

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Evaluación de un protocolo para remisión total de infección por bacterias causantes de EMS/AHPND en camarones pre-adultos *Penaeus vannamei*.

Proyecto Integrador

Previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Ivette Marisol Chiquito Noboa

Guayaquil, Ecuador

2023

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Faculty of Marine Engineering and Ocean Sciences

Protocol assessment for complete remission of EMS/AHPND-causing bacteria in
pre-adult white shrimp *Penaeus vannamei*

Capstone Course

A project submitted as a partial fulfillment for the degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Ivette Marisol Chiquito Noboa

Guayaquil, Ecuador

2023

Dedicatoria

Este proyecto lo dedico a Dios; por darme sabiduría y ayudarme a lograr todas las metas que me propongo. A mi familia, especialmente mi mamá, por su ayuda no sólo económica sino con su tiempo y apoyo moral en todo este proceso. Y a mis amigos y tutor por la paciencia y el apoyo que me brindaron.

Ivette Chiquito Noboa

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todos mis profesores por la guía y la ayuda que me brindaron, especialmente a mi tutor el Dr. Jorge Cuéllar-Anjel, por su tiempo, guía, paciencia y confianza para realizar el desarrollo de este proyecto y compartir conmigo sus experiencias y conocimientos.

A las autoridades y coordinación de la ESPOL, por el apoyo y permitirme el desarrollo de la parte experimental de manera anticipada y así lograr un buen desempeño del mismo. A mi mamá, la Lcda. Gladys Noboa, por el financiamiento, la dedicación y el cuidado que le dio a mi proyecto durante toda su fase experimental.

Y a mi amigo, el Ing. Roy Quimí, por su ayuda y aporte en la parte experimental de mi tesis.

Ivette Chiquito Noboa

Declaración Expresa

Yo Ivette Marisol Chiquito Noboa acuerdo y reconozco que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 8 de septiembre de 2023.



Ivette Chiquito Noboa

Evaluadores

Jerry Landivar, MSc.

Profesor de la materia



Dr. Jorge Cuéllar-Anjel

Tutor de proyecto

Resumen

Este proyecto tuvo como objetivo evaluar un protocolo de aplicación profiláctica o curativa, para conseguir la remisión bacteriana causada por cepas patógenas de *Vibrio* spp. presentes en el hepatopáncreas y/o hemolinfa de camarones pre-adultos *Penaeus vannamei*, infectados de forma natural con el agente causante de la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), inicialmente conocida como Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS). Los camarones se obtuvieron de la estación experimental del Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM) en Santa Elena, Ecuador. La fase experimental se realizó con 12 réplicas y 6 camarones en cada unidad experimental (acuarios de 10 L), durante un período de 30 días. Al inicio del proyecto se verificó la presencia de cepas bacterianas causantes de EMS/AHPND en los camarones experimentales, mediante técnicas de bacteriología y biología molecular. Diariamente se midieron parámetros físico-químicos y se realizaron recambios hídricos del 80% más sifoneo. A pesar de que los resultados iniciales de PCR indicaron que los camarones estaban infectados con el agente causal de EMS/AHPND, durante el estudio no se desarrolló la enfermedad en ninguno de los organismos. Al terminar el experimento, no se detectó la presencia del agente causal de EMS/AHPND (revisado el 33% de cada acuario) mediante la técnica de PCR, lo que sugiere una remisión (eliminación) “total” de las bacterias causantes de esta enfermedad, por acción efectiva del sistema inmune y gracias al manejo de calidad de agua realizado y sugerido por Cuéllar-Anjel y Brock (2018), como protocolo para el control de esta enfermedad.

Palabras Clave: EMS/AHPND, *Penaeus vannamei*, hepatopáncreas, hemolinfa, remisión

Abstract

The aim of this study was to evaluate a prophylactic and curative protocol for the clearance (remission) of bacterial infection caused by pathogenic strains of *Vibrio* sp. in the hepatopancreas and/or hemolymph of pre-adult *Penaeus vannamei* shrimp, naturally infected with the causative bacteria of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), initially known as Early Mortality Syndrome (EMS). Experimental shrimp were obtained from the experimental station of the Nacional Center for Marine Research (CENAIM) in Santa Elena, Ecuador. The experimental phase was conducted with 12 replicates of 6 shrimps in each experimental unit (10 L glass tanks), over a period of 30 days. At the beginning of the project, the presence of EMS/AHPND bacterial strains was confirmed using bacteriology and molecular biology techniques. Water physicochemical parameters were daily measured and 80% water exchange plus siphoning were performed. Although the initial PCR results indicated that the experimental shrimp were infected with the causative agent of EMS/AHPND no disease developed in any organisms during the study. At the end of the experiment, the presence of the EMS/AHPND-causative bacteria was not detected (reviewed 33% of each aquarium) through PCR, suggesting "complete" clearance of that bacteria due to a combination of immune system effectiveness and the water management protocol published by Cuéllar-Anjel and Brock (2018).

Keywords: EMS/AHPND, *Penaeus vannamei*, hepatopancreas, hemolymph, remission.

