

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Evaluación de tratamientos para reducción de *Vibrio* en piscinas camaroneras por medio de pruebas microbiológicas.

INGE -2215

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingenieros en Alimentos

Presentado por:

Emily Denisse Loor Intriago

Emilio José Plaza Alava

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

El presente proyecto va dedicado principalmente a Dios, por ser mi guía a lo largo de mi vida, permitiéndome estar donde estoy y encaminarme a donde quiero llegar.

A mis padres, Herlinda Intriago y Fernando Loor, por siempre ser mi apoyo en cada etapa y por enseñarme con el ejemplo los frutos de la perseverancia.

A mis hermanos Karin y Andrés, por ser mi apoyo incondicional, e inspiración para ser mejor cada día y lograr mis metas y aspiraciones.

A mi abuelita Mariana García, por todo su amor, dedicación y soporte brindado en vida, y por acompañar siempre mis pasos desde el cielo.

Emily Loor.

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a Dios por ser mi guía para poder culminar mi formación universitaria.

A mis padres, José Plaza y Olga Alava, quienes fueron mi principal apoyo a lo largo de mi carrera universitaria, a pesar de los tropiezos que pude tener ellos me acompañaron y guiaron en todo momento.

A mis hermanos Sofia y Elian, quienes día a día me ayudaron con sus consejos.

A mi abuelita Piedad, quien estuvo pendiente de mí y me motivaba a seguir adelante.

Emilio Plaza.

Agradecimientos

Mis agradecimientos van dirigidos a Dios por la fortaleza y sabiduría brindada durante mi vida universitaria.

A mi familia por su apoyo incondicional y demostración de orgullo por cada uno de mis logros.

A los técnicos y al Doctor del laboratorio de microbiología del IPIAP por siempre estar puestos a ayudarnos y brindarnos sus conocimientos durante la realización del proyecto.

A mi compañero de tesis Emilio Plaza, por el apoyo y soporte en la realización de este trabajo.

A los amigos que la universidad me dio, por hacer de mi vida universitaria una bonita y memorable experiencia.

Emily Loor.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por ser mi guía a lo largo de este camino, por cuidarme y permitirme compartir este logro con mi familia.

A los técnicos y el Doctor del laboratorio de microbiología del IPIAP, quienes nos brindaron su apoyo en todo momento durante la realización de este proyecto.

A mis amigos y mi compañera de tesis Emily Loor, con quienes compartí muy buenos recuerdos a lo largo de mi carrera universitaria.

Emilio Plaza.

Declaración Expresa

Nosotros, Emily Denisse Loor Intriago y Emilio José Plaza Alava, acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

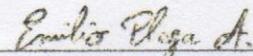
En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 5 de febrero de 2024.



Emily Denisse Loor

Intriago



Emilio José Plaza Alava

Evaluadores

Andrea Ortega, MSc.

Profesor de Materia

Patricio Cáceres, PhD.

Tutor de proyecto

Resumen

La exportación camaronera representa grandes ingresos económicos en el Ecuador, sin embargo, se ha visto afectada por la detección de microorganismo como el *Vibrio* en producto exportado hacia puertos de la Unión Europea, causando la destrucción total de toneladas de producto y grandes pérdidas económicas para el país. De tal forma, el objetivo del presente trabajo es evaluar la eficacia de tratamientos con ácidos orgánicos para la reducción de la población de *Vibrio* en piscinas camaroneras, por medio de pruebas microbiológicas y de biología molecular. Se evaluó la efectividad los ácidos orgánicos frente al crecimiento poblacional de *Vibrio* en muestras de agua de piscinas camaroneras y el efecto de la temperatura a 25°C y 35°C, mediante la técnica de conteo en placa en agar TCBS y verificación mediante PCR. Se obtuvo el porcentaje de efectividad, de 27, 26 y 21% para el ácido fórmico, láctico y cítrico, respectivamente, concluyendo que el ácido fórmico es el más efectivo, que la temperatura posee un efecto en los tratamientos al reducir su efectividad a valores más elevados, y por último que el ácido que representa una mejor opción es el ácido láctico en base a su efectividad y viabilidad economía de aplicación

Abstract

Shrimp exports represent great economic income in Ecuador; however, it has been affected by the detection of microorganisms such as Vibrio in products exported to ports in the European Union, causing the destruction of tons of product and great economic losses for the country. Therefore, the objective of the present work is to evaluate the effectiveness of treatments with organic acids for the reduction of Vibrio population in shrimp ponds, through microbiological and molecular biology tests. The effectiveness of organic acids against Vibrio population growth in shrimp pond water samples and the effect of temperature at 25°C and 35°C were evaluated through the plate counting technique on TCBS agar and verification by PCR. The effectiveness percentages of 27, 26 and 21% were obtained for formic, lactic, and citric acid, respectively, concluding that formic acid is the most effective, that temperature has an effect on the treatments by reducing their effectiveness to higher values, and finally that the acid that represents the best option is lactic acid based on its effectiveness and feasibility and economy of application.

Keywords: *Vibrio spp.*, shrimp pool, organic acids, microbiological test, PCR.

Índice general

Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	V
Simbología	VI
Índice de figuras	VII
Índice de tablas.....	VII
Capítulo 1	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Descripción del problema.....	2
1.3 Justificación del problema.....	3
1.4 Objetivos	4
1.4.1 Objetivo general	4
1.4.2 Objetivos específicos.....	4
1.5 Marco teórico	4
1.5.1 Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>).....	4
1.5.2 Vibriosis en camarones	5
1.5.3 Ácidos orgánicos	7
1.5.4 PCR.....	9
Capítulo 2	11
2.1 Metodología.....	11
2.1.1 Diseño de experimento.....	11
2.1.2 Recolección y transporte de muestras	13

2.1.3 Preparación de medio de cultivo.....	14
2.1.4 Acidificación de tratamientos.....	14
2.1.5 Control de temperatura y pH.....	15
2.1.6 Análisis microbiológico.....	15
2.1.7 Análisis por PCR.....	16
2.1.8 Análisis estadístico.....	16
2.1.9 Estimación de costos.....	16
Capítulo 3.....	17
3.1 Resultados y análisis.....	17
3.1.1 Análisis microbiológico.....	17
3.1.2 Resultados PCR.....	22
3.1.3 Análisis estadístico.....	23
3.1.4 Estimación de costos.....	23
Capítulo 4.....	26
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	26
4.1.1 Conclusiones.....	26
4.1.2 Recomendaciones.....	27
Referencias.....	28
Apéndice A.....	33

Abreviaturas

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
UE	Unión Europea
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
TSA	Tripteína Soya Agar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
UFC	Unidades formadoras de colonia
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización

Simbología

mg	Miligramo
g	Gramos
C	Carbono
H	Hidrógeno
O	Oxígeno
pH	Potencial de Hidrógeno
m ³	Metro cúbico
μl	Microlitro
pKa	Constante de disociación ácida
mL	Mililitros

Índice de figuras

Figura 2.1	11
Figura 2.2	12
Figura 2.3	13
Figura 3.1	18
Figura 3.2	18
Figura 3.3	19
Figura 3.4	19
Figura 3.5	20
Figura 3.6	20
Figura 3.7	21
Figura 3.8	22
Figura 3.9	23

Índice de tablas

Tabla 1.1	8
Tabla 2.1	12
Tabla 3.1	17
Tabla 3.2	24
Tabla 3.3	25
Tabla 3.4	25
Tabla 7	33

Capítulo 1

1.1 Introducción

La acuicultura del camarón es una industria de suma importancia en la economía nacional, la transición de sistemas extensivos hacia los intensivos permitió a los productores de este sector una gran generación de biomasa en cortos tiempos (Camacho et al., 2020). En Ecuador la industria del camarón tuvo sus inicios a finales de la década de los años 60, siendo actualmente la segunda actividad que genera ingresos por exportaciones, solo por debajo de la actividad petrolera (Rivera, 2018). Entre los principales compradores de nuestro producto tenemos a China, Estados Unidos, Rusia y la Unión Europea (Gonzabay et al., 2021).

