



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad De Ingeniería Marítima Y Ciencias Del Mar

**Análisis *in vitro* del efecto de insumos acuícolas sobre la
abundancia de *Vibrio parahaemolyticus* durante la
preparación de piscinas.**

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

INGENIERO(A) ACUICULTOR

Presentado por:

Ivonne Michelle Castro Castro

Luis Alberto Lagos Moreno

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering and Sea Science

***In vitro* analysis of the effect of aquaculture supplies on the abundance of *Vibrio parahaemolyticus* during the preparation of pools.**

CAPSTONE COURSE

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

Aquaculture Engineer

By:

Ivonne Michelle Castro Castro

Luis Alberto Lagos Moreno

GUAYAQUIL - ECUADOR

2022

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a Dios que es el autor de la vida y quien ha permitido que hoy consiga vivir este momento; a mis padres, Lucas y Ana, por siempre alentarme a terminar lo que se ha empezado. De manera muy especial quiero dedicarlo a mi mami, a ella que ha sido y es la inspiración, las ganas y el motor que me da fuerza para no rendirme. Sé que desde el cielo estás orgullosa de mí.

A mi abuelita “mami toyita” porque su sonrisa y sus oraciones son las que hoy me tienen de pie.

A Juan Diego, mi novio y futuro esposo por quedarse conmigo en los momentos más complicados y tristes de mi vida. Por siempre hacerme ver el mejor lado de las cosas y hacerme barra cuando he creído que todo me ha salido mal.

DEDICATORIA

Dedicada a la memoria de mi hermano Rafael, al esfuerzo de mis padres y mis hermanos.

Al amor de mi vida Melissa, que siempre me apoyó y me ayudó en los momentos más difíciles que pasé.

Y a mi perseverancia que pese al tiempo siempre se mantuvo intacta.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros más sinceros agradecimientos a los diferentes departamentos de investigación y a sus integrantes los cuales nos permitieron utilizar sus instalaciones para la realizar este proyecto.

A nuestra tutora la Dra. Francisca Burgos, por sacar nuestra mejor versión, por aconsejarnos, enseñarnos y corregirnos.

Al Msc. Alex Arias y al Ing. Jesús Zambrano por su paciencia y colaboración en esta investigación.

DECLARACION EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; **IVONNE MICHELLE CASTRO CASTRO** y **LUIS ALBERTO LAGOS MORENO** damos nuestro consentimiento para que la ESPOL 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"

I. michelle CASTRO

Ivonne Michelle Castro Castro

Luis Lagos

Luis Alberto Lagos Moreno

EVALUADORES



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



Firmado electrónicamente por:
**FRANCISCA
ARACELLY BURGOS
VALVERDE**

Wilfrido Argüello, Ph.D.

PROFESOR DE LA MATERIA

Francisca Burgos, Ph.D.

TUTORA

RESUMEN

Estudios preliminares han reportado que ciertos elementos químicos disponibles en el agua permiten la proliferación de patógenos capaces de aprovechar estos iones de manera más eficaz que las bacterias benéficas dentro del sistema de cultivo. El objetivo del presente estudio fue el evaluar preliminarmente la respuesta en la abundancia microbiana del *Vibrio parahaemolyticus* frente a un grupo de insumos acuícolas utilizados en la preparación inicial de piscinas de engorde de camarón blanco *Penaeus vannamei*. El estudio *in vitro* se realizó en microplaca cuyo diseño contempló la evaluación de 14 soluciones con 3 réplicas cada una frente a una concentración de *V. parahaemolyticus* (10^{-3} UFC/ml). La placa fue incubada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación de 150 rpm durante 6 horas, cada hora se midió el crecimiento microbiano mediante lector de Elisa a 560 nm. Se usó la prueba t-student para identificar diferencias a lo largo del tiempo entre abundancias y para determinar el efecto del tiempo, principios químicos y tipo de compuesto se utilizó análisis multivariado. Los resultados muestran que el *Vp* responde más ante sustancias que contienen altos valores de Carbono, Nitrógeno, Calcio, Fósforo, Magnesio y Hierro para poder proliferar rápidamente. Sólo 7 de los 14 insumos evaluados mostraron tener un efecto proliferativo significativo ($p < 0.05$). Los compuestos que mostraron estimulación en el crecimiento celular fueron Carbonato de calcio, Silicato, Nitrato de Sodio, Melaza & Silicato, Melaza y Propóleo (1%). Dentro de los compuestos orgánicos probados, la Moringa (10%) mostró una reducción significativa del número celular de *Vp*.

Palabras claves: Crecimiento bacteriano, Insumos acuícolas, *Penaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*.

ABSTRACT

Preliminary studies have reported that the presence of certain chemical elements available in the water allow the proliferation of pathogens capable of taking advantage of these ions more efficiently than beneficial bacteria within the culture system. The objective of the present study was to preliminarily evaluate the response in the microbial abundance of *Vibrio parahaemolyticus* against a group of aquaculture inputs used in the initial preparation of white shrimp *Penaeus vannamei* fattening pools. The in vitro study was carried out in a microplate whose design contemplated the evaluation of 14 solutions with 3 replicates each one against a concentration of *V. parahaemolyticus* (10^3 CFU/ml). The plate was incubated at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking at 150 rpm for 6 hours, microbial growth was measured every hour using an Elisa reader at 560 nm. The t-student test was used to identify differences over time between abundances and multivariate analysis was used to determine the effect of time, chemical principles, and type of compound. The results show that the Vp responds more to substances that contain high values of Carbon, Nitrogen, Calcium, Phosphorus, Magnesium, and Iron to be able to proliferate rapidly. Only 7 of the 14 inputs evaluated showed a significant proliferative effect ($p < 0.05$). The compounds that showed an effect of stimulating cell growth were Calcium Carbonate, Silicate, Sodium Nitrate, Molasses & Silicate, Molasses and Propolis (1%). Among the organic compounds tested, Moringa (10%) showed a significant reduction in the cell number of Vp.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Penaeus vannamei*, Aquaculture inputs, bacterial growth

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DECLARACION EXPRESA	VI
EVALUADORES	VII
RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción	9
1.1. Descripción del problema	9
1.2. Justificación del problema	10
1.3. Objetivos.....	11
1.3.1. Objetivo general	11
1.3.2. Objetivos específicos	11
1.4. Marco teórico.....	11
1.4.1. Preparación de piscinas camaroneras	12
1.4.2. Limpieza y tratamiento	13
1.4.3. Llenado de la piscina camaronera.....	14
1.4.4. Fertilización de una piscina camaronera	14
1.4.5. Químicos usados en la preparación de piscinas de camarón: descripción, usos y concentraciones.....	15
1.4.6. Bacterias patógenas en acuicultura	17
1.4.7. Género Vibrio	17
1.4.8. Vibrio parahaemolyticus	18
1.4.9. Principios de aplicación para las sustancias químicas usadas en acuicultura	19
CAPÍTULO 2	20
2. METODOLOGÍA.....	20
2.1. Tipo de estudio	20
2.2. Preparación de soluciones de insumos acuícolas	20
2.3. Análisis del agua de la piscina.....	23

2.4.	Control de esterilidad: muestras y medios de cultivo.....	23
2.5.	Diseño de la placa microelisa	24
2.6.	Evaluación de la respuesta bacteriana mediante espectrofotometría.	25
2.7.	Corrección de lectura óptica.	25
2.8.	Análisis de datos.	25
CAPÍTULO 3		26
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	26
3.1.	Resultados de calidad de agua	26
3.2.	Control microbiológico de las soluciones a ensayar	27
3.3.	Respuesta in vitro de la abundancia del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> frente a las dosis empleadas de insumos acuícolas para preparación inicial de piscinas de engorde	27
3.4.	Evaluación en el tiempo de la influencia de los insumos acuícolas probados ..	29
3.5.	Evaluación del efecto del tiempo, principio activo y naturaleza del compuesto en la abundancia reportada.....	33
3.6.	Análisis de costos.....	34
CAPÍTULO 4		36
4.	Conclusiones y recomendaciones	36
4.1.	Discusión de resultados	36
4.2.	Conclusiones.....	39
4.3.	Recomendaciones.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....		41
ANEXOS		44

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
Vp	Vibrio parahaemolyticus
TSA	Trypto-Casein Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose
AHPND	Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease
EMS	Early Mortality Syndrome

SIMBOLOGÍA

ppm	Partes por millón
ppt	Partes por mil
mg/L	Miligramos sobre litro
pH	Potencial de hidrógeno
μl	Microlitros
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro
ml	Mililitros
kg	Kilogramo
ha	Hectárea

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema que describe los pasos a seguir para la preparación de piscinas de camarón.....	12
Figura 1.2. Pasos para una limpieza efectiva de la piscina descritos por empresas privadas.....	13
Figura 1.3. Recomendaciones para el correcto llenado de una piscina.....	14
Figura 1.4. Consideraciones previas antes de realizar una fertilización en piscinas de camarón.....	14
Figura 2.1 Diseño preliminar de la distribución de sustancias a ensayar.....	24
Figura 2.2. Designación de colores y concentraciones para las soluciones a ensayar.....	25
Figura 3.1. Sustancias que presentaron diferencias significativas en la abundancia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	30
Figura 3.2. Sustancias que no presentaron diferencias significativas en la abundancia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	31
Figura 3.3. Sustancias que presentaron diferencias significativas durante las primeras horas del ensayo.....	32
Figura 3.4. Sustancias que presentaron descensos no significativos en relación con la abundancia de <i>Vibrio parahemolyticus</i>	32
Figura 3.5. Sustancias con una dinámica no significativa de la abundancia de <i>Vibrio parahemolyticus</i>	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Descripción y dosis de químicos inorgánicos usados en la preparación de piscinas de camarón en Ecuador.....	15
Tabla 1.2. Descripción y dosis de químicos orgánicos usados en mantenimiento y preparación de piscinas de camarón.....	16
Tabla 1.3. Especies de vibrios patógenos que provocan mortalidades masivas en acuicultura.....	18
Tabla 1.4. Límites de las variables relacionadas al crecimiento de <i>V. parahaemolyticus</i>	19
Tabla 1.5. Principios de aplicación de los compuestos químicos utilizados en la fase inicial de siembra de camarón.....	19
Tabla 2.1. Sustancias ensayadas durante el experimento con descripción del fabricante.....	21
Tabla 3.1. Resultados del análisis de calidad de agua de la muestra de agua de cultivo utilizada.....	26
Tabla 3.2. Resultados del conteo de colonias bacterianas de las soluciones a ensayar.....	27
Tabla 3.3. Tasa de crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en diferentes insumos acuícolas ensayados.....	28
Tabla 3.4. Lecturas de abundancia en el tiempo de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> frente a las sustancias inorgánicas y mezcla de soluciones ensayadas.....	29
Tabla 3.5. Lecturas de abundancia en el tiempo de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> frente a las soluciones orgánicas ensayadas.....	29
Tabla Error! No text of specified style in document.3.6. Costo unitario y total de los insumos utilizados.....	34
Tabla 3.7. Costos unitarios y total de los reactivos utilizados.....	35
Tabla 3.8. Costos unitarios y total de los equipos utilizados.....	35

CAPÍTULO 1

1. Introducción

En los últimos años la demanda de camarón ecuatoriano en mercados internacionales se ha incrementado de manera considerable y sostenida, esto ha llevado a que los productores implementen acciones agresivas para poder cubrir la demanda que incluye la intensificación de su producción, por ende, se requiere del aumento de las densidades de cultivo y de periodos menores para la preparación de piscinas. Estas preparaciones, simultáneamente requieren de la aplicación de insumos químicos durante la etapa de engorde para sostener la producción que muchas veces obedecen a dosificaciones iniciales y periódicas a lo largo del año sin considerar interacciones o correlaciones con residuales orgánicos químicos o biológicos presentes. Dentro de los objetivos que persigue la preparación inicial de las piscinas, incluye adicionar compuestos que existen y se comercializan en el mercado nacional que promuevan la proliferación de fitoplancton y la reducción o eliminación de patógenos. La presencia de patógenos como parte de la composición microbiana del ecosistema donde vive el animal de cultivo se encuentra en concentraciones entre 10^{-1} o 10^{-2} UFC/ml, sin embargo, no se confirma si estos son reducidos o eliminados de la piscina con el pretratamiento inicial.