Índice General

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas	VII
Índice de Gráficas	VIII
Capítulo 1.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.3 Justificación del problema	7
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos	8
1.5 Marco teórico.....	9
1.5.1 Importancia de la Acuicultura en el Ecuador	9
1.5.2 Parámetros físico – químicos para el cultivo del <i>Penaeus vannamei</i>	14
1.5.3 EMS/AHPND	19
Capítulo 2.....	21
2.1 Metodología	22
2.1.1 Área de estudio	22
2.1.2 Preparación del Sistema	23
2.1.3 Instalación del sistema	27
2.1.4 Llenado de los acuarios.....	29
2.1.5 Desarrollo parte experimental	30
2.1.6 Recolección de muestras y preparación de medios.....	38
Capítulo 3.....	45
3.1 Resultados y análisis.....	46
3.1.1 Siembra bacteriológica en agar TCBS.....	46
3.1.2 Pruebas iniciales de PCR para EMS/AHPND.....	60
3.1.3 Pruebas finales de PCR para EMS/AHPND	61

3.1.4 Análisis del crecimiento de los camarones.....	62
3.1.5 Presencia de signos clínicos y mortalidad.....	66
3.1.6 Análisis de los parámetros químicos: oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, amonio, alcalinidad, nitrato y pH.	68
3.2 Análisis de costos	71
Capítulo 4.....	73
4.1 Conclusiones y Recomendaciones	74
4.1.1 Conclusiones	74
4.1.2 Recomendaciones	79
Referencias.....	81
Anexos.....	84

Índice de Figuras

Figura 1 Ubicación geográfica del lugar donde se desarrolló el bioensayo	22
Figura 2 Ubicación geográfica de la estación experimental CENAIM	23
Figura 3 Construcción de acuarios	24
Figura 4 Construcción de acuarios	25
Figura 5 Construcción de acuarios	26
Figura 6 Cálculo de la capacidad de los acuarios	26
Figura 7 Instalación de acuarios	28
Figura 8 Instalación de acuarios	29
Figura 9 Llenado de los acuarios	30
Figura 10 Obtención de los camarones.....	31
Figura 11 Aclimatación de los camarones.....	32
Figura 12 Aclimatación de los camarones.....	32
Figura 13 Aclimatación de los camarones.....	33
Figura 14 Instrumentos para la medición de parámetros	34
Figura 15 Obtención y transporte de agua de mar	35
Figura 16 Desinfección del agua de reservorio con hipoclorito de sodio al 5.25%	35
Figura 17 Sifoneo, recambio y limpieza de los acuarios	37
Figura 18 Preparación del alimento para los acuarios	38
Figura 19 Materiales para la preparación de agar TCBS	39
Figura 20 Preparación de agar TCBS	40
Figura 21 Preparación de agar TCBS	40
Figura 22 Preparación de micro tubos para PCR.....	41
Figura 23 Procedimiento toma de muestra para bacteriología	42
Figura 24 Procedimiento toma de muestras para PCR.....	43
Figura 25 Instrumentos utilizados	43
Figura 26 Instrucciones PCR IQ PLUS	44
Figura 27 Placas iniciales de bacteriología de hepatopáncreas de 5 camarones	46
Figura 28 Resultados iniciales de bacteriología de hepatopáncreas de los siguientes 10 camarones	46
Figura 29 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 1	48
Figura 30 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 2	49
Figura 31 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 3	50
Figura 32 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 4	51

Figura 33 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 5	51
Figura 34 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 6	52
Figura 35 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 7	53
Figura 36 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 8	54
Figura 37 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 9	55
Figura 38 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 10	56
Figura 39 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 11	57
Figura 40 Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa del acuario 12	57

Índice de Tablas

Tabla 1 Comparativo mensual - Exportaciones en libras 2019-2023.....	11
Tabla 2 Consumo de oxígeno disuelto (mg O ₂ /g/hora) del camarón.....	15
Tabla 3 Resultados iniciales bacteriología 15 camarones iniciales.....	47
Tabla 4 Resultados finales bacteriología acuarios 1, 2 y 3.....	50
Tabla 5 Resultados finales bacteriología acuarios 4, 5 y 6.....	53
Tabla 6 Resultados finales bacteriología acuarios 7, 8 y 9.....	55
Tabla 7 Resultados finales bacteriología acuarios 10, 11 y 12.....	57
Tabla 8 Conversión de microlitros para hepatopáncreas y hemolinfa.....	58
Tabla 9 Resumen de resultados finales bacteriología que presentaron colonias bacterianas.....	58
Tabla 10 Resultados de presencia de colonias en etapa final del proyecto.....	60
Tabla 11 Resumen de conteo de colonias y respectiva prevalencia.....	60
Tabla 12 Resultados iniciales de PCR primeros 15 camarones.....	61
Tabla 13 Resultados finales de PCR últimos camarones.....	62
Tabla 14 Biometría por acuario.....	62
Tabla 15 Biometría de pesos por acuario.....	63
Tabla 16 Peso promedio por acuario durante proyecto.....	63
Tabla 17 Número de mudas por acuario.....	64
Tabla 18 Total y promedio de mudas durante el proyecto.....	64
Tabla 19 Peso total de pellets suministrados durante el proyecto.....	65
Tabla 20 Número de camarones muertos durante los 30 días.....	67
Tabla 21 Porcentaje de sobrevivencia por acuario.....	67
Tabla 22 Porcentaje de sobrevivencia al inicio y final del proyecto.....	68
Tabla 23 Promedio de parámetro de salinidad de cada acuario.....	68
Tabla 24 Promedio de salinidad mañana y tarde durante el proyecto.....	69
Tabla 25 Promedio parámetro de oxígeno disuelto mañana y tarde por acuario.....	69
Tabla 26 Promedio de oxígeno disuelto mañana y tarde por acuario.....	70
Tabla 27 Promedio parámetro de temperatura para cada acuario.....	70
Tabla 28 Promedio parámetro de temperatura y pH al final del proyecto.....	71