Para tener una idea de la importancia que tiene el sector camaronero en nuestro país, en el año 2020 se obtuvieron 570 000 toneladas métricas de camarón y a esto debemos añadirle que cerca del 40% de las exportaciones que realiza el país se relacionan con esta industria, por este motivo es uno de los sectores que mayor aporta a la economía interna. En la actualidad existen aproximadamente 210 000 hectáreas que se destinan para la siembra y cosecha del camarón, de las cuales el 60% de dichas hectáreas se encuentran en la provincia del Guayas, y el resto de las hectáreas se encuentran distribuidas entre las provincias de El Oro, Esmeraldas, Manabí y Santa Elena (Gonzabay et al., 2021).

Históricamente una de las mayores preocupaciones en el sector camaronero ha sido la incidencia de infecciones por virus y bacterias, debido a que estos forman parte de la flora natural de ambientes marinos salados y cálidos siendo el agua de las piscinas camaroneras un medio para su proliferación (CDC, 2023), y; de estas bacterias; las que pertenecen al género *Vibrio* son las responsables de enfermedades como: septicemia bacteriana, necrosis de apéndices,

y la vibriosis, una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa a nivel global (Chandrakala, 2017).

Cabe recalcar que en muchos países ya está prohibido el uso de antibióticos en camarones debido a sus repercusiones negativas en la salud del ser humano, además de evitar otorgarles resistencia bacteriana a dichos antibióticos (Amatul et al., 2020), por lo que se analiza el uso de compuestos orgánicos como una alternativa. Por lo antes expuesto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la eficacia de tratamientos con ácidos orgánicos para la reducción de la población de *Vibrio* en piscinas camaroneras.

1.2 Descripción del problema

La actividad camaronera se encuentra influenciada por diversos factores ambientales que causan un impacto directo en la misma. Durante las primeras etapas de producción del camarón, la siembra y cosecha en piscinas acondicionadas, es fundamental el control de parámetros como: temperatura, pH, salinidad, entre otros, que garanticen un buen desarrollo de las larvas y un producto final de calidad.

En este último trimestre del 2023 se prevé presenciar los efectos del Fenómeno del Niño en el Ecuador, efectuando el incremento de la temperatura superficial de aguas costeras, al presentar la mayor anomalía de la temperatura superficial del mar en la costa norte de Perú y sur de Ecuador con un incremento de 2.5 °C (INOCAR, 2023). Dicho incremento de temperatura se presta como condición favorable para el desarrollo de bacterias del género *Vibrio* en el medio acuático, y por consecuente aumento de la probabilidad de presencia del microorganismo en el producto exportado.

La detección de *Vibrio* en el producto se convierte en el desencadenante del rechazo de toneladas de camarón en puertos internacionales, específicamente aquellos pertenecientes a la Unión Europea (UE), cuyo límite máximo permisible es Ausencia/ 25g de muestra (RASFF,

2022). A pesar de los requisitos exigidos por la UE, como alternativa para la aceptación e ingreso del producto contaminado con *Vibrio*, esta propone a los exportadores acciones que aseguren su eliminación como:

- Cocción del camarón
- Transformación del producto a harina
- Destrucción total mediante incineración

No obstante, frente a esta problemática, la Subsecretaría de Calidad e Inocuidad del Ecuador, autoridad sanitaria de productos acuícolas de exportación, se encuentra en búsqueda de una solución basada en la reducción de la población de *Vibrio* desde las primeras etapas del proceso para evitar pérdidas económicas por reproceso o desecho del producto.

1.3 Justificación del problema

La exportación del camarón ecuatoriano se ha convertido en una de las actividades económica más representativa del país. En este 2023, se produjo la superación de ingresos económicos por exportación camaronera frente a la del sector petrolero, registrando \$ 4.396 millones de exportaciones de enero a julio, traducidos en \$ 314 millones más que el crudo en el mismo periodo (CAMA E, 2023).

Si bien es cierto, el país posee una ventaja frente a otros productores, permitiéndole convertirse en uno de los principales exportadores de camarón, que surge a partir de las condiciones climáticas del país que promueve una producción ininterrumpida, de tres o cuatro ciclos anuales de cosecha, con una supervivencia del 65% por hectárea cultivada, duplicando sus lotes de producción frente a sus competidores internacionales como los países asiáticos (Gonzabay *et al.*, 2021). Sin embargo, esta actividad se ve afectada debido a la presencia de microorganismos, principalmente del género *Vibrio*, responsable de enfermedades en el camarón y de rechazos en puertos internacionales de la UE.

Una práctica comúnmente empleada para la prevención de presencia de este microorganismo en el camarón es el empleo de antibióticos como la oxitetraciclina, florfenicol y norfloxacin (Aguirre *et al.*, 2021), a pesar de ello, se trata de una práctica insostenible al comprobarse un desarrollo en la resistencia bacteriana y a su vez daño en ecosistemas de tipo acuático, siendo rechazada por la UE. De tal forma, la aplicación de ácidos orgánicos como medida alternativa frente a enfermedades se convierte en una opción más sustentable.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de tratamientos con ácidos orgánicos para la reducción de la población de *Vibrio* en piscinas camaroneras, por medio de pruebas microbiológicas y de biología molecular.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el ácido orgánico que presenta mejor eficacia por medio de análisis de pruebas microbiológicas selectivas y PCR.
2. Evaluar el efecto de diferentes temperaturas en los tratamientos aplicados por medio de análisis de pruebas microbiológicas.
3. Estimar el costo de aplicación del ácido orgánico más eficaz a escala real mediante la relación de ácido empleado a nivel de laboratorio.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

La costa ecuatoriana cuenta con condiciones climáticas muy favorables para el desarrollo de la industria del camarón, entre las dos principales especies que se producen en el país tenemos: el camarón *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus stylirostris*, siendo el primero el que

mayor presencia tiene en el país debido a que el *Litopenaeus stylirostris* comúnmente llamado camarón azul solo ocupa el 5% de la producción total (Rivera, 2018).

El camarón *Litopenaeus vannamei* recibe el nombre común de camarón blanco del Pacífico o camarón patiblanco, posee un color blanco-amarillento y puede alcanzar los 25 centímetros de longitud (Rivera, 2018). Su hábitad natural se extiende por gran parte de la costa oeste del continente americano, desde California en México hasta llegar a Perú. En estado silvestre pasan su etapa adulta y de reproducción en mar abierto, mientras que la etapa juvenil ocurre cerca de las costas, generalmente en estuarios, manglares y lagunas costeras. La madurez sexual la consiguen luego de 6 a 7 meses y los machos maduran cuando logran un peso cercano a los 20 gramos, mientras que las hembras cuando alcanzan los 28 gramos (Ponce & Mejía, 2022). Cuando se encuentran en su primer estadio larvario, llamado nauplio, no requieren de comida ya que se alimentan de su reserva embrionaria, pero una vez que pasan a las siguientes etapas su alimentación se basa en fitoplancton y zooplancton, y finalmente en la etapa de post larvas cambian a pequeños crustáceos, detritos, gusanos y bivalvos (Beltrán & Vega, 2022).

Esta especie presenta mejores resultados productivos comparados con otros debido a factores como: su ritmo de crecimiento, menores requerimientos de proteína, resistencia a cambios bruscos de factores ambientales como niveles bajos de oxígeno y salinidad, y finalmente posee una alta supervivencia cuando se encuentra en etapa larval. Todas estas características positivas lo vuelven una excelente opción al momento de la crianza en piscinas y es por esto que su crianza se ha popularizado a nivel mundial (Tizol et al., 2004).

1.5.2 Vibriosis en camarones

El cultivo de camarón en piscinas se ve afectado constantemente por enfermedades bacterianas que deterioran su valor comercial y por ende disminuyen la rentabilidad económica de este cultivo. Las especies del género *Vibrio* se encuentran de forma natural en el medio marino, coexistiendo con los animales que se crían en los sistemas de cultivos, donde pueden

llegar a colonizar las branquias, tracto intestinal y cutícula del huésped. Son patógenos oportunistas ya que atacan cuando los factores ambientales son favorables para estas bacterias, también cuando los mecanismos de defensa del huésped están suprimidos o cuando el huésped se encuentra estresado por factores ambientales como deficiente calidad de agua, elevadas densidades de población, temperatura del agua muy alta, poco oxígeno disuelto y poco recambio de agua (Peña, 2019).