1.1. Descripción del problema

El tratamiento inicial de las piscinas camaroneras hoy en día hace uso de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos que, aplicados a los suelos y cuerpos de agua previo a la siembra, permiten proliferar el alimento primario incluyendo algas benéficas y la reducción de patógenos asociados con mortalidades en el cultivo de camarón. Sin embargo, muchas de estas sustancias a pesar de ser usadas en la preparación inicial de la piscina, no son del todo aprobadas para uso en acuicultura y su dosificación se realiza siguiendo las indicaciones de las casas comerciales sin considerar estacionalidad ni la presencia de residuales orgánicos, inorgánicos y biológicos que pudieran estar presentes previo a la adición de estos productos.

En el Ecuador no existe información acerca de cómo las bacterias patógenas responden a las nuevas dosis de compuestos químicos adicionados para la preparación inicial de la piscina. La manera en la que aprovechan los elementos químicos presentes para incrementar su concentración bacteriana es un tema que aún se encuentra en estudio

en muchos otros países donde se realiza piscicultura debido a que la evidencia sobre este fenómeno cada día se va incrementando.

Investigaciones realizadas en cultivo de peces han demostrado los efectos que tienen diferentes insumos acuícolas sobre la proliferación de bacterias identificadas como patógenas, desembocando así, en el crecimiento acelerado de estos microorganismos y convirtiéndolos en el grupo dominante dentro del sistema (Wenlong, De La Fuente, & Arias, 2019). Estos sucesos han motivado a realizar monitoreos y evaluaciones constantes como herramienta de control de patógenos. En cultivo de camarón, estos insumos son utilizados antes, durante y después como medida profiláctica, lo cual hace de este un tema preocupante para el sector.

1.2. Justificación del problema

El siguiente proyecto busca mediante pruebas *in vitro* en laboratorio, examinar los efectos que tiene la adición de un grupo de insumos acuícolas usados en la preparación inicial de piscinas, sobre el crecimiento celular de una de las especies bacterianas comúnmente presente en los cultivos de camarón y que está asociada a eventos de mortalidades y problemas de crecimiento durante los ciclos de engorde. De esta manera obtendremos información de la influencia que tienen los insumos químicos acuícolas sobre el agente patógeno seleccionado, para contribuir con el desarrollo de medidas de control que mitiguen o prevengan futuros brotes que afecten la productividad.

Existe evidencia de que tanto bacterias benéficas como patógenas, emplean vías metabólicas específicas para degradar prebióticos y competir o intercambiar recursos (Böger, 2020). Actualmente, existe preocupación en la industria piscícola ya que la presencia de ciertos iones, como el Ca^{2+} o el Mg^{+2} , son utilizados por las bacterias patógenas para proliferar a través de la captación de hierro una vez que se disuelven en agua.

En Alabama, Estados Unidos; se ha reportado que en estanques de Bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) donde existe un uso rutinario de sales de NaCl, son más propensos a experimentar un brote de *Aeromonas hydrophila* (Behak, Wagner, Burnes, & Hanson, 2015). También se reporta que la abundancia de *A. hydrophila* en los estanques de peces puede estar influenciada por los niveles de fosfato en el sistema. (Li, Zhu.Y.J, E., & Yang, 2017).

Evaluar estos efectos permitirá, en el futuro, desarrollar investigaciones enfocadas a conocer las diferentes respuestas que tienen otras bacterias frente a los elementos

presentes en los demás productos químicos usados en camaronicultura, con el fin de obtener un control sobre la proliferación de bacterias patógenas. Esto se traduce en una oportunidad para mejorar los márgenes de producción y protocolizar el uso de químicos sin que se merme o supere la producción nacional alcanzada, sino aportando a una producción más sostenible y amigable con el ecosistema.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar *in vitro* la respuesta de crecimiento bacteriano del *Vibrio parahaemolyticus* frente a insumos acuícolas comúnmente utilizados en la preparación inicial de piscinas de engorde de camarón *Litopenaeus (Penaeus) Vannamei*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Explorar la respuesta del *V. parahaemolyticus* frente a las dosis utilizadas de los insumos acuícolas comúnmente aplicados en la preparación inicial de las piscinas de engorde de camarón para determinar si ejercen una influencia en la proliferación bacteriana inicial en el agua de las piscinas camaroneras.
- Cuantificar espectrofotométricamente la influencia de los compuestos utilizados en la abundancia de *V. parahaemolyticus* para determinar el comportamiento frente a estas sustancias.

1.4. Marco teórico

En Ecuador el *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* es la especie de camarón más cultivada, su producción eficiente incluye mantener un ambiente de alta calidad para su óptimo desarrollo. La preparación de piscinas camaroneras es un punto vital para obtener una producción exitosa, por ende, las condiciones del agua de cultivo y del suelo de la piscina son determinantes a la hora de cultivar esta especie. Un ambiente con mala calidad puede causar un desarrollo lento, pérdida de apetito, hacer al camarón más susceptible a las enfermedades y, por último, provocar mortalidades.

Existen manuales que proveen empresas privadas o instituciones de investigación donde se indican paso a paso la correcta preparación del estanque previo al cultivo, utilizando compuestos químicos que permiten reestablecer las condiciones óptimas del suelo y el agua para una nueva siembra.

1.4.1. Preparación de piscinas camaroneras

La preparación de una piscina de cultivo incluye darle al animal un ambiente óptimo donde exista una buena calidad de agua y de suelo. Una piscina mal preparada o con una mala calidad de agua y suelo, no permite que el camarón se desarrolle con normalidad, provocando mortalidades tempranas, deterioro de la calidad del producto y perdiendo la mayor parte de la producción (Márquez, 2017).

De esta manera, las prácticas de manejo que los productores prefieren seguir para preparar piscinas de cultivo de camarón se basan en los lineamientos establecidos por entidades privadas o públicas.

La FAO (Food and Agriculture Organization) recomienda seguir el esquema en **Figura 1.1** para la preparación de pre-criaderos y estanques de engorde de *Litopenaeus* (*Penaeus*) *vannamei*.

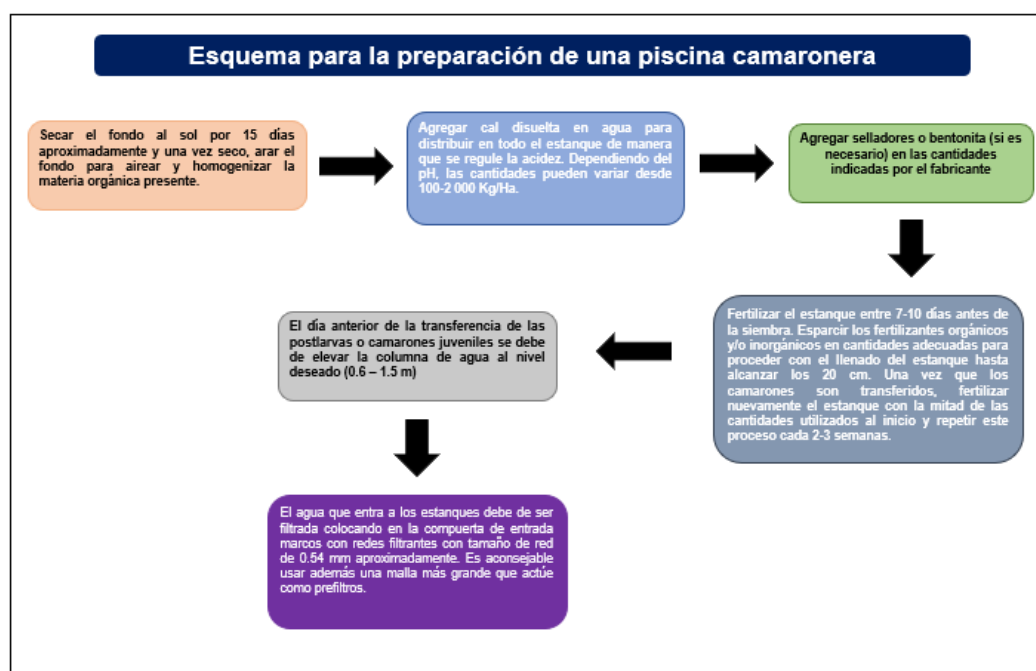


Figura 1.3. Esquema que describe los pasos a seguir para la preparación de piscinas de camarón. (FAO, 2021)

El uso de insumos químicos se ha vuelto una práctica común de los productores, para mantener los parámetros adecuados de cultivo y llevar un proceso controlado en su producción. Algunas de las funciones de estos insumos incluyen adicionar nutrientes, fertilizar el suelo, regular los niveles de pH, eliminar materia orgánica y reducir las bacterias patógenas del sistema (Intriago, 2021)

Sin embargo, no todos los insumos acuícolas tienen permiso de uso libre para los productores. El uso de antibióticos en Ecuador como medida de eliminación de patógenos en acuicultura está controlado por el Ministerio de Acuicultura y Pesca (MAP). Desde 2018, el MAP prohíbe el uso de *enrofloxacin* como antibiótico para cualquier fase de cultivo en las actividades acuícolas que se desarrollen en territorio ecuatoriano (Ministerio de Acuicultura y Pesca, 2018).

Los procedimientos han mejorado y muchas empresas usan una serie de pasos adicionales (**Figura 1.2 y Figura 1.3**) en la preparación de piscinas que contribuyen a una mejor asepsia de los estanques de cultivo.

1.4.2. Limpieza y tratamiento

La limpieza y tratamiento de las piscinas comúnmente se rigen a prácticas y actividades descritas en la FAO y otros organismos que se encargan de apoyar al sector productivo. Usualmente esto se hace siguiendo protocolos de manejo como en **Figura 1.2** donde se describen en amplio rango los pasos que se requieren para cumplir con este fin (FAO, 2021). Sin embargo, estos protocolos no incluyen análisis previos de los remanentes de suelo y agua antes del nuevo llenado de la piscina y de la adición de insumos acuícolas. Existen muchos productos disponibles en el mercado ecuatoriano que se adicionan a las piscinas antes de la transferencia de los animales como booster para fitoplancton y sustancias que permiten la reducción de la carga bacteriana patógena.

1. Drenar la piscina.
2. Limpiar compuertas y tablas de ingreso y salida de agua para eliminar algas muertas y crustáceos. Es recomendable renovar constantemente las tablas.
3. Drenar todas las pozas y colocar cloro para eliminar predadores como peces.
4. Al segundo día de secado, muestrear suelo para determinar el pH y porcentaje de materia orgánica.
5. Añadir 200-250 Kg de hidróxido de calcio por hectárea en los préstamos para eliminar la acumulación de materia orgánica. También se puede usar urea (50 Kg/ha).
6. Añadir carbonato de calcio para corregir el pH. Si la acidez se encuentra entre 6.5-7, se debe de agregar 200-500 Kg/Ha., Por otro lado, si la acidez se encuentra entre 5-6.5, se debe de agregar de 1500-2000 Kg/Ha.

Figura 1.4. Pasos para una limpieza efectiva de la piscina descritos por empresas privadas. (Skretting, 2018)

1.4.3. Llenado de la piscina camaronera

Realizar un correcto llenado de la piscina se rige de guías realizadas y descritas (**Figura 1.3**) por organismos públicos y privados que promueven el desarrollo de la actividad acuícola. En este caso, ninguna guía provee información acerca de cómo llevar a cabo un análisis preliminar al agua de cultivo, con el fin de conocer la calidad inicial del agua.

1. **Compuerta de entrada:** Si se tiene mucha vegetación en el reservorio, e deben usar medias lunas con mallas anchovetera para mejorar el ingreso del agua y evitar taponamientos por la vegetación.
2. **Comenzar a llenar el estanque 10 días antes de la siembra. El ingreso de agua debe ser continuo de al menos 30 cm.**

Figura 1.3. Recomendaciones para el correcto llenado de una piscina (Skretting, 2018).

1.4.4. Fertilización de una piscina camaronera

La fertilización es un paso importante en la preparación de las piscinas de camarón ya que permite mantener una cantidad adecuada de microalgas que sirvan como alimento inicial para las postlarvas. En la **Figura 1.4** se detallan las consideraciones a tomar antes de realizar una fertilización.

1. Si la salinidad es mayor a 20 ppt se requiere mayor nitrógeno; por otro lado, con salinidad menor a 15 ppt, los requerimientos son mayores en fosfatos. Las fuentes de nitrógeno son: urea, nitrato de amonio y nitrato de sodio. Las fuentes de fósforo son: fosfato di amónico más conocido como DAP y el super triple fosfato.
2. Añadir estos químicos al menos 3 veces antes de sembrar, mayormente en las compuertas de entrada.
3. Fertilizar por las mañanas, aprovechando los rayos del sol. Si está nublado, NO fertilizar

Figura 1.4. Consideraciones previas antes de realizar una fertilización en piscinas de camarón (Skretting, 2018).

