de Acuicultura (CNA), e. (2022). Estadísticas. *Cámara Nacional de Acuicultura*. Obtenido de <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Chephamsinhhocbio. (2021). Instrucciones sobre cómo utilizar la melaza en la cría de camarones. *Chephamsinhhocbio*. Obtenido de <https://chephamsinhhocbio.com/tin-tuc/huong-dan-cach-dung-mat-ri-duong-trong-nuoi-tom-105.html>
- Claudio Rodríguez Martínez, R. Z. (2018). Manual de medios de cultivo 2018. *BioCen (Centro Nacional de Biopreparados)*, 1, Cuarta edición. Mayabeque, Cuba.

- Obtenido de <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Compact Dry. (2022). Placas compact dry. *Compact Dry Latinoamérica*. Obtenido de Compact Dry: <https://compact-dry.com/>
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis. *The Center for Food Security & Public Health, 03, 06*. Obtenido de <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- Durán, A. I. (2022). Camaroneras registradas y aprobadas en Ecuador. *Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, 1, 1-86*. Obtenido de Camaroneras registradas y aprobadas en Ecuador: <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2022/07/CAMARONERAS-GR-14072022-2.pdf>
- Esperanza, J. (2022). Valor del dinero en el tiempo. *Universidad Quintana Roo, 1-10*. Obtenido de Valor del dinero en el tiempo: <http://web.uqroo.mx/archivos/jlesparza/acpef140/1.4%20VDT.pdf>
- Fajardo, S. S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pontificia Universidad Javeriana, 35*. Bogotá, Colombia. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8279>
- Figueredo A., A., Fuentes J., J., Cabrera T., T., León J., J., Patty J., J., & Silva J., J. R. (2022). Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión. *Aquatechnica, 2, 1, 4-5*. doi:<https://doi.org/10.33936/at.v2i1.2409>
- Fuentes, G. G. (2014). Utilización de melaza como fertilizante orgánico de estanques camaroneros durante la fase de engorde del camarón marino (*Litopenaeus vannamei*). *Universidad del Salvador, 45*. SAN SALVADOR, El Salvador. Obtenido de <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5917/>
- Gayuh, W. (2020). Uso de melaza en estanques de camarones. *Jala Tech, 4, 1, 365-374*. Obtenido de https://app.jala.tech/kabar_udang/penggunaan-molase-di-tambak-udang?redirect=https%3A%2F%2Fapp.jala.tech%2Fkabar_udang%3Fcategory%3Dbudidaya%26page%3D3
- Guo, H. D. (2022). Sucrose addition directionally enhances bacterial community convergence and network stability of the shrimp culture system. *npj Biofilms Microbiomes, 22*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41522-022-00288-x>

- Hernández et al. (2019). Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la producción acuícola. *Universidad CES*, 14, 1. doi:<https://doi.org/10.21615/cesmvz.14.1.6>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (1990). Alimentos zootécnicos compuestos para camarones. Requisitos. *Producción.gob.ec*, 1-8. Obtenido de https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/nte_inen_1767-ALIMENTOS-ZOOTECNICOS-COMPUESTOS-PARA-CAMARONES.REQUISITOS.pdf
- Láñez, E. (2005). Ciclo celular y crecimiento: Métodos indirectos. *Universidad de Granada*. Obtenido de Ciclo celular y crecimiento: Métodos indirectos: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>
- MicroPlanet. (2019). Placas miniaturizadas para el cultivo microbiológico. *MicroPlanet*. Obtenido de Placas miniaturizadas para el cultivo microbiológico: <https://www.microplanet-psl.com/es/noticias/item/86-compact-dry%C2%AE,-placas-miniaturizadas-para-el-cultivo-microbiol%C3%B3gico>
- Mizzi, L., Maniscalco, D., Gaspari, S., Chatzitzika, C., Gatt, R., & ValdramidisVP. (2020). Assessing the individual microbial inhibitory capacity of different sugars against pathogens commonly found in food systems. *The Society for Applied Microbiology*, 1, 1-8. doi:10.1111/lam.13306
- Morales, J. A., & Guzmán, M. E. (2021). Propuesta de un sistema de gestión de costos para la camaronera perteneciente a la empresa ROOSTER S.A. *Universidad del Azuay*. Cuenca, Ecuador. Obtenido de <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/10824/1/16366.pdf>
- Moss M., S., Moss R., D., Arce M., S., Lightner V., D., & Lotz M., J. (2012). The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. *EISEVIER*, 110, 247-250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>
- Organización Internacional de Estandarización (ISO). (2013). ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. *ISO*, 1, 9. Obtenido de <https://www.iso.org/standard/53728.html#:~:text=ISO%204833%2D1%3A2013%20specifies,incubation%20at%2030%20%C2%B0C>.
- Ortega Mendoza, J. L. (2020). Evaluación de compuestos nitrogenados totales en agua residual mediante enzimas y bacterias nitrificantes comerciales en la camaronera

- GRANCOMAR S.A. *Universidad Agraria del Ecuador*. Obtenido de Evaluación de compuestos nitrogenados totales en agua residual mediante enzimas y bacterias nitrificantes comerciales en la camaronera GRANCOMAR S.A: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ORTEGA%20MENDOZA%20JORGE%20LUI%20S.pdf>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Scielo*, 8, 1, 93-105. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&tlng=es
- Popov et al. (2020). Overview of Metabiotics and Probiotic Cultures During Fermentation of Molasses. *Sys Rev Pharm*, 11, 9, 813-817. doi:doi:10.31838/srp.2020.9.115
- Rajasekar et al. (2018). Synergetic effect of probiotic, molasses and immunostimulant supplementation on the production of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *ResearchGate*, 49, 5, 820-828. Indian. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/344136122_Synergetic_effect_of_probiotic_molasses_and_immunostimulant_supplementation_on_the_production_of_white_leg_shrimp_Litopenaeus_vannamei_Boone_1931
- Rodríguez, N., & Sandoval, M. (2010). Caracterización de bacterias marinas presentes en suelos de piscinas camaroneras en tiempo de post-cosechas y pre-siembra, luego de la preparación de suelos mediante el metodo de aplicación de fuentes de nitrogeno. *Dspace Espol*. Guayaquil, Ecuador. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10205/1/Caracterizaci%C3%B3n%20de%20Bacterias%20Marinas%20presentes%20en%20suelos%20de%20piscinas%20camaroneras.pdf>
- Rovira, M. A. (2019). Medios de cultivo-Microbiología para humanos. *Wordpress*. Obtenido de <https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/medios-de-cultivo/>
- Shang, Y. (1992). Penaeid Markets and Economics. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 23, 589-604. doi:10.1016/B978-0-444-88606-4.50033-3
- Tacon, P. P. (2022). Levaduras en Acuicultura. *International Aquafeed*. Obtenido de Levaduras en Acuicultura: <https://aquafeed.co/entrada/levaduras-en-acuicultura-20446/>
- Tom. (2018). *Melaza en acuicultura*. Obtenido de Tom: <http://123tom.net/mat-duong-trong-nuoi-trong-thuy-san->