La vibriosis es una enfermedad que se genera por bacterias gram negativas del género *Vibrio* y es responsable de grandes pérdidas en el sector acuícola a nivel mundial, ya que la mortalidad de las enfermedades que ocasionan puede llegar hasta el 95% en algunos casos (Peña, 2019). En el continente americano es la tercera enfermedad de mayor importancia sanitaria solo después de la enfermedad de la mancha blanca y el síndrome de Taura. Comúnmente los huéspedes de esta enfermedad son susceptibles a adquirir la bacteria en etapas de larva, aunque los vibrios son capaces de infectar a los camarones en sus diferentes etapas de desarrollo (Serrano, 2014).

Los camarones enfermos por vibriosis se los puede identificar porque presentan los siguientes síntomas: de forma externa se pueden observar el cambio de color en las branquias a tonos rojos o marrones, enrojecimiento del cuerpo, aletargamiento, disminución de la alimentación y nadan de forma errática ya sea cerca de los bordes o la superficie, pérdida de patas y además de lesiones características que se forman en la cutícula de color marrón o negras. Mientras que, de forma interna se observa una musculatura blanda, infección del hepatopáncreas y hemolinfa, incluso en algunos casos septicemia generalizada (Peña, 2019).

Todas estas enfermedades de origen bacteriano y vírico han provocado el uso desmedido de antibióticos en el sector acuícola, afectando no solo a los animales de crianza sino también al medio ambiente, al ser humano y además de evitar la aparición de bacterias con resistencia; en

respuesta a esto muchos países han endurecido sus leyes con respecto al uso de estos antibióticos llegando incluso a prohibirlos (Keong et al., 2015).

1.5.3 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos químicos cuya estructura se basa en una cadena hidrocarbonada junto a un grupo -COOH. La forma de obtención de estos compuestos se da, por medio de síntesis química o procesos fermentativos llevado a cabo por bacterias. Son empleados en la industria de los alimentos como aditivos, cuyas funciones van desde agentes de transformación, antioxidantes o conservantes.

1.5.3.1 Estabilidad, solubilidad y disociación de ácidos orgánicos

Este tipo de compuestos orgánicos se caracterizan por su estabilidad frente a cambios de temperatura, pH, presencia de luz y su eficacia se mantiene en presencia de materia orgánica (López, 2010). El grupo -COOH presente en su estructura les otorga el carácter polar al integrar puentes de H entre el agua y la molécula del ácido orgánico. A su vez, su solubilidad es dependiente del número de carbonos presentes en su cadena, a mayor número de carbonos esta se ve reducida considerablemente (Agurto, 2015).

Al establecer si un ácido es fuerte o débil, se toma en cuenta su capacidad de disociación en soluciones acuosas, siendo la disociación de un ácido la capacidad de liberar H^+ al medio. Con el valor pKa, es decir, el pH al cual un 50% del ácido está disociado (Agurto, 2015), es posible denominar fuertes a aquellos cuyos valores de pKa son menores y débiles a aquellos con valores de pKa mayores. En el caso de los ácidos orgánicos, estos son generalmente ácidos débiles incapaces de disociación completa en el agua (FISHER, 2023).

Algunos de los ácidos orgánicos comúnmente utilizados en la industria son:

Tabla 1.1

Ácidos orgánicos empleados en la industria alimentaria

Ácido	Fórmula	pKa	Función
Propiónico	CH ₃ CH ₂ COOH	4.88	Bactericida, fungicida
Fórmico	HCOOH	3.75	Conservante
Acético	CH ₃ COOH	4.76	Conservante
Sorbico	CH ₃ CH:CHCH:CHCOOH	4.76	Fungicida
Láctico	CH ₃ CH:CHCH:CHCOOH	3.83	Acidulante, Biocida
Cítrico	(HOOCCH ₂) ₂ C(OH)COOH	3.12	Conservante, antioxidante

Nota. Adaptado de: Isaza et al. (2019).

1.5.3.2 Método de acción de ácidos orgánicos como antimicrobiano

El empleo de ácidos orgánicos como antimicrobiano en la industria camaronera se da principalmente a través de la inclusión de estos en piensos alimenticios. El método de acción de dichos ácidos parte de su capacidad de disociación en agua, siendo aquellos que se presentan valores de pKa más elevados los que poseen el mayor efecto antimicrobiano. Al presentarse en su forma no disociada, se incrementa la cantidad de ácidos libres capaces de ingresar a la célula bacteriana por difusión simple, causando alteración en su estructura y posterior muerte celular.

Según estudio realizado por Silva, Jiménez, Vivas, Mayer & Figueredo (2021), en el cual se evaluó el uso de ácidos orgánicos en larvicultura comercial de camarón blanco, se evidenció la inhibición de crecimiento de *Vibrio harveyi* a partir de una concentración de 500 ppm en presencia de ácido láctico al 85% (Silva et al., 2021). A su vez, a partir de la aplicación de ácido fórmico y ácido láctico, a concentraciones de 500 ppm y 200 ppm, respectivamente, se obtuvieron resultados favorables para la inhibición de *Vibrio vulnificus*.

Por otro lado, a partir del estudio de Adams & Boopathy (2013) referente a la aplicación de ácido fórmico para control de vibriosis en camarón, se registró la inhibición total del

crecimiento de las distintas especies del género *Vibrio*, a una concentración aplicada de 0.05% de este ácido, concluyendo que podría usarse en una granja de acuicultura para controlar la infección por *Vibrio*, ya sea como desinfectante o como suplemento prebiótico para el camarón (Adams & Boopathy, 2013).

1.5.4 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, denominada PCR, se trata de una técnica de biología molecular basada en la amplificación de ácidos nucleicos a partir de una pequeña muestra de ADN. Esta técnica es ampliamente usada para la identificación de microorganismos, caracterizada por su sensibilidad y rapidez, basándose en el principio de replicación del ADN en las células, en donde la enzima polimerasa genera una copia complementaria a la hebra de ADN parental a partir de trifosfato desoxirribonucleótido (dNTPs) en solución (Armendáriz y Barreiro, 2013).

El proceso de amplificación de ácidos nucleicos consta de tres etapas:

1. Desnaturalización del ADN: Se somete el extracto de ADN a una temperatura de 95 °C durante 30 segundos. En esta etapa ocurre la ruptura de los puentes de hidrógeno, separando ambas cadenas que componen al ADN, convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla.
2. Hibridación: En un rango de temperatura de 50 a 60 °C, se alinean al extremo 3' los cebadores (Campaña, 2018), uniéndose a las cadenas de ADN a amplificar.
3. Extensión: El ADN polimerasa se encarga de sintetizar para las cadenas moldes una cadena de ADN complementaria. Las cadenas sintetizadas cumplen la función de molde para ser utilizadas en el ciclo posterior. Los ciclos se repiten

entre 20 y 45 veces hasta que resulta en una acumulación exponencial del fragmento de ADN amplificado (Perera y Acebedo, 2018)

Capítulo 2

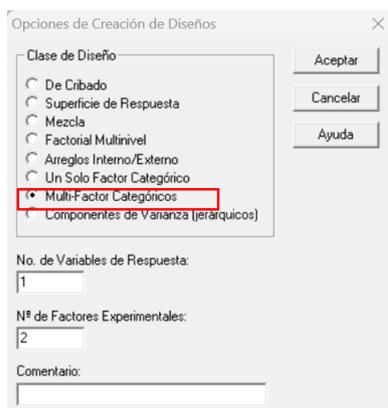
2.1 Metodología

2.1.1 Diseño de experimento

Para la obtención del diseño experimental se empleó el software estadístico STATGRAPHICS Centurion 18. Considerando las características de los datos a emplear, se optó por un diseño de tipo Multifactorial categórico, compuesto por 2 factores y 1 variable de respuesta, tal y como se presenta en la Figura 2.1.

Figura 2.1

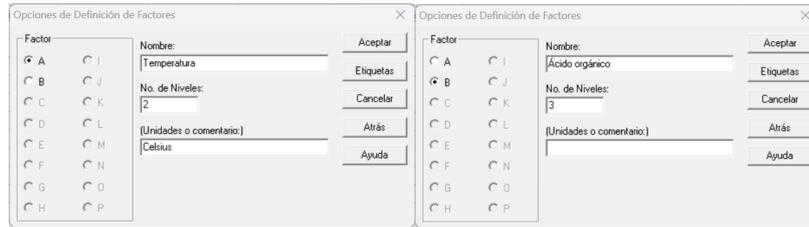
Condiciones definidas para el diseño experimental



Con respecto a la definición de los factores, tanto de Temperatura, como de Tipo de ácido, se establecieron los números de niveles por cada variable, presentadas en la Figura 2.2 , procediendo a ingresar los valores de los niveles según lo detallado en la Tabla 2.1.