1.4.5. Químicos usados en la preparación de piscinas de camarón: descripción, usos y concentraciones.

1.4.1.1. Químicos inorgánicos

Los compuestos inorgánicos presentados en la **Tabla 1.1** corresponden a los químicos más comunes utilizados para la destrucción de organismos nocivos, fertilizantes y potenciadores de la producción primaria destinados a mejorar la calidad del agua en el estanque durante la preparación de piscinas.

Tabla 1.6. Descripción y dosis de químicos inorgánicos usados en la preparación de piscinas de camarón en Ecuador. (Castor & Lagos, 2021).

Nombre tradicional	Nombre común	Nombre IUPAC	Nombre químico	Dosis efectiva	¿Qué hace?	Referencia bibliográfica
Cal clorada	Hipoclorito de calcio 70%	bis [oxoclorato(I)] de calcio	(Ca(ClO) ₂)	21 gramos/100 mL	Oxida materia orgánica, bacterias, algas, moho, hongos microorganismos. Agente blanqueador. Contiene mayor cloro que el hipoclorito de sodio	https://www.amoquimicos.com/usos-y-precauciones-hipoclorito-de-calcio
Ácido silícico	Silicio	Ácido tetraoxosilícico (IV)	H ₄ SiO ₄	100Kg/ha	Participa en procesos metabólicos de zooplancton. Es el elemento estructural de las diatomeas.	https://www.e-agrizon.com/producto/silicam-plus-25-kg/
Cal agrícola, piedra caliza pulverizada	Carbonato de calcio	Trioxocarbonato (IV) de calcio	CaCo ₃	100 Kg/Ha	Actúa en la regulación de la acidez del suelo que ha sufrido nitrificación por los balanceados del camarón y nutrientes de agua. Mantiene la dureza y alcalinidad adecuada del agua y suelo y también mantiene el fitoplancton y zooplancton.	file:///C:/Users/Usuario/Desktop/TESIS%20BIBLIOGRAFIA/Preparaci%C3%B3n%20de%20piscinas%20segun%20organizaciones/SKRETTING%20Guia_manejo_camaro_neras.pdf
Nutrilake	Nitrato de sodio y Silicato de sodio. Nitrógeno total: 15%; Sodio: 25%; Silicato: 3.5%	Trioxonitrato (V) de sodio Trioxoborato (III) de hidrógeno	NaNO ₃ NaSiO ₃	25 Kg/Ha	Se aplica antes de la siembra (4 días antes) y después de la cosecha para reducir la materia orgánica.	https://sqmnutrition.com/products/nutrilake-std-8/
Silicam Plus	Componentes: Silicio (SiO) 79.8%; Multiminerales: Calcio (CaO) 1.57%; // Magnesio (MgO):0.50%; // Potasio (K ₂ O) 0.57%; Fósforo (P ₂ O ₅): .22% // Otros: 17.96%	Dióxido de Silicio	SiO ₂	100Kg/ha	Enriquecedor orgánico a base de dióxido de silicio que aporta minerales y oligoelementos al suelo. Incrementa el desarrollo sostenible de diatomeas en la columna de agua. Reduce la concentración de nitrógeno tóxico en el agua.	https://www.e-agrizon.com/producto/silicam-plus-25-kg/

1.4.1.2. Químicos Orgánicos

Los compuestos orgánicos de la **Tabla 1.2** son utilizados de forma regular en granjas camaroneras y piscícolas para promover la presencia de bacterias benéficas, reducir materia orgánica y aumentar la respuesta inmunológica de los organismos cultivados.

Tabla 1.38. Descripción y dosis de químicos orgánicos usados en mantenimiento y preparación de piscinas de camarón (Castro & Lagos, 2021).

Nombre Comercial	Nombre común	Nombre IUPAC	Composición química	Dosis efectiva	¿Qué hace?	Referencia bibliográfica
Melaza	Miel de caña	Melaza de caña 100%	Humedad ≤26.5%; cenizas sulfatadas ≤ 16%; azúcares totales como reductores ≥46%; Grado BRIX a 20°C ≥78; Colorantes artificiales:negativo; Melaza de caña 100%	30 Kg /Ha	Mantiene en equilibrio a bacterias no patógenas ya que por ejemplo el V. parahemolyticus no puede utilizar la sacarosa.	https://balnova.com/uso-de-melaza-en-estanques/
Melaza + Silicam Plus	Mezcla de melaza	No tiene	Las propiedades combinadas de la melaza y el silicam plus	100kg/ha + 30kg/ ha	Ayuda a reducir la materia orgánica y potencia la aparición de diatomeas.	Godproex,2021
Biobac A	Bioactivador orgánico	No tiene	fracción orgánica: 19%. Fracción inorgánica: 6.7%. Nitrogeno 4%; Potasio(K2O): 1%. Boro: 0.14%. Cobalto: 0.40%. Niquel: 1.16%. Excipientes: 74.3%	0.75 L/Ha	Acelera la degradación de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas. Reduce amonio/amoniaco y nutritod. Equilibra el pH y el O2 disponible. Elimina SH2	https://www.biobacsa.com/biobac-a
Ácido húmico	Huminas	No tiene	Compuestos aromáticos procedentes de la descomposición y oxidación de la materia orgánica y compuestos nitrogenados, sintetizados por microorganismos presentes en el suelo.	1.5 L/Ha	Las sustancias húmicas contribuyen a la calidad físico-química del suelo, por ende, mejora la fertilidad del mismo e incrementa la flora microbiana. En suelos arcillosos ayudan a mejorar la estructura del suelo, logrando mayor permeabilidad.	https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/133023/D-76494.pdf
Propóleo	Própolis	No tiene	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres: 45-55%; Cera: 35%; Aceites esenciales y aromáticos: 10%; Ácidos grasos: 5%; Pólen:5%;Otros compuestos orgánicos: 5%. Minerales: Fe y Zn.	1 g/mL	Inmunoestimulante,aditivo alimentario y antimicrobiano. Se ha probado en peces y ha resultado en una mejor productividad utilizando la dosis adecuada.	file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Propolis%20n%20Aquaculture%20A%20Review%20of%20Its%20Potential.pdf
Moringa Oleifera	Moringa	No tiene	Flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, alcaloides, taninos, lectinas y terpenoides	1g/ml	Pruebas en peces han demostrado un mejor rendimiento de crecimiento, mejoras en la respuesta inmunitaria y resistencia a enfermedades y fortalecimiento de la capacidad antioxidante. Reemplazo de fuentes de proteína (FM-SBM)	file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Moringa.pdf

1.4.6. Bacterias patógenas en acuicultura

Cada año el sector acuícola crece con más rapidez superando exponencialmente a otras actividades relacionadas con el suministro de productos del mar (pesca de captura). La aparición o reemergencia de enfermedades acuícolas también crece de la misma forma, llegando a ser uno de los principales problemas para el desarrollo de la producción desde hace muchos años. La presencia de estas enfermedades contribuye a la pérdida de millones de dólares en la producción y de no controlarse se estima que afectaran la rentabilidad y la sostenibilidad de la industria a futuro (Meza, 2017).

Dentro de todos los factores que provocan mortalidades y pérdidas económicas por problemas productivos, las enfermedades bacterianas han sido señaladas como las que han provocado más problemas en el desarrollo de la actividad acuícola. Las bacterias del género **Vibrio** son actualmente los principales causantes de pérdidas millonarias dentro de la producción de camarón. Solo en 2020, EE. UU. y Asia perdieron alrededor de 4 mil y 8 mil millones de dólares por infecciones de camarón con AHPND (Caro, 2020).

1.4.7. Género Vibrio

Los **Vibrios** son microorganismos Gram negativos pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* las cuales se encuentran en los ecosistemas estuarinos y marinos de casi todos los rincones del mundo. Los vibrios son probablemente el grupo de bacterias más común presentes en los cultivos de camarón y los más estudiados por su versatilidad. Se encuentran en concentraciones de 10^{-2} UFC/ml en muestras de agua y entre 10^{-5} y 10^{-6} UFC/g en sedimento (Montiel, Suárez, & Medina, 2015). El género **Vibrio** consta de 130 especies confirmadas de las cuales 12 son capaces de infectar a humanos (Ceccarelli, 2019). Con los años, se han demostrado que existen 7 especies de vibrios patógenos que infectan a las especies de cultivo, estas especies se indican a continuación en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.39. Especies de vibrios patógenos que provocan mortalidades masivas en acuicultura. Fuente: (Biomin, 2021).

Especies	Enfermedad	Afecta
<i>V. harveyi</i>	Vibriosis Luminiscente	Larvas
<i>V. parahaemolyticus</i>	EMS/AHPND	Camarones de 40 días o menos
<i>V. vulnificus</i>	SHB	Adultos
<i>V. Fluvialis</i>	SHB	Adultos
<i>V. alginolyticus</i>	SHB	Adultos
<i>V. damsela</i>	SHB	Adultos
<i>V. mimicus</i>	SHB	Adultos
<i>V. cholera(non01)</i>	SHB	Adultos

Todas las especies de vibrios proliferan en ambientes con NaCl, el cual es un determinante ya que el agua dulce inactiva a estos microorganismos (Ceccarelli, 2019).

Una de las características principales de los vibrios es su luminosidad, este proceso bioquímico es producido cuando la enzima luciferasa promueve la oxidación de la proteína luciferina. Especies como el *Vibrio harveyi*, el cual es muy conocido por ser la principal y mayor causa de mortalidad de la especie *P. monodón*, son identificados gracias a esta característica (N. Chandrakala, 2017). Otras especies como el *Vibrio alginolyticus* poseen potencial probiótico para la producción de camarón.

1.4.8. Vibrio parahaemolyticus

El *V. parahaemolyticus* es un bacilo halófilico Gram negativo, pertenece a la familia Vibrionaceae, es oxidasa positivo, aerobio, y capaz de fermentar la glucosa. Su desarrollo (**Tabla 1.4**) se da en medios con concentración de al menos 1% de NaCl. (Ministerio de Agricultura, 2017).

Tabla 1.40. Límites de las variables relacionadas al crecimiento de *V. parahaemolyticus* (Ministerio de Agricultura, 2017).

Variable	Mínimo	Máximo	Óptimo
pH	4.8	11	7.8-8.6
Temperatura	5	43	37
Sal	1%	3.5%	2%

El *Vibrio parahaemolyticus* es conocido por provocar el *Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS)* que aumenta drásticamente la tasa de mortalidad en estadios tempranos de cultivos de camarón. Esta enfermedad es capaz de provocar pérdidas desde el 40% hasta el 100% en los primeros 35 días de cultivo (Alune, 2021).

También es capaz de provocar la *Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND)*, una enfermedad que, en su fase aguda, afecta al camarón degenerando los túbulos del hepatopáncreas y provocando mortalidades de hasta el 100% durante los 10 a 30 días de la etapa de engorde (OIRSA, 2021).

1.4.9. Principios de aplicación para las sustancias químicas usadas en acuicultura

Con la finalidad de precautelar infecciones bacterianas y promover un cultivo sano, los productores de camarón alrededor del mundo utilizan una amplia gama de agentes químicos y naturales que son añadido antes de la siembra, los cuales se presentan en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.41. Principios de aplicación de los compuestos químicos utilizados en la fase inicial de siembra de camarón (Massaut, Sonnenholzner, & Boyd, 2020).

Agente	Compuesto químico	Principio de aplicación
Bactericidas	Cal clorada y Carbonato de calcio	Desinfección y destrucción de organismos patógenos por aumento de pH.
Fertilizantes	Nitrato de sodio y Silicato	Participación en procesos metabólicos de zooplancton. El silicio es el elemento estructural de las diatomeas las cuales son muy importantes en un cultivo de camarón.
Orgánicos	Melaza, Ácido húmico, Propóleo y Moringa	Bactericidas, inmunoestimulantes y potenciadores en mejora de la calidad del agua sin causar daños al ambiente.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de salud animal (*Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar*), mediante un ensayo *in vitro* exploratorio para la respuesta bacteriana del ***Vibrio parahaemolyticus*** frente a soluciones de insumos acuícolas (4 insumos inorgánicos y 6 orgánicos) previamente preparados que se utilizan en la preparación inicial de piscinas de engorde de camarón

2.2. Preparación de soluciones de insumos acuícolas

Las soluciones de insumos acuícolas a ensayar se prepararon a un volumen final de 250 ml siguiendo las dosis efectivas por hectárea utilizados para una producción semi-intensiva comúnmente aplicados en varias camaroneras ubicadas en la Vía Durán-Tambo. Se empleó agua filtrada y esterilizada de piscina como medio de preparación de las soluciones. La **Tabla 2.1** describe las concentraciones y cantidades empleadas en el ensayo.

Tabla 2.1. Sustancias ensayadas durante el experimento con descripción del fabricante (Castro & Lagos, 2021).

Tipo de químico	Nombre común	Nomenclatura química	Dosis efectiva	Solución Microplaca	ppm	¿Qué hace?
Inorgánico	Cal clorada	(Ca (ClO) ₂)	21 gramos/100 mL	52.5 g/250 mL	210000	Oxida materia orgánica, bacterias, algas, moho, hongos microorganismos. Agente blanqueador. Contiene mayor cloro que el hipoclorito de sodio
Inorgánico	Silicato	H ₄ SiO ₄	100Kg/ha	0.0025 g/250mL	10	Participa en procesos metabólicos de zooplancton. Es el elemento estructural de las diatomeas.
Inorgánico	Carbonato de calcio	CaCO ₃	100 kg/Ha	0.0025g/250 mL	10	Actúa en la regulación de la acidez del suelo que ha sufrido nitrificación por los balanceados del camarón y nutrientes de agua. Mantiene la dureza y alcalinidad adecuada del agua y suelo y también mantiene el fitoplancton y zooplancton.
Inorgánico	Nitrato de sodio + Silicato de sodio	NaNO ₃ NaSiO ₃	25 kg/Ha	0.000625g/250 mL	2.5	Se aplica antes de la siembra (4 días antes) y después de la cosecha para reducir la materia orgánica.
Orgánico	Miel de caña	Cenizas sulfatadas ≤ 16%; azúcares totales como reductores ≥46%; Grado BRIX a 20°C ≥78; Melaza de caña 100%	30 kg /Ha	0.0075g/250 mL	30	Mantiene en equilibrio a bacterias no patógenas ya que por ejemplo el <i>V. parahaemolyticus</i> no puede utilizar la sacarosa.
Orgánico	Mezcla de melaza + silicato	Las propiedades combinadas de la melaza y el silicato	100kg/ha + 30kg/ ha	0.0025g de silicam+0.0075 g de melaza en 250 mL	10 ppm de silicato + 30 ppm de melaza	Ayuda a reducir la materia orgánica y potencia la aparición de diatomeas.

Orgánico	Bioactivador orgánico	Nitrógeno 4%; Potasio(K ₂ O): 1%. Boro: 0.14%. Cobalto: 0.40%. Níquel: 1.16%. Excipientes: 74.3%	0.75 L/Ha	0.00001875 g/250 mL	30	Acelera la degradación de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas. Reduce amonio/amoniaco y nitritos. Equilibra el pH y el O ₂ disponible. Elimina SH ₂
Orgánico	Ácido Húmico	Compuestos aromáticos procedentes de la descomposición y oxidación de la materia orgánica	1.5 L/Ha	0.0000375 g/250 mL	0.15	Las sustancias húmicas contribuyen a la calidad fisicoquímica del suelo, por ende, mejora la fertilidad de este e incrementa la flora microbiana. En suelos arcillosos ayudan a mejorar la estructura del suelo, logrando mayor permeabilidad.
Orgánico	Propóleo	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres: 45-55%; Cera: 35%; Aceites esenciales y aromáticos: 10%; Ácidos grasos: 5%; Pólen:5%; Otros compuestos orgánicos: 5%. Minerales: Fe y Zn.	1 g/mL	(25 g/250 mL) Propóleo 10%: 2.5 g/250 ml; Propóleo 5%: 1.25 g/250mL; Propóleo1%: 0.25g/250mL	100000	Inmunoestimulante, aditivo alimentario y antimicrobiano. Se ha probado en peces y ha resultado en una mejor productividad utilizando la dosis adecuada.
Orgánico	Moringa	Flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, alcaloides, taninos, lectinas y terpenoides	1g/ml	(25 g/250 mL) Moringa 10%: 25 g/250 ml; Propóleo 5%: 12.5 g/250mL; Propóleo1%: 2.5g/250mL	100000	Pruebas en peces han demostrado un mejor rendimiento de crecimiento, mejoras en la respuesta inmunitaria y resistencia a enfermedades y fortalecimiento de la capacidad antioxidante. Reemplazo de fuentes de proteína (FM-SBM)

Adicionalmente a los insumos acuícolas provistos, se evaluaron dos sustancias orgánicas propóleo (*Huahuala, 2021*) y moringa (*Kayode & Afolayan, 2015*), preparadas en concentraciones del 1%, 5% y 10% del producto en 100 mL de medio de cultivo para cada uno.

2.3. Análisis del agua de la piscina

Para la preparación de las soluciones se utilizó agua filtrada y esterilizada de una piscina de camarón. Esta fue recolectada durante las primeras horas de la mañana evitando que la piscina sea alimentada y exista contaminación por residuos de balanceado. Se tomaron parámetros como pH, salinidad, temperatura, amonio total (TAN), nitritos, nitratos, dureza cálcica, alcalinidad, sulfatos, magnesio, potasio y fosfatos medidos en mg/L mediante espectrofotometría (*Lisseth, 2018*). Adicionalmente, se realizó análisis microbiológico de la muestra de agua de piscina en TCBS para cuantificar el contenido de bacterias del género *Vibrio* (*Anupamaa, Deekshaa, & Deekshaa, 2019*).

2.4. Control de esterilidad: muestras y medios de cultivo

Para determinar la presencia de microorganismos en las soluciones preparadas, cada una de ellas fue sembrada en medios TSA, TCBS, MCCONKEY y SABOUROUD. Los medios fueron previamente sometidos a pruebas de esterilidad para validar su uso antes de la siembra.

2.1. Preparación del inóculo bacteriano

El aislado de *Vibrio parahaemolyticus* utilizado se obtuvo de un camarón moribundo de la especie *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* de una piscina camaronera e identificada mediante PCR (*Caoa, Zhaoa, & Zhang, 2019*). A partir de cepas fresca de *Vibrio parahaemolyticus* cultivada en medio sólido TSA (NaCl 2%) se realizó la curva de crecimiento bacteriano (*CESASIN, 2003*) en una fiola de 250 ml conteniendo medio estéril de caldo casoy (TSB BD, Laboratorio de Salud Animal; ESPOL) el cual fue incubado con agitación continua a $35 \pm 2^\circ\text{C} - 300\text{rpm}$ durante 6 horas en incubador orbital modelo MaxQ4000 Thermo Fisher Scientific®.

2.5. Diseño de la placa microelisa

La placa fue diseñada incluyendo 3 secciones descritas en la **Figura 2.1**

Cada solución evaluada contuvo 3 réplicas por cada químico (incluyendo concentraciones de propóleo y moringa) y 3 réplicas del mismo químico con la adición de la bacteria. En cada pocillo se colocó 150µl de las soluciones a ensayar y 50 µl de la bacteria a una concentración de 10^{-3} UFC/ml. Para los controles se usaron 150 µl de cada solución junto a las soluciones con la bacteria. La placa fue incubada durante un periodo de 6 horas en incubadora agitadora con una configuración de 150 rpm a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

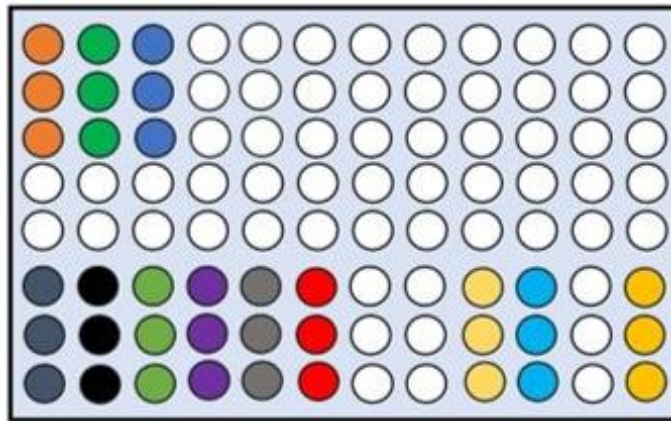


Figura 2.1 Diseño preliminar de la distribución de sustancias a ensayar (Castro & Lagos 2021).

Superior: Químicos inorgánicos (Hipoclorito de calcio, Carbonato de calcio, Silicato y Nitrato de sodio + Silicato de sodio).

Inferior: Químicos orgánicos (Melaza de caña, Melaza + silicato, Bioactivador orgánico, Ácido Húmico, Propóleo y Moringa).

Inferior esquina derecha: Control positivo (TSB + bacteria) y 2 controles negativos (Agua de cultivo y Caldo TSB).

Colores	Nombre	Concentraciones (250ml)
	Cal clorada	52.5g
	Carbonato de Calcio	0.0025g
	Nitrato de sodio	0.000625g
	Silicato	0.0025g
	Melaza	0.0075g
	Melaza + Silicato	0.01g
	Ácido Húmico	0.0000375g
	Biobac A	0.00001875g
Colores	Nombre	Concentraciones (100ml)
	Propoleo 1%	1g
	Propoleo 5%	5g
	Propoleo 10%	10g
	Moringa 1%	1g
	Moringa 5%	5g
	Moringa 10%	10g
Colores	Nombre	Concentraciones
	Caldo TSB (Negativo #1)	150 ul/Pocillo
	Agua de cultivo (Negativo #2)	150ul/Pocillo
	TSB + Bacteria	150ul/Pocillo

Figura 2.2. Designación de colores y concentraciones para las soluciones a ensayar.
(Castro & Lagos 2021).

2.6. Evaluación de la respuesta bacteriana mediante espectrofotometría.

Durante 6 horas, la respuesta bacteriana fue medida cada hora mediante lectura de espectrofotometría a 560nm con ayuda de un lector de Elisa (modelo Synergy HTX, marca Biotek®).

2.7. Corrección de lectura óptica.

Los datos reportados de DO obtenidos en el lector de Elisa fueron sometidos a una corrección en Microsoft Excel mediante una fórmula para corrección de ruido (Vargas, 2019).

2.8. Análisis de datos.

La homogeneidad y normalidad de los datos obtenidos fueron evaluados mediante las pruebas de Levene y Smirnov Kolmogorov. Se realizaron comparaciones entre medias usando la prueba t-student para determinar diferencias entre las abundancias a lo largo del tiempo y finalmente se empleó análisis multivariado a través de la prueba ANOSIM para determinar el efecto del tiempo, principios químicos y tipo de compuesto.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Resultados de calidad de agua

Los resultados de los parámetros de la calidad del agua utilizada se reportaron en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Resultados del análisis de calidad de agua de la muestra de agua de cultivo utilizada (Castro & Lagos, 2021).

Parámetros	Valores	Rango óptimo (Agua salobre)
Salinidad	4.48 ppt	3 - 25 ppt
Temperatura	24.3 °C	18°C - 30°C
pH	8.15	6.5 - 8.5
Amonio (TAN)	0.49 mg/L	< 1 mg/L
Amonio NH ₃	0.017 mg/L	< 0.5 mg/L
Nitritos (NO ₂)	0.365 mg/L	0.003 - 0.330 mg/L
Nitratos	4.42 mg/L	2.2 - 4.40 mg/L
Dureza Cálcica	179mg/L	125 - 600 mg/L
Calcio	72 mg/L	60 -120 mg/L
Magnesio	300mg/L	30 -2500 mg/L
Potasio	64 mg/L	20 - 200 mg/L
Fosfatos	0.11 mg/L	0.1 - 0.5 mg/L
Alcalinidad	260 mg/L	100 -250 mg/L
Sulfatos	210 mg/L	100 - 200 mg/L

Camaronera San Andrés. Piscina 6. Fecha: 12/nov./2021; 6:30 am.

Los resultados del análisis microbiológico para *Vibrio* de la muestra del agua de cultivo reportaron una concentración de 1.4×10^2 UFC/mL.

3.2. Control microbiológico de las soluciones a ensayar

La **Tabla 3.2** se puede observar los resultados obtenidos sobre la presencia de carga bacteriana en los 4 medios utilizados.

Tabla 3.2. Resultados del conteo de colonias bacterianas de las soluciones a ensayar.