Figura 2.2

Definición de factores y número de niveles para el diseño experimental

**Tabla 2.1**

Factores experimentales y sus respectivos niveles

Factor	Niveles
Temperatura	25 ° C 35 ° C
Ácido orgánico	Láctico Fórmico Cítrico

Como variable respuesta se estableció al crecimiento poblacional de *Vibrio*, representado por las UFC/mL obtenidos por cada muestra analizada, para finalmente adquirir la tabla de diseño experimental presentada en la Figura 2.3, en la cual se contemplan los posibles 6 tratamientos y su réplica, sin aleatorizar, para la posterior ejecución del experimento.

Figura 2.3

Tabla de diseño experimental obtenida en STATGRAPHICS Centurion 18

	BLOQUE	Temperatura	Ácido orgánico	Crecimiento Vibrio	Col_5	Col_6	Col_7	Col_8	Col_9
	Tratamiento	Celsius	Tipo	UFC/ml					
1	1	25	Fórmico				Número	Número	Número
2	2	25	Láctico						
3	3	25	Cítrico						
4	4	35	Fórmico						
5	5	35	Láctico						
6	6	35	Cítrico						
7	7	25	Fórmico						
8	8	25	Láctico						
9	9	25	Cítrico						
10	10	35	Fórmico						
11	11	35	Láctico						
12	12	35	Cítrico						
13									
14									
15									

2.1.2 Recolección y transporte de muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas de piscinas camaroneras ubicadas en el sector Churute, provincia del Guayas, localizada a 1 hora 5 minutos aproximadamente del laboratorio en donde se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes. Las piscinas seleccionadas fueron aquellas que presentan problemas por la presencia de *Vibrio*, permitiendo de tal manera la ejecución de una experimentación más confiable.

La recolección y transporte de muestras de agua de piscinas camaroneras fue llevada a cabo conforme a las directrices especificadas en las normas NTE INEN 2176:2013 AGUA. MUESTREO PARA EXAMEN MICROBIOLÓGICO y la NTE INEN 2169:2013 AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS, con el uso de envases estériles y un contenedor para mantener las muestras a temperaturas de entre 2°C a 5 °C durante el transporte.

Al tratarse de muestras ambientales, se empleó la metodología descrita en Suárez *et al.* (2015) tomando el agua en dos puntos de la piscina, la entrada y centro de esta, mediante la inmersión a 20 cm de los envases estériles.

2.1.3 Preparación de medio de cultivo

Para la inoculación bacteriana se empleó el medio de cultivo selectivo Agar TCBS (Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa). La preparación se realizó siguiendo la relación indicada por el proveedor, siendo ésta la suspensión de 88g de polvo en 1 litro de agua purificada. Posteriormente, fue sometido a agitación y calentamiento hasta ebullición, enfriamiento y vertido en las placas Petri de plástico estériles.

2.1.4 Acidificación de tratamientos

Como primer paso se estableció el valor de pH objetivo en 6,7 para todos los ácidos empleados en los 12 tratamientos por cada muestra de agua de piscina, esto de acuerdo con el pH mínimo que pueden tolerar los camarones para su crecimiento adecuado en las piscinas (Skretting, 2020).

Los ácidos utilizados se encontraban en altas concentraciones (ácido fórmico al 88%, ácido láctico al 85% y ácido cítrico al 100%) por lo que fue necesario hacer diluciones con agua destilada de cada uno de los ácidos hasta lograr una concentración final de 30%, por medio de la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (2. 1)$$

Las diluciones se realizaron en la campana de extracción para evitar el contacto con los gases generados de los ácidos concentrados. Por cada ácido se preparó 100 mL de dilución en botellas de vidrio de 500 mL. A continuación, para saber la cantidad de ácido necesario para lograr el pH de 6,7 en cada tratamiento se procedió a dosificar poco a poco la dilución de ácido.

2.1.5 Control de temperatura y pH

El control de ambos parámetros se realizó en 3 tiempos 0, 24 y 48 horas, y se llevó a cabo con la ayuda de un pHmetro que mostraba el valor tanto de pH como de temperatura cada vez que se realizaba la medición respectiva.

Cabe mencionar que los 12 tratamientos que hubo por cada muestra de agua se mantuvieron dentro de incubadoras para poder controlar la temperatura, de los cuales 6 tratamientos se mantuvieron en una incubadora a 35 °C mientras que los 6 tratamientos restantes se colocaron en otra incubadora a 25 °C.

Por medio de la medición de la temperatura se verificó que los tratamientos se encontraban a la temperatura adecuada y que no hubo diferencias significativas entre ellos dentro de las incubadoras. Por otra parte, la medición de pH permitió registrar cambios en los tratamientos conforme transcurría el tiempo desde la acidificación inicial.

2.1.6 Análisis microbiológico

Se analizó la efectividad de los ácidos en los tratamientos a través de la técnica de conteo en placas Petri. Primero fue necesario realizar diluciones de cada tratamiento hasta llegar a 10^{-2} y 10^{-3} . Las diluciones se realizaron tomando 1 mL de cada tratamiento y colocando en tubos de ensayo con 9 mL de agua buffer fosfato de pH 7. Posteriormente se inoculó 200 µl en las placas Petri y se utilizó la técnica de esparcido en placa con ayuda de un asa triangular (Suárez et al, 2015).

A continuación, se colocaron las placas en una incubadora a 37 °C por 24 horas, transcurrido este tiempo se contaron las colonias y se realizó el cálculo tomando en cuenta las diluciones y la cantidad de microlitros inoculados para finalmente reportar los resultados como UFC/mL.

La efectividad de los ácidos orgánicos fue evaluada según su capacidad de reducción de la carga microbiana a las 48 horas de aplicado el tratamiento, siguiendo la ecuación propuesta por (Jemil et al., 2017):

$$\% \text{ Reducción microbiana} = \frac{N_i - N_f}{N_i} \times 100\% \quad (2.2)$$

Siendo:

N_i : Conteo crecimiento bacteriano (UFC/mL) en tiempo 0 horas.

N_f : Conteo crecimiento bacteriano (UFC/mL) en tiempo 48 horas.

2.1.7 Análisis por PCR

Para realizar el análisis por PCR se escogió entre las placas que se incubaron a 48 horas aquellas que presentaron los mejores resultados en cuanto a la combinación de variables temperatura y ácido. Por cada muestra de agua tomada se analizó 1 placa Petri por PCR.

2.1.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software STATGRAPHICS Centurion 18, obteniendo de tal forma el análisis de varianza ANOVA, para posterior determinación de la existencia de efecto significativo de cada factor y su interacción.

2.1.9 Estimación de costos

Se calculó el costo estimado en base a la relación de la cantidad de ácido orgánico empleado para alcanzar el pH de 6,7 deseado a escala de laboratorio en las muestras de 200 mL, siendo llevada a escala real de piscina camaronera.

Capítulo 3

3.1 Resultados y análisis

3.1.1 Análisis microbiológico

En la Tabla 3.1 se exponen los valores obtenidos del crecimiento de *Vibrio* en las muestras sometidas a los distintos tratamientos con ácidos orgánicos y temperaturas de 25°C y 35°C. Los valores descritos representan las medias aritméticas de los análisis llevados a cabo a las 12 muestras durante las cuatro semanas de estudio, detallados en Tabla 7 del Apéndice A, para posterior análisis estadístico.

Tabla 3.1

Media de crecimiento de *Vibrio* por tratamiento

Tratamiento	Crecimiento <i>Vibrio</i> [UFC/mL]		
	Tiempo		
	0	24	48
T1	1,53x10 ⁵	1,28 x10 ⁵	1,12 x10 ⁵
T2	1,40 x10 ⁵	1,21 x10 ⁵	1,03 x10 ⁵
T3	1,51 x10 ⁵	1,30 x10 ⁵	1,19 x10 ⁵
T4	1,56 x10 ⁵	1,36 x10 ⁵	1,20 x10 ⁵
T5	1,46 x10 ⁵	1,29 x10 ⁵	1,16 x10 ⁵
T6	1,49 x10 ⁵	1,35 x10 ⁵	1,24 x10 ⁵

En base lo tabulado en la Tabla 3.1, se obtuvo que la población inicial de *Vibrio* en las muestras de agua de piscina camaronera se encuentra en un rango de $1,4 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^5$ UFC/mL. La carga inicial de las muestras, reflejan condiciones favorables de las piscinas para el desarrollo de *Vibrio*, especialmente su pH, cuyo rango fue de 8,5 a 8,7, además de presencia de materia orgánica propia de las piscinas. Se conoce que estos microorganismos son los responsables de la descomposición de materia orgánica como azúcares, proteínas, celulosa, lignina, entre otros, de la cual obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo; la descomposición de dicha materia orgánica se encuentra influenciada por el pH y la temperatura, siendo mayor cuando estos se incrementan a niveles de 35°C y 8,5 respectivamente (Rodríguez & Sandoval, 2010).

Según Wardiyanto *et al.* (2019) la abundancia de bacterias del género *Vibrio* en acuicultura con una cantidad superior a 10^4 UFC/mL incrementa la incidencia de enfermedades como las de heces blancas, vibriosis y mortalidad masiva en camarones.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por ácido a los dos niveles de temperatura:

Figura 4.1

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido fórmico a 25°C

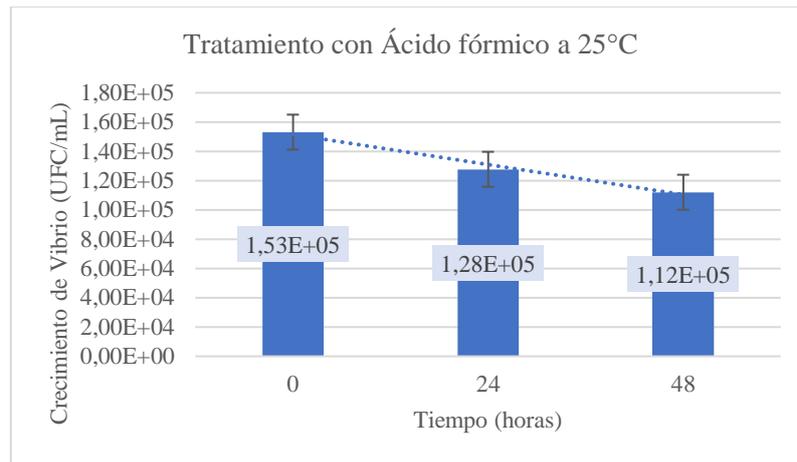
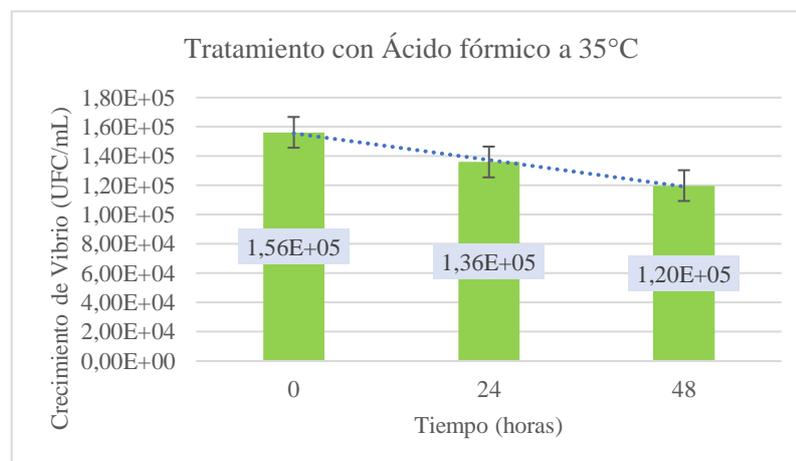


Figura 5.2

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido fórmico a 35°C



En las Figuras 3.1 y 3.2 se presenta el efecto del ácido fórmico frente al crecimiento de *Vibrio* durante intervalos de 0, 24 y 48 horas, en muestras expuestas a temperaturas de 25°C y 35°C, respectivamente. Pasadas las 24 horas, en muestras a 25 °C se obtuvo la disminución de la

carga microbiana inicial, pasando de $1,56 \times 10^5$ a $1,28 \times 10^5$ UFC/mL, siendo en menor magnitud pasada las 48 horas, en las que se alcanzó los $1,20 \times 10^5$ UFC/mL. Por otro lado, en aquellas muestras sometidas a la temperatura más alta, se logró una reducción con una carga inicial de $1,56 \times 10^5$ a $1,36 \times 10^5$ UFC/mL.

Figura 6.3

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido láctico a 25°C

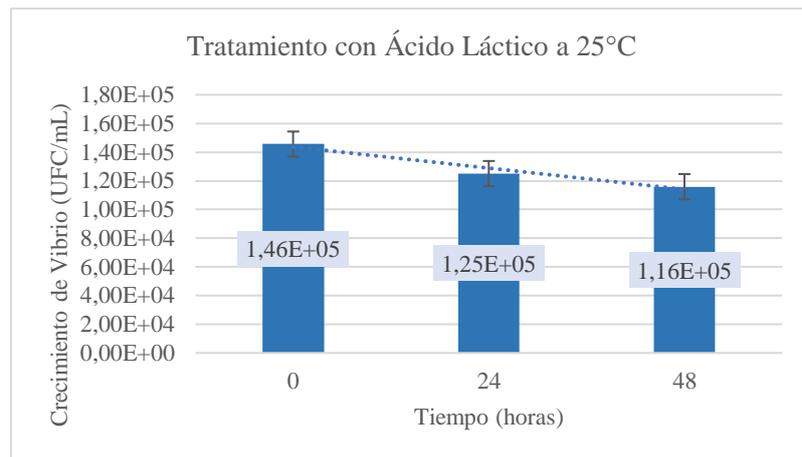
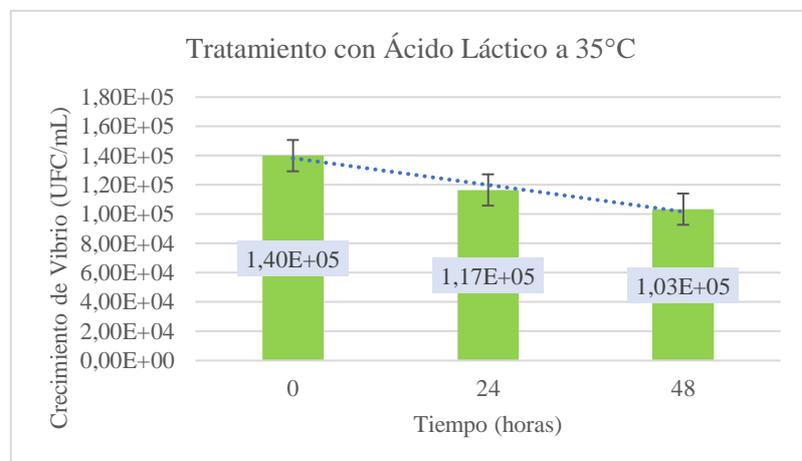


Figura 7.4

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido láctico a 35°C



Para las muestras sometidas a la acción del ácido láctico representadas en las figuras 3.3 y 3.4, a la menor temperatura se observó una carga inicial de $1,46 \times 10^5$ hasta alcanzar a las 24 horas las $1,25 \times 10^5$ UFC/mL, finalizando a las 48 horas con una carga de $1,16 \times 10^5$ UFC/mL. A

su vez, en los tratamientos llevados a cabo a 35 °C, la reducción fue menor en comparación de los otros tratamientos, iniciando con una población de $1,40 \times 10^5$ UFC/mL, obteniendo una reducción a las 48 horas de $1,03 \times 10^5$ UFC/mL