Solución química	Naturaleza	TSA (UFC/ml)	TCBS (UFC/ml)	MacConkey (UFC/ml)	Sabouraud (UFC/ml)
Cal clorada	Inorgánico	0	0	0	0
Carbonato de calcio	Inorgánico	2×10^1	0	0	0
Nitrato de sodio	Inorgánico	3.18×10^3	0	0	0
Silicato	Inorgánico	0	0	0	0
Melaza	Orgánico	6×10^3	0	0	0
Melaza + Silicato	Mezcla	0	0	0	0
Bioactivador orgánico	Orgánico	0	0	0	0
Ácido Húmico	Orgánico	0	0	0	0
Propóleo 1%	Orgánico	0	0	0	0
Propóleo 5%	Orgánico	2×10^1	0	0	0
Propóleo 10%	Orgánico	0	0	0	0
Moringa 1%	Orgánico	1.72×10^3	0	2×10^1	0
Moringa 5%	Orgánico	2.2×10^3	0	0	9.6×10^2
Moringa 10%	Orgánico	3.86×10^3	0	1.76×10^3	0

3.3. Respuesta in vitro de la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* frente a las dosis empleadas de insumos acuícolas para preparación inicial de piscinas de engorde

De los 14 insumos acuícolas probados; 5 mostraron un efecto de incremento significativo en la abundancia inicial de *Vibrio parahaemolyticus* (3 inorgánicos, 1 orgánico y 1 mezcla entre orgánico + inorgánico). Otros 5 compuestos mostraron respuesta no significativa en la abundancia inicial del *Vibrio parahaemolyticus* probado (4 orgánicos

y 1 inorgánico). Finalmente, 4 compuestos orgánicos mostraron descensos no significativos en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus*.

La **Tabla 3.3** muestra la tasa de crecimiento del *Vibrio parahaemolyticus* frente a los insumos acuícolas probados.

Tabla 3.3. Tasa de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en diferentes insumos acuícolas ensayados.

Insumo acuícola	Principio activo	Tasa de crecimiento	Respuesta celular
Cal clorada	Cloro	1.05	No hubo cambios
Carbonato de calcio	Calcio	2.8	Duplicó
Nitrato de sodio	Nitrógeno	6.17	Sextuplicó
Silicato	Silicio	5.7	Quintuplicó
Melaza	Carbono, calcio, magnesio, hierro	5.04	Quintuplicó
Melaza + Silicato	Carbono, calcio, magnesio, hierro y silicio	3.93	Triplicó
Ácido húmico	Carbono y nitrógeno	3.11	Triplicó
Bioactivador orgánico	Nitrógeno	4.47	Cuadruplicó
Propóleo 1%	Flavonoides y ácidos fenólicos	0.92	No hubo cambios
Propóleo 5%	Flavonoides y ácidos fenólicos	0.89	No hubo cambios
Propóleo 10%	Flavonoides y ácidos fenólicos	0.89	No hubo cambios
Moringa 1%	Flavonoides	2.33	Duplicó
Moringa 5%	Flavonoides	0.98	No hubo cambios
Moringa 10%	Flavonoides	1.10	No hubo cambios

3.4. Evaluación en el tiempo de la influencia de los insumos acuícolas probados

A lo largo de las 5 horas de evaluación, la respuesta en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* fue diferente en el tiempo para cada solución de insumos acuícolas probados (ver *tabla 3.4 y 3.5*).

Tabla 3.4. Lecturas de abundancia en el tiempo de *Vibrio parahaemolyticus* frente a las sustancias inorgánicas y mezcla de soluciones ensayadas.

Tiempo (h)	Inorgánicos				Mezcla orgánico e inorgánico
	Cal clorada	Carbonato de calcio	Nitrato de sodio	Silicato	Melaza & Silicato
0	2.195 ± 0.011 ^a	0.021 ± 0.003 ^a	0.017 ± 0.002 ^a	0.021 ± 0.005 ^a	0.029 ± 0.001 ^a
1	2.242 ± 0.051 ^a	0.040 ± 0.001 ^{ab}	0.074 ± 0.009 ^{bc}	0.098 ± 0.001 ^b	0.057 ± 0.003 ^b
2	2.214 ± 0.089 ^a	0.037 ± 0.008 ^{ab}	0.098 ± 0.001 ^{bc}	0.098 ± 0.001 ^b	0.081 ± 0.004 ^c
3	2.32 ± 0.03 ^a	0.049 ± 0.009 ^{ab}	0.07 ± 0.02 ^b	0.104 ± 0.006 ^{bc}	0.099 ± 0.003 ^d
4	2.281 ± 0.012 ^a	0.029 ± 0.020 ^{ab}	0.104 ± 0.007 ^{bc}	0.109 ± 0.009 ^{bc}	0.113 ± 0.005 ^e
5	2.308 ± 0.051 ^a	0.059 ± 0.007 ^b	0.105 ± 0.007 ^c	0.121 ± 0.009 ^c	0.114 ± 0.005 ^e

Lecturas con letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) y lecturas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3.5. Lecturas de abundancia en el tiempo de *Vibrio parahaemolyticus* frente a las soluciones orgánicas ensayadas.

Tiempo (h)	Orgánico								
	Melaza	Ácido húmico	Bioactivador orgánico	Propóleo 1%	Propóleo 5%	Propóleo 10%	Moringa 1%	Moringa 5%	Moringa 10%
0	0.023 ± 0.002 ^a	0.027 ± 0.004 ^a	0.019 ± 0.003 ^a	0.630 ± 0.194 ^a	2.27 ± 0.199 ^a	2.775 ± 0.080 ^a	0.138 ± 0.083 ^a	1.140 ± 0.160 ^a	0.577 ± 0.020 ^a
1	0.067 ± 0.007 ^b	0.052 ± 0.029 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	1.189 ± 0.191 ^b	2.309 ± 0.050 ^a	2.67 ± 0.158 ^a	0.102 ± 0.079 ^a	1.271 ± 0.289 ^a	0.653 ± 0.017 ^b
2	0.088 ± 0.014 ^{bc}	0.070 ± 0.031 ^a	0.066 ± 0.045 ^a	1.388 ± 0.168 ^b	2.52 ± 0.081 ^a	2.626 ± 0.158 ^a	0.24 ± 0.150 ^a	1.094 ± 0.318 ^a	0.663 ± 0.007 ^b
3	0.107 ± 0.004 ^{cd}	0.069 ± 0.023 ^a	0.061 ± 0.017 ^a	1.2 ± 0.189 ^b	2.187 ± 0.079 ^a	2.551 ± 0.267 ^a	0.298 ± 0.133 ^a	1.191 ± 0.432 ^a	0.641 ± 0.025 ^b
4	0.11 ± 0.003 ^d	0.079 ± 0.019 ^a	0.075 ± 0.014 ^a	1.254 ± 0.192 ^b	2.147 ± 0.087 ^a	2.513 ± 0.277 ^a	0.145 ± 0.154 ^a	1.042 ± 0.338 ^a	0.633 ± 0.015 ^b
5	0.116 ± 0.003 ^d	0.084 ± 0.014 ^a	0.085 ± 0.031 ^a	1.244 ± 0.153 ^b	2.104 ± 0.095 ^a	2.484 ± 0.303 ^a	0.320 ± 0.019 ^a	1.122 ± 0.200 ^a	0.637 ± 0.008 ^b

Lecturas con letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) y lecturas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se pudo observar que el carbonato de calcio, nitrato de sodio, silicato, melaza y mezcla de melaza con silicato, presentan estímulos en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* a la hora y entre la cuarta y quinta hora del ensayo donde presentan los incrementos significativos (ver **Figura 3.1 A, B, C, D y E**).

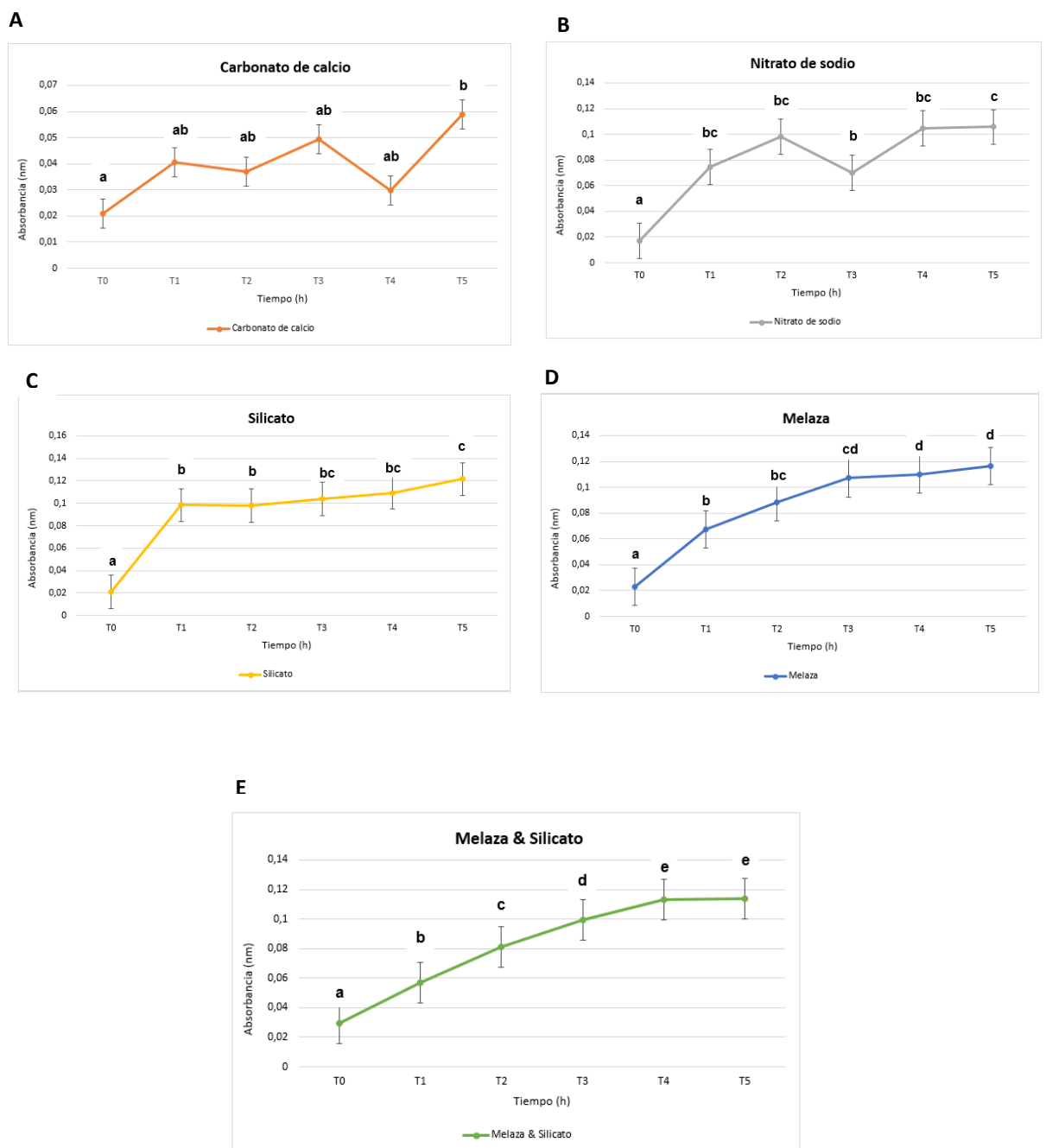


Figura 3.1. Sustancias que presentaron diferencias significativas en la abundancia de *Vibrio parahaemolyticus*.

Mientras que la cal clorada, el ácido húmico y el bioactivador orgánico evaluado mostraron tendencias de incremento no significativas en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* durante el tiempo de ensayo (ver **Figura 3.2 A, B y C**).

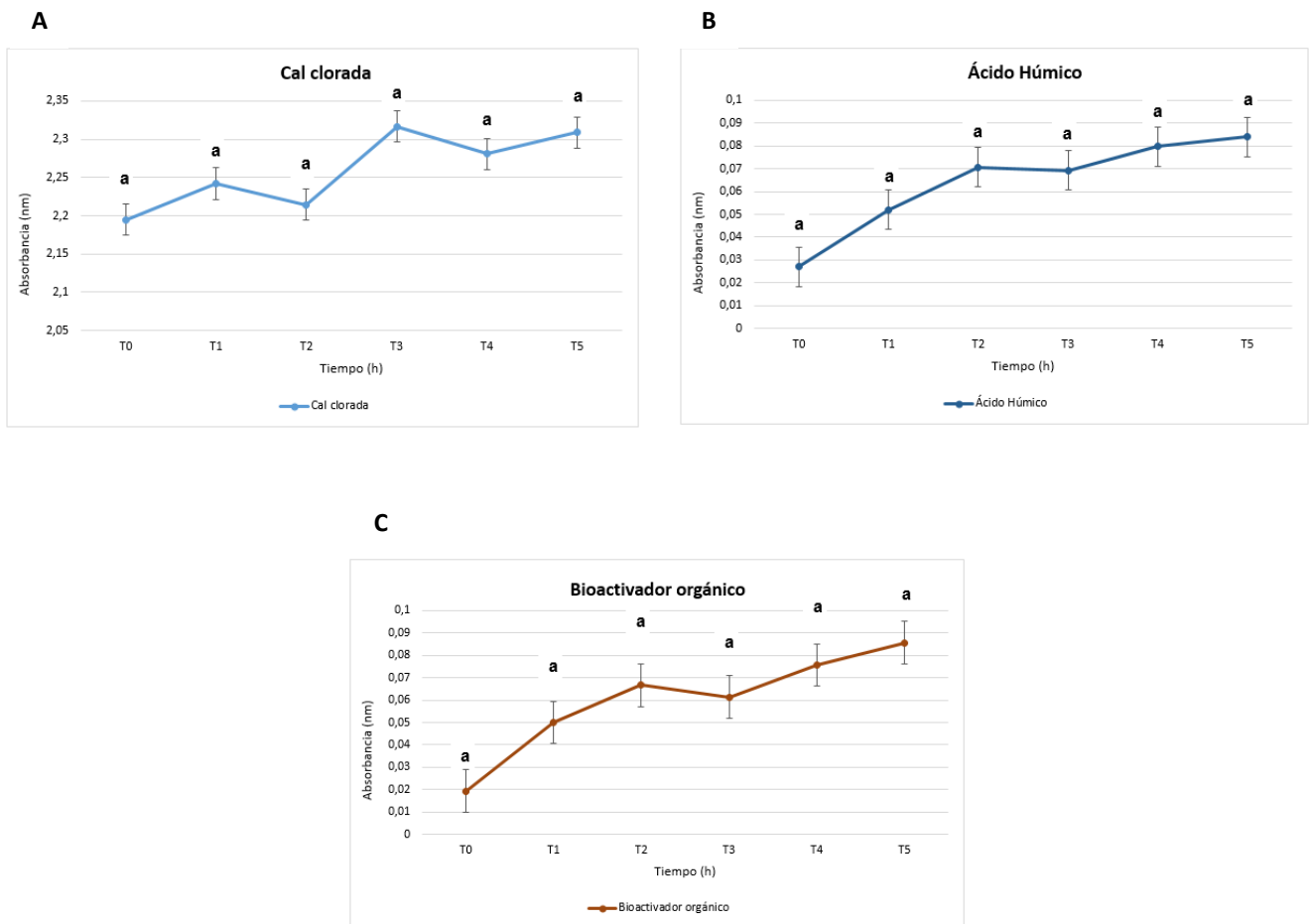


Figura 3.2. Sustancias que no presentaron diferencias significativas en la abundancia de *Vibrio parahaemolyticus*.

El propóleo al 1% y la moringa al 10% mostraron un incremento significativo durante la primera hora del ensayo, sin embargo, no se observó ningún nuevo incremento significativo en las posteriores horas del ensayo (ver **Figura 3.3 A y B**).

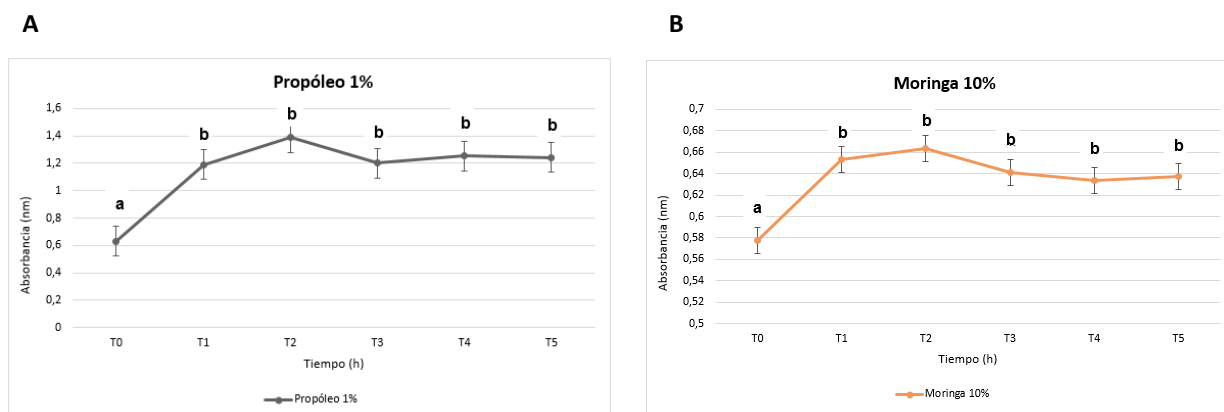


Figura 3.3. Sustancias que presentaron diferencias significativas durante las primeras horas del ensayo.

El propóleo al 5% y 10% mostraron durante el ensayo descensos no significativos en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* (ver **Figura 3.4 A y B**).

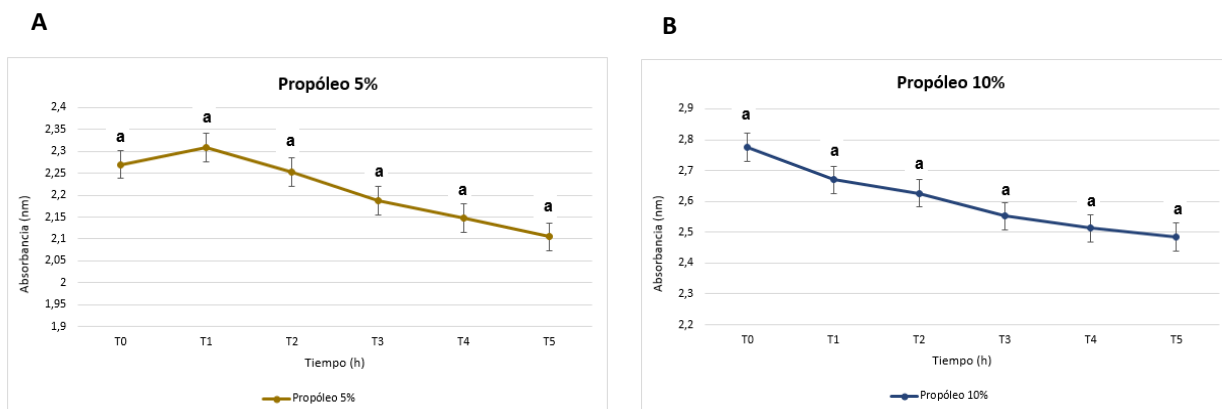


Figura 3.4. Sustancias que presentaron descensos no significativos en relación con la abundancia de *Vibrio parahemolyticus*.

La moringa al 1% y 10% presentó una dinámica variante no significativa a lo largo del ensayo (ver **Figura 3.5 A y B**).

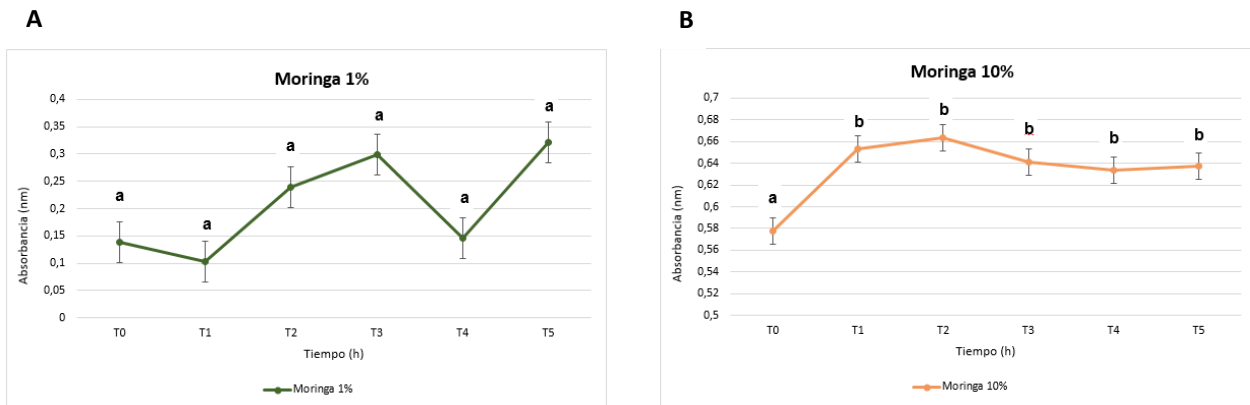


Figura 3.5. Sustancias con una dinámica no significativa de la abundancia de *Vibrio parahaemolyticus*.

3.5. Evaluación del efecto del tiempo, principio activo y naturaleza del compuesto en la abundancia reportada

Con la finalidad de conocer si existió diferencias estadísticas entre las abundancias debido al tiempo, principios activos que conforman los insumos acuícolas probados o la naturaleza del compuesto (orgánico, inorgánico o ambos) evaluados frente a los diferentes insumos acuícolas, se empleó un análisis ANOSIM.

Los resultados indican que el tiempo no ejerció ningún tipo de efecto sobre la abundancia observada, no obstante, los principios activos de los insumos acuícolas mostraron ser los que provocaron mayor impacto en la distribución de la abundancia, reportando un valor significativo de $R=0.791$ ($p < 0.05$).

La comparación entre los efectos en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus* frente a los principios activos evaluados reportó que la combinación de carbonato de calcio-silicato; carbonato de calcio-bioactivador orgánico; bioactivador orgánico-silicato; silicato-ácido húmico y melaza-ácido húmico, no mostraron diferencias significativas entre sí. El resto de los insumos analizados si mostraron diferencias significativas en la abundancia observada.

3.6. Análisis de costos

Para el análisis de costos se realizó una revisión en línea para conseguir valores referenciales (ver **Tabla 3.6, 3.7 y 3.8**) de los insumos, equipos y reactivos usados que se encuentran actualmente en el mercado ecuatoriano.

Materiales como los químicos ensayados y el kit de análisis de calidad de agua fueron donados por parte de la granja camaronera donde se tomaron las muestras de agua. Los instrumentos usados como el vórtex, la incubadora y el lector de Elisa fueron prestados por los jefes de los diferentes **laboratorios de Biomedicina** y **CSA** de la **Facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar**.

Tabla Error! No text of specified style in document.3.6. Costo unitario y total de los insumos utilizados.

Insumos			
Material	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Fiola/Matraz Erlenmeyer 500 mL	3	\$ 8.00	\$ 24.00
Fiola/Matraz Erlenmeyer 250 mL	2	\$ 6.25	\$ 12.50
Embudo	4	\$ 1.50	\$ 6.00
Cajas Petri Mono plástica x20 unidades	2	\$ 6.25	\$ 12.50
Tubos Falcon	30	\$ 0.20	\$ 6.00
Placa Microelisa	3	\$ 2.50	\$ 7.50
Dispensor celular	2	\$ 7.00	\$ 14.00
Mechero	2	\$ 7.50	\$ 15.00
Funda Punta amarilla 200 µL	4	\$ 15.00	\$ 60.00
Funda punta azul 1000 µL	6	\$ 15.00	\$ 90.00
Pipeta graduada 10 mL	1	\$ 3.15	\$ 3.15
Auxiliar de pipeta	1	\$ 16.50	\$ 16.50
Cinta testigo control	1	\$ 16.50	\$ 16.50
Fascos de polipropileno	8	\$ 4.50	\$ 36.00
Químicos inorgánicos	8	\$ 50.00	\$ 400.00
Químicos orgánicos	2	\$ 6.50	\$ 13.00
Pipeta Pasteur de plástico 3 mL x500 unidades	1	\$ 30.00	\$ 30.00
TOTAL			\$ 762.65

Tabla 3.7. Costos unitarios y total de los reactivos utilizados.

Reactivos			
Material	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Kit de análisis calidad de agua	1	\$ 46.50	\$ 46.50
Caldo TSB	1	\$ 80.00	\$ 80.00
Agar TSA	1	\$ 100.00	\$ 100.00
Agar Sabouraud	1	\$ 100.00	\$ 100.00
Agar TCBS	1	\$ 125.00	\$ 125.00
Agar MacConkey 500 gr	1	\$ 100.00	\$ 100.00
Cloruro de sodio 1000 gr	1	\$ 3.00	\$ 3.00
Agua destilada	6	\$ 1.35	\$ 8.10
TOTAL			\$ 562.60

Tabla 3.8. Costos unitarios y total de los equipos utilizados.