Figura 8.5

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido cítrico a 25°C

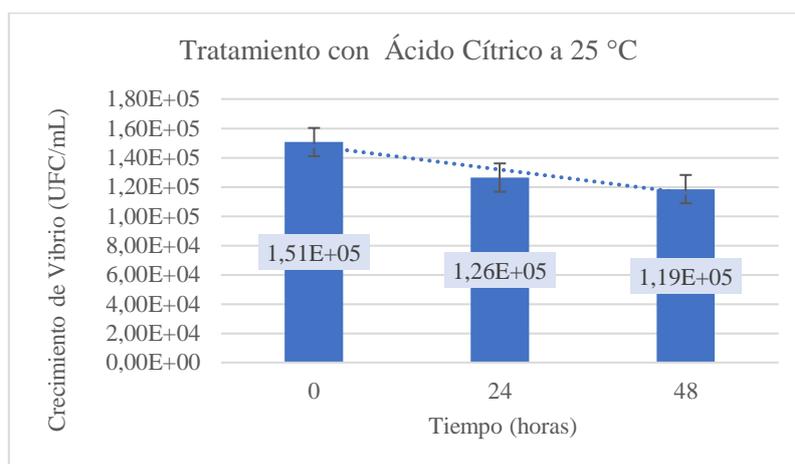
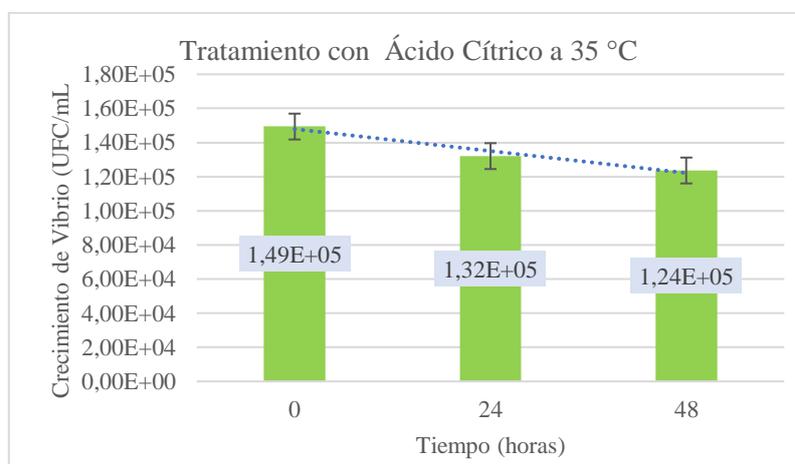


Figura 9.6

Crecimiento de Vibrio (UFC/mL) en tratamiento con ácido cítrico a 35°C

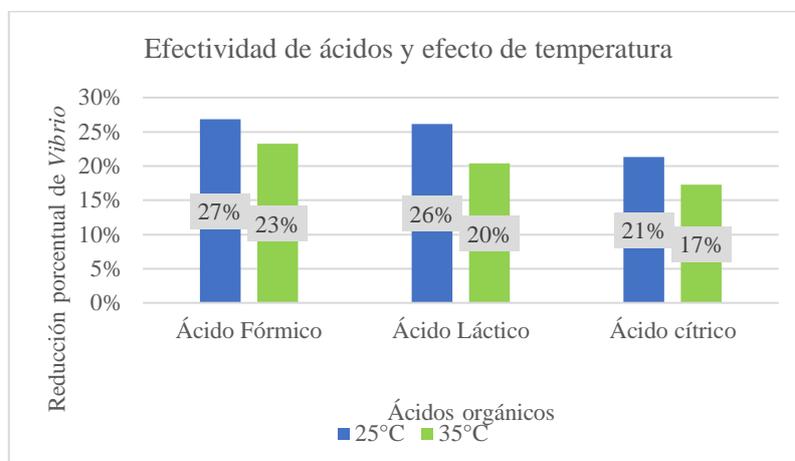


Con respecto al ácido cítrico, su efecto se evidenció con una reducción partiendo de $1,51 \times 10^5$ UFC/mL, hasta las $1,32 \times 10^5$ UFC/mL pasadas las 24 horas y finalmente $1,24 \times 10^5$ UFC/mL transcurridas las 48 horas luego de la aplicación del ácido y almacenadas a una temperatura de

25 °C. Para sus homologas a 35°C, la reducción poblacional se produjo partiendo de $1,49 \times 10^5$ UFC/mL hasta alcanzar los $1,24 \times 10^5$ UFC/mL a las 48 horas.

Figura 10.7

Efectividad de ácidos orgánicos en el crecimiento de *Vibrio* y el efecto de temperatura



A partir del análisis microbiológico, se obtuvo la eficacia de estos en base a la reducción de la población de *Vibrio* hasta las 48 horas, de tal forma se evidenció en la Figura 3.7, que aquel con mayor eficacia es el ácido fórmico con el 27% una temperatura de 25°C y de 23% a 35°C. Seguido por el ácido láctico con el 26% y por último el ácido cítrico con el 21%. La efectividad y efecto antimicrobiano de los ácidos radica en el valor de su constante de disociación pKa, mayores valores se traducen en mayor proporción del ácido en su forma no disociada, lo cual conlleva a la lisis celular. El mecanismo de acción se basa en que, al encontrarse en su forma no disociada, las moléculas del ácido atraviesan con facilidad las membranas de las células de bacterias Gram negativas. Una vez dentro de la célula, donde el pH es superior a su pKa, una considerable cantidad del ácido experimenta disociación, liberando iones de hidrógeno (H⁺). La célula microbiana, con el fin de expulsar estos iones de hidrógeno, requiere grandes cantidades de energía, lo que finalmente conduce al deterioro y muerte celular (DSM, 2018).

Por lo tanto, el ácido fórmico como el ácido láctico, al presentar valores similares de pKa poseen un porcentaje de efectividad aproximado, siendo el caso contrario al ácido cítrico cuyo

pKa es menor con un valor de 3,12. De tal forma, el orden de efectividad de los ácidos es el siguiente:

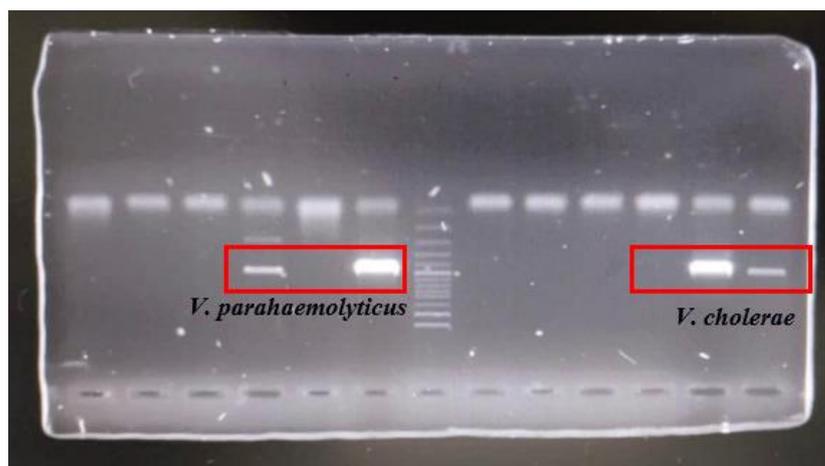
Acido fórmico > Ácido Láctico > Ácido Cítrico

A su vez, se puede evidenciar el efecto de la temperatura en los tratamientos, ya que todos presentaron una reducción de población de *Vibrio* menor a 35°C frente a aquellos a temperaturas de 25°C, indicando que existe un efecto directo de la temperatura en la efectividad de los tratamientos para la reducción del crecimiento de *Vibrio*. Según estudio realizado por Lopes (2020), se demostró que la temperatura presentó una correlación (0,44*), frente al crecimiento de *Vibrios*, particularmente *V. parahaemolyticus*. Esto puede ser justificado ya que, a mayores temperaturas, se produce una mayor disociación de los ácidos, reduciendo su efecto antimicrobiano y a su vez, las altas temperaturas favorecen al crecimiento del *Vibrio* pues este se desarrolla en condiciones óptimas de temperatura de 37°C.

3.1.2 Resultados PCR

Figura 11.8

Análisis PCR de muestras



En base al análisis PCR al que fueron sometidas las muestras con mejores resultados de reducción poblacional de *Vibrio*, se obtuvo la coincidencia con la banda patrón para *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*. Tal como indica Lopes (2020), a valores de pH altos en un rango de 8,8 a 9,25 y temperaturas de 27 a 28 °C influyen positivamente en el incremento de

bacterias sacarosa negativa como; *V. parahaemolyticus*, cuya concentración reportada en su estudio fue de $450,38 \pm 243,26$ UFC/mL.