Equipos			
Material	Cantidad	Costo unitario	Costo total
Medidor digital de pH y temperatura	1	\$ 97.75	\$ 97.75
Espectrofotómetro	1	\$ 1,590.00	\$ 1,590.00
Incubadora agitadora	1	\$ 3,075.25	\$ 3,075.25
Lector de Elisa	1	\$ 1,400.00	\$ 1,400.00
Vortex Mixer	1	\$ 42.00	\$ 42.00
Pipeta automática graduable de 100-1000 µL	1	\$ 150.00	\$ 150.00
Pipeta automática graduable de 10-100 µL	1	\$ 135.00	\$ 135.00
Pipeta multicanal	1	\$ 1,093.75	\$ 1,093.75
Balanza digital de precisión	1	\$ 228.00	\$ 228.00
TOTAL			\$ 7,811.75

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

El estudio de las poblaciones microbianas en acuicultura y como estas reaccionan a los diferentes estímulos que existen dentro de la piscina de cultivo se vuelve cada día un tema más concurrido para el desarrollo de futuras estrategias de mitigación de patógenos. Al término de este proyecto existe un fuerte indicio de que las bacterias patógenas podrían utilizar los insumos acuícolas como una fuente de nutrientes para su proliferación, mediante algún tipo de mecanismo de acción biológico. El determinante de esta proliferación podría deberse a ciertos elementos presentes en dichos insumos acuícolas, por lo que se sugiere continuar con la investigación a profundidad.

Los resultados obtenidos reflejan que el *Vibrio parahaemolyticus* responde más ante sustancias que contiene altos valores de azúcar, calcio, nitrógeno y hierro para poder proliferar en el sistema.

4.1. Discusión de resultados

Los patógenos constantemente emplean nuevas vías de infección aprovechando lo que el ecosistema les ofrece. Estudios en ecología microbiana han reportado una forma de adaptación llamada *motilidad de enjambre* lo cual les permite a los microorganismos patógenos colonizar superficies, moverse entre ellas y adquirir elementos químicos disponibles en el medio y sobrevivir en ambientes hostiles. Bajo esta habilidad, las bacterias son capaces de modificar sus genes de expresión y aumentar su concentración bacteriana (Gode, 2011).

Existen elementos químicos que influyen en la respuesta biológica de las bacterias, como por ejemplo el calcio, que está directamente asociado en la mejora de la adaptación y supervivencia de las bacterias patógenas. Este elemento, juega un rol importante en la regulación de los genes de virulencia, y las investigaciones señalan que la disponibilidad de este en el ambiente aumenta la concentración celular, ya que se ha observado que las altas cantidades de este elemento incrementan la tasa de motilidad de enjambre. El magnesio es otro elemento químico que promueve la regulación y adaptación de los

genes de expresión, sin embargo, no sucede de la misma forma que con el calcio (Evenhuis, Lipscomb, & Birkett, 2020).

La información que corrobora que los organismos patógenos son capaces de aprovechar iones y utilizarlos para sobrevivir, es escasa; sin embargo, la ciencia está dirigiendo su mirada a estos casos ya que es importante determinar la manera en que estos microorganismos se desenvuelven para proliferar los sistemas en los que habitan y anticipar formas de tratamiento para así, evitar pérdidas económicas.

Durante el ensayo se utilizaron productos químicos orgánicos e inorgánicos que preliminarmente reportaron ejercer un cambio en la abundancia celular de *Vibrio parahaemolyticus*. Los incrementos observados significativamente en 7 de los 14 insumos acuícolas evaluados están fuertemente asociados a la composición química de estos productos, pero se desconoce el mecanismo que utiliza la bacteria patógena para aprovecharlos de mejor manera. Interesantemente, las combinaciones de compuestos que contienen carbono, nitrógeno, calcio y magnesio (carbonato de calcio, compuesto biológico, ácido húmico, melaza y silicato) no mostraron una interacción entre sí que afecte a la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus*. La melaza y la combinación de melaza con dióxido de silicio son usados de manera recurrente en las piscinas para formar un ambiente de equilibrio entre las bacterias patógenas y benéficas dentro de un ecosistema acuícola.

La creencia de propiedades germicidas en la melaza ha llevado a los productores a usarla en los cultivos de forma desmedida o exagerada ya que promete un efecto antibacteriano por competencia entre bacterias del género *Vibrio*. Sin embargo, está comprobado que este producto orgánico incrementa la concentración celular debido a su alto contenido de sacarosa, nitrógeno y fósforo, los cuales son una fuente de energía para estos microorganismos (Bullain, Aldana, & Álvarez, 2020). Por lo tanto, se ha verificado que el producto no muestra actividad antiséptica frente a bacterias del género *Vibrio* (Bullain, Aldana, & Álvarez, 2020).

El dióxido de silicio utilizado para mezclar la melaza contiene una cantidad importante de multiminerales, como calcio (2.66%), magnesio (1.69%) y otros excipientes. Estos elementos podrían facilitar al *Vibrio* adaptarse y sobrevivir en un sistema de cultivo en condiciones adversas, pero es algo que debe ser estudiado con mayor detalle.

Adicionalmente, los productos naturales como el propóleo y moringa al 10% de su concentración mostraron una reducción en la abundancia del *Vibrio parahaemolyticus*. Ambas sustancias son productos naturales que actúan de manera efectiva contra la

actividad microbiana y que guardan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y que combinados con los otros productos ensayados no mostraron interacción que permita su proliferación.

El propóleo mayormente está constituido por flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres. Alrededor del 35% es cera de abejas y el 10% corresponde a aceites esenciales y aromáticos como el pineno. Contiene también un pequeño porcentaje de ácidos grasos, polen, vitaminas B1, C y E; también minerales esenciales como Fe y Zn (De la Cruz-Cervantes, Benavides, Sánchez, Vásquez, & Ruiz, 2018), los cuales son importantes para el crecimiento de la producción acuícola pues intervienen en los procesos inmunológicos y digestivos de estos animales (Figueiredo-Silva, 2020).

Este producto natural ha sido evaluado en cultivos de tilapia (*Oreochromis niloticus* L) y ha demostrado funcionar bien como antiparasitario y antifúngico contra algunos patógenos de peces (De la Cruz-Cervantes, Benavides, Sánchez, Vásquez, & Ruiz, 2018). (De la Cruz-Cervantes, Benavides, Sánchez, Vásquez, & Ruiz, 2018), sería importante evaluar las vías o mecanismos de inclusión de este componente dentro de los sistemas acuícolas de una manera que permita una liberación prolongada y estable en el agua.

La moringa es una especie arbórea que no ha sido muy usada en acuicultura, sin embargo, investigaciones de su perfil lipídico han reportado la presencia de ácidos grasos, los cuales están involucrados en funciones biorreguladoras estructurales de las membranas celulares. Contiene 25.9% de proteína y 17 aminoácidos de los cuales 9 son esenciales (Estay-Moyano, Mazón-Suástegui, Zapata, Simal-Gandara, & Lodeiros, 2021).

Se ha comprobado que la moringa contiene vitaminas, flavonoides y ácidos fenólicos (Vásquez, Carrillo, Vidal, & Marrero, 2021). Los ácidos fenólicos tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacteriales (Estay-Moyano, Mazón-Suástegui, Zapata, Simal-Gandara, & Lodeiros, 2021).

Estas sustancias naturales pueden ser utilizadas como apoyo al añadir melaza a las piscinas de cultivo con la finalidad de evitar el crecimiento bacteriano del *Vibrio parahaemolyticus* y de esta manera, aprovechar los múltiples beneficios que estos productos poseen.

4.2. Conclusiones

Los resultados de las pruebas *in vitro* indicaron efectivamente un aumento en la concentración celular de *Vibrio parahaemolyticus* para algunas de las soluciones acuícolas probadas. Las sustancias que dentro de su composición proveían mayor disponibilidad de fuentes de carbono, calcio, nitrógeno, fosforo, hierro y magnesio fueron las que más incremento celular presentaron. Las pruebas realizadas permitieron conocer a que soluciones fue más sensible la respuesta del *Vibrio parahaemolyticus*.

Los compuestos que mostraron efecto de estimular el crecimiento celular fueron el carbonato de calcio, silicato, nitrato de sodio, la mezcla de melaza y silicato, melaza y propóleo al 1%.

Los incrementos celulares observados se ubicaron en el orden de magnitud de doble, cuádruple, quíntuple y séxtuple a las 5 horas de ensayo.

El tiempo no reporto ejercer cambio en la proliferación celular, pero los componentes químicos que conforman los insumos acuícolas disponibles sí.

Las combinaciones de carbonato de calcio – compuesto biológico; carbonato de calcio – silicato; compuesto biológico – silicato; silicato – ácido húmico; melaza – ácido húmico no mostraron una interacción que afecte la densidad celular del *Vibrio parahaemolyticus*.

4.3. Recomendaciones

Para llevar a cabo el experimento y obtener mejores resultados recomendamos seguir todos los protocolos de bioseguridad para mantener las muestras lo más estériles y limpias posibles, ya que existe probabilidad alta de contaminación de las muestras.

Los reactivos y soluciones deben estar debidamente rotuladas para evitar la confusión o una mezcla equivocada.

Las muestras deben ser frescas y usar un buen protocolo de manejo y transporte para su traslado al laboratorio.

Este proyecto es tan solo un preliminar de una investigación mucho más grande y puede servir como un antecedente sobre el comportamiento de *Vibrio parahaemolyticus*, recomendamos realizar estudios con más detalle acerca del comportamiento de esta bacteria a nivel genético.

Es recomendable que los tiempos de exposición de la bacteria con las soluciones continúen registrándose hasta las 24 horas para una mayor precisión en los análisis y una mejor comprensión de la actividad bacteriana.

Realizar una correcta curva de crecimiento es vital para conocer los tiempos de crecimiento exponencial de la bacteria a ensayar.

BIBLIOGRAFÍA

- Alune. (19 de diciembre de 2021). *The Fish Site*. Obtenido de *Everything you need to know about EMS in shrimp farming*: <https://thefishsite.com/articles/everything-you-need-to-know-about-ems-early-mortality-syndrome-in-shrimp-farming>
- Anupamaa, K. P., Deekshaa, K., & Deekshaa, A. (2019). Comparative performance of TCBS and TSA for the enumeration of trh+ *Vibrio parahaemolyticus* by direct colony hybridization. *Science Direct*, 37-42.
- Behak, J., Wagner, B., Burnes, B., & Hanson, T. (2015). *Farm size, seining practices, and salt use: Risk factors for Aeromonas hydrophila outbreaks in farm-raised catfish Alabama, UA*. Alabama: Elsevier.
- Biomín. (18 de diciembre de 2021). *Vibrio en la acuicultura del camarón*. Obtenido de BIOMIN: <https://www.biomín.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/>
- Böger, M. (2020). *Structure-function relationships of (prebiotic) carbohydrates and their selective consumption by probiotic bacteria*. <https://doi.org/10.33612/diss.111903379>.
- Caoa, X., Zhaoa, L., & Zhang, J. (2019). Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods. *Science Direct*, 145-152.
- Caro, L. F. (31 de agosto de 2020). *AHPND es una enfermedad crónica del camarón blanco del Pacífico de América Latina*. Obtenido de *Global Seafood Alliance*: <https://www.globalseafood.org/advocate/ahpnd-es-una-enfermedad-cronica-del-camaron-blanco-del-pacifico-de-america-latina/>
- Ceccarelli, D. (2019). *Vibrio Species*. *Wiley Online Library*, 133-148.
- CESASIN. (2003). *Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas camaroneras*. Mazatlán: *Maricultura del Pacífico*.
- CESASIN. (28 de noviembre de 2003). *Técnicas de Bacteriología, Técnicas de Bacteriología, Análisis en Fresco, Calidad Análisis en Fresco, Calidad de Agua y Buenas Prácticas de Agua y Buenas Prácticas de Manejo y Bioseguridad de Manejo y Bioseguridad en Granjas Camaroneras en Granjas Camaron. Obtenido de <http://www.cesasin.com.mx/ManualCapacitacion.pdf>*
- Claude E Boyd, P. (8 de abril de 2019). *Global Seafood Alliance*. Obtenido de *La preparación del estanque de camarones es crucial para la producción y prevención de enfermedades*: <https://www.globalseafood.org/advocate/la-preparacion-del-estanque-de-camarones-es-crucial-para-la-produccion-y-prevencion-de-enfermedades/>

- Evenhuis, J., Lipscomb, R., & Birkett, C. (2021). Growth of *Flavobacterium columnare* Genomovars in the Presence or lack of supplemental cations.
- FAO. (2021). Operaciones en una granja camaronera. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ab466s/ab466s04.htm>
- Guerra, S., & Reinoso, G. (2016). Evaluacion in vitro de la capacidad bacteriana para remover plomo en aguas residuales sinteticas. Quito: Universidad politécnica salesiana.
- Huahuala, R. A. (2021). Eficiencia del propóleo en el tratamiento de enfermedades bacterianas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) evaluada en laguna altoandina. Peru: Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo.
- Intriago, L. R. (2021). Relacion de los abonos organicos con la productividad primaria en piscinas de camaron blanco *litopenaeus vannamei*. Machala: Repositorio digital UTMACH.
- Kayode, R. M., & Afolayan, A. J. (2015). Cytotoxicity and effect of extraction methods on the chemical composition of essential oils of *Moringa oleifera* seeds. Zhejiang: Journal of Zhejiang University-SCIENCE B.
- Li, X., Zhu, Y. J., E., R., & Yang, D. (2017). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* and factors influencing them in different freshwater fishponds. Iranian Journal of Fisheries Sciences.
- Lisseth, R. O. (2018). ANÁLISIS DE AGUA COMO TÉCNICAS PARA CARACTERIZAR Y CONTROLAR LOS POSIBLES PATÓGENOS EN EL CULTIVO DE. Machala.
- Márquez, F. M. (2017). Relacion de la materia organica con la comunidad bacteriana en suelos de piscinas de cultivos *litopenaeus vannamei*. Machala: Repositorio digital UTMACH.
- Massaut, L., Sonnenholzner, S., & Boyd, C. (2020). Riesgos asociados con productos químicos y otros agentes utilizados en los intentos de controlar el virus del síndrome de la mancha blanca.
- Meza, M. C. (2017). Innovation in the aquaculture sector. Mexico: Ra Ximhai.
- Ministerio de Acuacultura y Pesca. (2018). Acuerdo Ministerial Nro. MAP-SCI-2018-0001-A. Guayaquil: Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. Obtenido de <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2021/08/MAP-SCI-2018-0001-A.pdf>
- Ministerio de Agricultura. (2017). *Vibrio Parahaemolyticus*: Ficha de peligro.
- Montiel, M., Suárez, M. G., & Medina, Z. (2015). DISTRIBUCION DE *Vibrio* spp. EN AGUA Y SEDIMENTO DE ESTANQUES PRODUCTORES DE CAMARON *Litopenaeus vannamei*. Revista Científica, 293-299.
- Mougin, J. (2019). Adhesion to stainless steel surfaces and detection of viable but non cultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* isolated from shrimps in seafood processing environments: Stayin' alive? Science Direct, 122-130.
- N. Chandrakala, S. P. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. Thanjavur: IJSRSET.

- Novriadi, R. (2016). *Vibriosis in aquaculture*. Batam: Omni-Akuatika.
- OIRSA. (18 de diciembre de 2021). Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Obtenido de *Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) del camarón*: <https://www.oirsa.org/informacion.aspx?idc=65&id=57>
- Quimi Net. (24 de marzo de 2009). QuimiNet.com. Obtenido de *Procedimiento para una prueba de esterilidad*: <https://www.quiminet.com/articulos/procedimiento-para-una-prueba-de-esterilidad-34434.htm>
- Skretting. (2018). *Boletines Skretting*. Obtenido de *Guía de manejo de camaroneras*: https://libreriascretting.ec/admin/public/uploads/catalogos/guia_manejo_camaroneras.pdf
- Varela, G., & Grotius, G. (2015). *Fisiología y metabolismo bacteriano*. Academia.
- Vazquez, J. C. (2008). *Técnicas de bacteriología y virología medica: fisiología y metabolismo bacteriano*.
- Wenlong, C., De La Fuente, L., & Arias, C. (2019). *Transcriptome analysis of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* in biofilm suggests calcium role in pathogenesis*.
- Zarei, M., Borujeni, M. P., Jamnejad, A., & Khezrzadeh, M. (2012). *Seasonal prevalence of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus**. *Sciencie Direct*, 107-109.
- Zhang, D., Xu, D.-H., Shoemaker, C., & H. Beck, B. (2020). *The severity of motile *Aeromonas* septicemia caused by virulent *Aeromonas hydrophila* in channel catfish is influenced by nutrients and microbes in water*. Auburn: Elsevier
- Bullain, M., Aldana, Y., & Álvarez, J. (2020). *Evaluación de la actividad antibacteriana de la melaza frente a *Vibrio* sp. aislados de estanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei* (camarón)*. ResearchGate.
- De la Cruz-Cervantes, J., Benavides, F., Sánchez, J., Vásquez, M., & Ruiz, A. (2018). *Propolis in Aquaculture: A review of its potencial*. Nuevo León.
- Evenhuis, J., Lipscomb, R., & Birkett, C. (2020). *Growth of *Flavobacterium columnare* Genomovars in the presence or lack of supplemental cations*.
- Gode, C. J. (2011). **Vibrio parahaemolyticus* responds to growth on a surface by initiating a program of gene control that is regulated by calcium, iron, and quorum sensing*. Iowa.

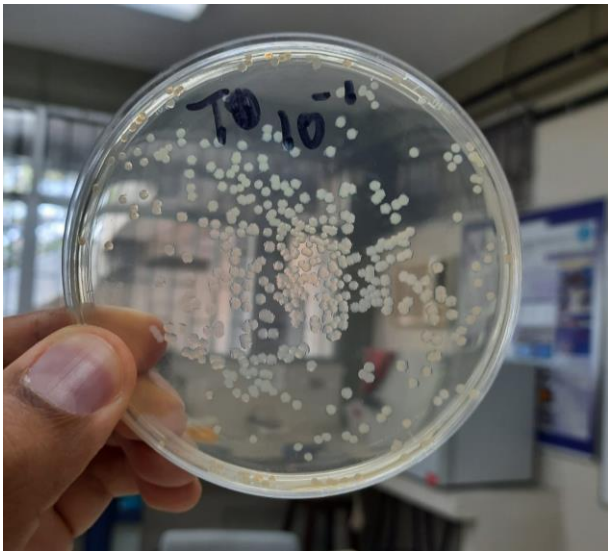
ANEXOS



Siembra de 50ul de las soluciones a ensayar en agar TSA, TCBS, MacConkey y Sabouraud.



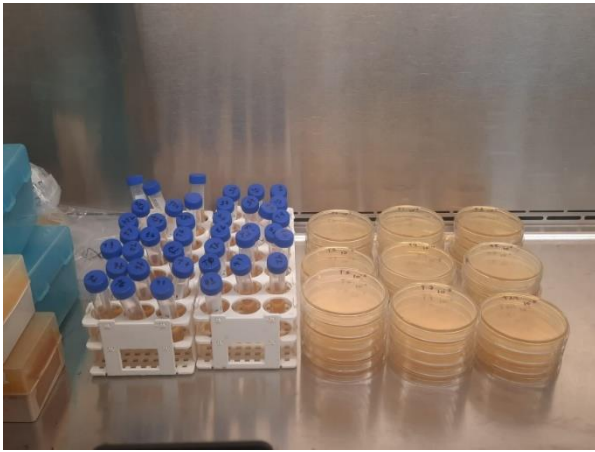
Dosis de las soluciones extrapoladas y preparadas en 250 ml.



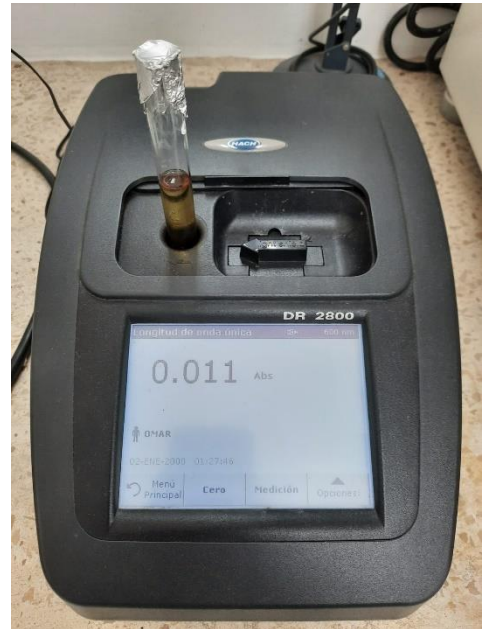
Vibrio parahaemolyticus en tiempo 0 (siembra de 10-1)



Conteo de colonias de *Vibrio parahaemolyticus*



Preparación de materiales y reactivos para curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*



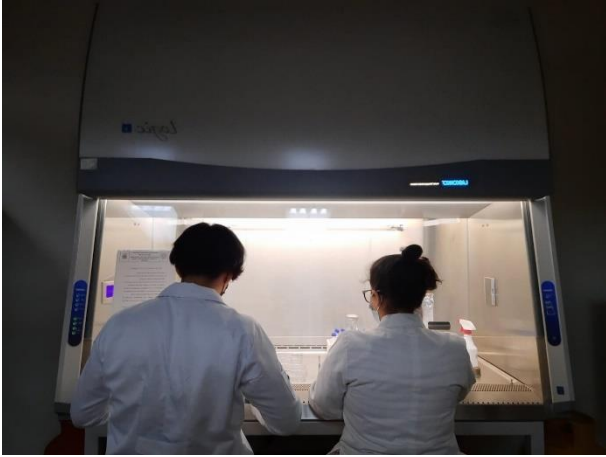
Lectura espectrofotométrica del caldo TSB inoculado con bacteria para control del aumento



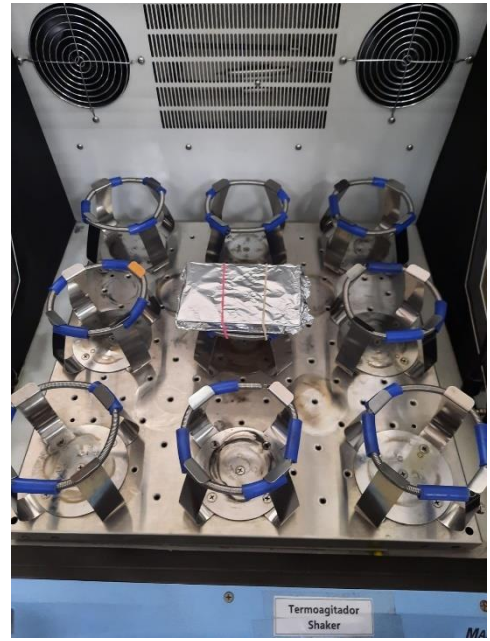
Preparación de la diluciones para curva de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*



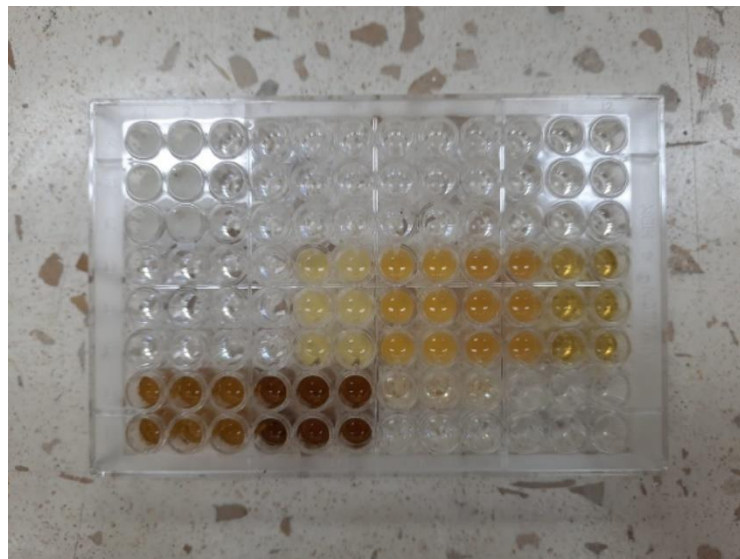
Siembra de las diluciones en caja Petri rotulada



Preparación de la placa con las soluciones ensayadas y el *Vibrio parahaemolyticus*



Incubación de la placa en termoshaker a 150 rpm



Microplaca completa y lista para lectura.