3.1.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó tomando los valores de la tabla 3.1 a los cuales se le aplicó un análisis de varianza ANOVA por medio del software Statgraphics. Como se aprecia en la figura 3.9 se obtuvo para la variable temperatura un valor-P menor a 0,05 indicando así que representó un factor significativo en nuestro experimento. Pero no fue así para la variable ácido orgánico y la interacción de ambas variables que obtuvieron un valor-P mayor a 0,05.

Figura 12.9

Análisis de varianza ANOVA obtenido del software Statgraphics

Análisis de Varianza para Crecimiento Vibrio - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	2,1675E8	1	2,1675E8	6,33	0,0456
B:Ácido orgánico	2,64667E8	2	1,32333E8	3,86	0,0835
INTERACCIONES					
AB	2,6E7	2	1,3E7	0,38	0,6995
RESIDUOS	2,055E8	6	3,425E7		
TOTAL (CORREGIDO)	7,12917E8	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

3.1.4 Estimación de costos

Como primer paso para analizar los costos se procedió a calcular el volumen de dilución de ácido al 30% necesaria para un determinado volumen de muestra. Como podemos ver en la Tabla 3.2 se empezó por una escala a nivel de laboratorio, es decir se partió de los datos que se recolectaron durante la experimentación. Donde se obtuvo que, en promedio, por cada 200 mL de muestra de agua de piscina se necesitaron las siguientes cantidades de dilución de ácidos: 30 μ l de ácido fórmico, 40 μ l de ácido láctico y 70 μ l de ácido cítrico. De esta forma se pudo extrapolar los datos obtenidos a una escala de mililitros de dilución necesarios por cada m^3 de muestra y finalmente a una escala de litros de dilución necesarios por cada 1000 m^3 de muestra

donde se obtuvieron los siguientes resultados: 150 litros de ácido fórmico, 200 litros de ácido láctico y 350 litros de ácido cítrico.

Tabla 4.2

Cálculo de litros de dilución al 30% necesarios por cada 1000 m³ de muestra

Ácido orgánico	µl / 200 mL	mL/m ³	Litros/1000 m ³
Fórmico	30	150	150
Láctico	40	200	200
Cítrico	70	350	350

Para la segunda parte del análisis de costos fue preciso detallar el precio por litro de cada ácido orgánico concentrado y el precio por litro de agua destilada, con estos datos se pudo obtener cual sería el costo por litro de dilución al 30% por cada ácido. De esta forma junto con la cantidad de litros de dilución obtenidos de la Tabla 3.2 se calculó cual sería el costo de la aplicación de los ácidos orgánicos por cada 1000 m³ de muestra de agua de piscina. Como podemos ver en la tabla 3.3 el ácido cítrico fue el que presentó un menor costo de aplicación con \$920,50 seguido por el ácido láctico y por último se tuvo al ácido fórmico.

Tabla 5.3

Costo de implementación de cada ácido orgánico por cada 1000 m³ de muestra

	Ácido fórmico	Ácido láctico	Ácido cítrico
Precio por litro de ácido concentrado	\$77,08	\$13,44	\$7,10
Precio por litro de agua destilada	\$0,50	\$0,50	\$0,50
Costo por litro de dilución al 30%	\$26,78	\$5,24	\$2,63
Costo de aplicación por cada 1000 m ³	\$4016,59	\$1048,70	\$920,50

Finalmente, para determinar cuál sería la mejor solución se optó por realizar una tabla donde se tomaron en cuenta dos criterios: la efectividad de cada ácido para reducir la población de *Vibrio* y como segundo criterio su viabilidad económica. A cada uno de estos criterios se le colocó una ponderación con valores de 1 a 5, siendo 1 la peor nota y 5 la mejor nota. Se sumaron los valores dados a ambos criterios y a partir del total se concluyó que el ácido láctico sería la mejor solución por aplicar. Esto se decidió tomando en cuenta su efectividad para reducir la población de *Vibrio* con porcentajes de 26 y 20%, que son valores muy cercanos a los obtenidos con el ácido fórmico debido a su valor de pKa. Y también se tomó en cuenta su viabilidad económica, ya que es un ácido orgánico relativamente barato y de fácil acceso comercial.

Tabla 6.4

Ponderación de criterios para elección de solución con escala de 1 a 5.

	Ácido fórmico	Ácido láctico	Ácido cítrico
Efectividad en reducción de <i>Vibrio spp.</i>	3	2	1
Viabilidad económica	1	4	4
TOTAL	4	6	5

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

- Los resultados muestran una estrategia viable para reducir la presencia de *Vibrio* en camarón empleando ácidos orgánicos en las piscinas, sin embargo, se debe analizar el efecto sobre el desarrollo del camarón y sus características sensoriales.
- En base al análisis microbiológico, se concluyó que el ácido fórmico presentó la mejor efectividad en la reducción de la población de *Vibrio* con un porcentaje de 27% y 23% para las temperaturas de 25 °C y 35 °C respectivamente.
- Se evidenció que, a la temperatura de 35 °C, el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se reduce. Esta reducción de la efectividad estaría asociada a que se favorece el crecimiento de *Vibrio*, que se desarrollan de forma óptima a temperatura de 37°C.
- A partir del análisis de costos, se concluyó que el ácido láctico representa la opción más viable basados en dos criterios: su efectividad para reducir la población de *Vibrio* y su costo de aplicación.

4.1.2 Recomendaciones

- Se recomienda para un estudio futuro evaluar la eficacia de la combinación de ácidos orgánicos en muestras de agua de piscinas camaroneras.
- Se recomienda realizar una experimentación similar, pero con condiciones de experimentación de tipo bioensayo, donde se podrá contar con mayor cantidad de parámetros para el momento de evaluar los resultados.
- Se recomienda evaluar la efectividad de los ácidos orgánicos en etapas larvales de los camarones, ya que en estas etapas también se presentan enfermedades relacionadas con bacterias como *Vibrio spp.*
- Se recomienda el estudio del efecto del tratamiento en conjunto con la aplicación de métodos alternativos como plasma frío o altas presiones en el procesamiento del camarón.
- Se recomienda evaluar los cambios producidos en la calidad final del camarón al someterse a los tratamientos con ácidos orgánicos.

Referencias

- Adams, D., Boopathy, R. (2013). Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. *Biologia* 68 (6), 1017–1021. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0251-x>
- Aguirre, L., Sánchez, H., & Ordinola, A. (2021). Resistencia antibiótica en *Vibrio spp* aislados de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Alternativas de tratamiento con extractos de *Azadirachta indica* y *Origanum vulgare*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(4). <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i4.19386>
- Agurto, M. (2015). Uso de ácidos orgánicos en la dieta para el cultivo semiintensivo de camarón. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/56544>
- Amatul, Ali., Haryani, W., Mohd, N., Amal, M., Zamri, M. & Ina, Y. (2020). Ensayos de vacunación contra la vibriosis en camarones: una revisión. *Aquaculture Reports*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Armendáriz, I. & Barreiro, P. (2013). Detección de salmonella spp. mediante pcr en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/30795/1/D-79730.pdf>
- Beltrán, E. & Vega, S. (2022). *Evaluación in vivo de extractos de Acanthophora spicifera como alternativa ecosostenible para combatir la vibriosis en Penaeus Vannamei*. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral]

<https://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/56901/1/T-76842%20Beltr%c3%a1n-Vega.pdf>

Camacho, L., Álvarez, A. & Mejía, C. (2020). Nanopartículas de plata (AgNP) como antimicrobianos en el cultivo de camarón marino: una revisión. *Aquaculture Reports*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100512>

Cámara Marítima del Ecuador (CAMA E). (2023). Camarón destronó por primera vez al petróleo en este 2023 como primer producto de exportación con \$ 314 millones. <http://www.camae.org/camaron-2/camaron-destrono-por-primera-vez-al-petroleo-en-este-2023-como-primer-producto-de-exportacion-con-314-millones/>

Campaña, A. (2018). Identificación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus*, de interés agrobiotecnológico [Tesis de grado Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15698>.

Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2023). *Especies de la bacteria Vibrio que causan enfermedades*. <https://www.cdc.gov/vibrio/es/healthcare.html#:~:text=Las%20Vibrio%20son%20bacterias%20gramnegativas,r%C3%ADos%20de%20embocan%20en%20el%20mar.>

Chandrakala, N. & Priya, S. (2017) Vibriosis en la Acuicultura de Camarón, Una Revisión. *Revista Internacional de Investigación Científica en Ciencia, Ingeniería y Tecnología*, 3 (2), 27-33. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:216862193>

- DSM. (2018). Principios del uso de ácidos orgánicos en la nutrición animal. https://www.dsm.com/anh/es_ES/feedtalks/principles-organic-acids-animal-nutrition.html
- Gonzabay, A., Vite, H., Garzón, V. & Quizhpe, P. (2021). Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020. *Polo del Conocimiento*, Vol. 6, 1040-1058. 10.23857/pc.v6i9.3093
- INEN. (2013). NTE INEN 2176: Agua. Muestreo para examen microbiológico.
- INEN. (2013). NTE INEN 2169: Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras.
- Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada del Ecuador (INOCAR). (2023). Boletín técnico - ERFEN Nro. 09-2023. https://www.inocar.mil.ec/boletin/ERFEN/erfen_20230804.pdf
- Isaza, A., Mesa, N., & Narváez, W. (2019). Ácidos orgánicos, una alternativa en la nutrición avícola: una revisión. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(2), 45-58. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.14.2.4>
- Jemil, N., Ben, H., Manresa, A., Nasri, M., & Hmidet, N. (2017). Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1050-2>
- Keong, W., Boon, C., Yee, C. & Romano, N. (2015). Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. *Revista Aquaculture* 449, 69-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.006>

- Lopes, B. (2020). Análises bacteriológicas de Vibrios e exame presuntivo no camarao (*Litopenaeus vannamei*) cultivado em sistema semi-intensivo de baixa salinidade. [Tesis de grado Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil].
- Peña, L. (2019). *Vibriosis en camarón blanco del pacífico Penaeus vannamei, Reporte de caso*. [Tesis de grado Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá.] <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/2755>
- Ponce, D. & Mejía, D. (2022). *Análisis de la correlación entre el pH y el dióxido de cloro utilizado en el control de patógenos en postlarvas de camarón Penaeus vannamei*. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral] <https://dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/56892/1/T-76839%20Ponce-%20Mej%c3%ada.pdf>
- Perera, C. & Acevedo, A. (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, 40 (3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000300007
- Rivera, H. (2018). *Análisis de oferta y demanda del camarón en la provincia de El Oro y Ecuador en los últimos ocho años*. [Tesis de grado Universidad Técnica de Machala]. http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12221/1/DE00006_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf
- Rodriguez, N., & Sandoval, M. (2010). Caracterización de bacterias marinas presentes en suelos de piscinas camaroneras en tiempo de post-cosecha y pre-siembra luego de la preparación de suelo mediante el método de aplicación

- de fuentes de nitrógeno. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral] <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/20997/1/D-90436%20Rodr%c3%adguez%20Loaiza.pdf>
- Serrano, L. (2014). *Control Biológico de Patógenos de Camarón Mediante el Uso de Microorganismos Aislados de Muestras de Biol y Suelo de la Antártida*. [Tesis de grado Escuela Superior Politécnica del Litoral] <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/25086/1/D-76211%20Serrano%20Mena.pdf>
- Silva, J., Vivas, J., Jiménez, I., Mayer, L., & Figueredo, A. (2021). Algunas experiencias usando ácidos orgánicos para optimizar el desempeño de una larvicultura comercial de camarón blanco, *penaeus vannamei*. *El Acuicultor*, 1, 11-19. <https://svacuicultura.org/revista/el-acuicultor-enero-2021-vol-1-no-1/>
- Skretting. (2020). Guía de manejo de camarónicas. https://libreriaskretting.ec/admin/public/uploads/catalogos/guia_manejo_camarónicas.pdf
- Suárez, M., Medina, Z., Montiel, M., Ibarra, J. & Salcedo, A. (2015). Distribución de *Vibrio spp.* en agua y sedimento de estanques productores de camarón *Lipenaeus vannamei* cultivados con agua del lago de Maracaibo (Venezuela). *Revista científica REDALYC*, 25(4), 293-299. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95941173003>
- Tizol, R., Jaime, B., Laria, R., Pérez, L., Machado, R. & Silveira, R. (2004). Introducción en Cuba del camarón blanco del pacífico *L. vannamei*. Etapa 1 cuarentena. *Centro de Investigaciones Pesqueras AquaDocs*. <http://hdl.handle.net/1834/3588>
- Wardiyanto, E., Harpeni, A. H., & Khotimah, A. (2019). *Identification of Vibrio sp. as cause of white feces diseases in white shrimp Penaeus vannamei and*

handling with herbal ingredients in East Lampung Regency, Indonesia.

Bioflux, 12 (2), 417-425. <http://www.bioflux.com.ro/docs/2019.417-425.pdf>

Apéndice A

Tabla 7.

Recuento en placas por tratamiento (UFC/mL)

	Tratamiento	UFC/mL		
		Tiempo		
		0	24	48
MUESTRA 1	T1	1,25E+05	1,04E+05	1,04E+05
	T2	1,35E+05	1,13E+05	1,01E+05
	T3	1,30E+05	1,11E+05	1,05E+05
	T4	1,45E+05	1,37E+05	1,20E+05
	T5	1,35E+05	1,18E+05	1,11E+05
	T6	1,25E+05	1,12E+05	1,07E+05
	T7	1,40E+05	1,14E+05	1,02E+05

	T8	1,15E+05	9,70E+04	8,55E+04
	T9	1,45E+05	1,23E+05	1,17E+05
	T10	1,35E+05	1,21E+05	1,09E+05
	T11	1,15E+05	9,80E+04	9,45E+04
	T12	1,25E+05	1,16E+05	1,06E+05
MUESTRA 2	Tratamiento	Tiempo		
		0	24	48
	T1	1,60E+05	1,30E+05	1,13E+05
	T2	1,25E+05	1,02E+05	9,20E+04
	T3	1,70E+05	1,40E+05	1,33E+05
	T4	1,45E+05	1,38E+05	1,09E+05
	T5	1,65E+05	1,36E+05	1,29E+05
	T6	1,75E+05	1,47E+05	1,39E+05
	T7	1,55E+05	1,47E+05	1,13E+05
	T8	1,30E+05	1,08E+05	9,70E+04
	T9	1,50E+05	1,26E+05	1,19E+05
		1,70E+05	1,39E+05	1,27E+05
	T11	1,75E+05	1,44E+05	1,37E+05
	T12	1,55E+05	1,38E+05	1,27E+05
MUESTRA 3	Tratamiento	Tiempo		
		0	24	48
	T1	1,55E+05	1,27E+05	1,11E+05
	T2	1,75E+05	1,33E+05	1,27E+05
	T3	1,65E+05	1,38E+05	1,30E+05
	T4	1,55E+05	1,37E+05	1,24E+05
	T5	1,65E+05	1,46E+05	1,36E+05
	T6	1,80E+05	1,53E+05	1,49E+05
	T7	1,75E+05	1,39E+05	1,29E+05
	T8	1,65E+05	1,34E+05	1,23E+05
	T9	1,70E+05	1,40E+05	1,33E+05
	T10	1,80E+05	1,48E+05	1,41E+05
	T11	1,45E+05	1,26E+05	1,20E+05
T12	1,60E+05	1,42E+05	1,39E+05	
MUESTRA 4	Tratamiento	Tiempo		
		0	24	48
	T1	1,75E+05	1,44E+05	1,26E+05
	T2	1,30E+05	1,18E+05	9,40E+04
	T3	1,35E+05	1,13E+05	1,05E+05
	T4	1,55E+05	1,36E+05	1,14E+05
	T5	1,40E+05	1,28E+05	1,07E+05
	T6	1,60E+05	1,43E+05	1,32E+05
	T7	1,40E+05	1,19E+05	1,02E+05
T8	1,45E+05	1,29E+05	1,09E+05	

	T9	1,40E+05	1,23E+05	1,08E+05
	T10	1,65E+05	1,34E+05	1,18E+05
	T11	1,25E+05	1,07E+05	9,45E+04
	T12	1,15E+05	1,09E+05	9,20E+04