Índice de Gráficas

Gráfica 1 Principales provincias que producen camarón en el Ecuador	10
Gráfica 2 Gráfica de mudas totales al final del proyecto y por acuario	65
Gráfica 3 Gráfica de pesos totales del alimento suministrado al final del proyecto y por acuario	66

Capítulo 1

1.1 Introducción

En muchas ocasiones, ocurren grandes pérdidas en la camaronicultura debido a la falta de aplicación de las precauciones preventivas necesarias. Eso ocurre porque frecuentemente los productores no conocen la interrelación entre el medio y los crustáceos y, en gran parte, de esto depende tener éxito o fracaso en esta industria. Las enfermedades parasitarias, fúngicas, bacterianas y virales, son más comunes en los estanques de cría, ya que estos sistemas son altamente dinámicos y es en este entorno donde interactúan de manera cercana factores como: salinidad, pH, oxígeno disuelto, temperatura, así como detritos orgánicos y compuestos inorgánicos. Las poblaciones de microorganismos que se encuentran en los estanques de cultivo de camarón, son propensas a cambios y relaciones que surgen entre estos factores, puesto que su composición y cantidad pueden ser alteradas, por lo que ciertos cambios pueden favorecer la proliferación de organismos patógenos y un aumento potencialmente riesgoso en su crecimiento. La función de las bacterias en un estanque de camarón, no debe de considerarse exclusivamente desde las enfermedades, ya que muchas bacterias cumplen un papel importante mantenimiento de la calidad del agua y del sustrato. De igual forma, existe otro grupo de bacterias consideradas como patógenos oportunistas y representadas principalmente por los vibrios (*Vibrio* spp.) en camaronicultura, que causan enfermedades bajo ciertas condiciones apropiadas para su proliferación (materia orgánica, salinidad, pH y temperatura y oxígeno disuelto, principalmente). Las patologías categorizadas como enfermedades bacterianas inducidas por vibrios que son perjudiciales, han sido reportadas en la crianza de larvas y durante la fase de crecimiento, causando frecuentemente lesiones en el órgano hepatopáncreas, que es la glándula digestiva de los camarones. Los vibrios más comunes de aparición en la fase de

crecimiento, incluyen *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *Photobacterium damsela*. En larvicultura, se reportan como los más frecuentes *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. owensii* y *V. splendidus*. No obstante, numerosas de estas cepas también se han detectado en la hemolinfa y hepatopáncreas de camarones juveniles saludables de la especie *P. vannamei* (Cuéllar-Anjel et al., 1998) (Gómez-Gil, 1998). Por esta razón, no podemos hablar de “especies patógenas”, sino de “cepas patógenas” de vibrios o de cualquier otro género.

A pesar de los progresos en la identificación de los causantes de enfermedades en los camarones, hay un conocimiento limitado acerca de la biología de estos patógenos, cómo ocurren las infecciones y cómo se regula la respuesta inmunológica frente a estos microorganismos. Aun contando con las condiciones óptimas para el cultivo del camarón, hay factores de peligros asociados con la presencia de enfermedades que pueden reducir drásticamente o arruinar el proceso de producción. A pesar de los esfuerzos humanos para prevenir estos problemas, todos los animales poseen su sistema de defensas o inmunidad, aunque los crustáceos como los camarones, exhiben particularidades que requieren una investigación detenida (Fonseca Moreno, González Salas, & Rico Gutiérrez, 2013). De esta manera, entender más profundamente la reacción inmunológica de los camarones peneidos nos permitirá desarrollar tácticas más efectivas para la gestión de enfermedades (Rendón & Balcázar, 2003).

(Fonseca Moreno, 2010), en su tesis de maestría, observó que ciertos factores relacionados con la gestión, como alta densidad de siembra, junto con parámetros climáticos y físico-químicos del agua, como baja temperatura, ejercieron una significativa influencia en la manifestación de la Erosión Bacteriana del Caparazón (o Enfermedad de la Mancha Carmelita)

en camarones de la especie *P. vannamei*. Este estudio también reveló que, en esta enfermedad independientemente de los factores que ejercen influencia, el sistema inmune de los camarones juega un rol fundamental. Se sabe que su sistema de defensa tiene inmunidad celular e inmunidad humoral. Ambas trabajan para eliminar los agentes extraños. Los hemocitos desempeñan un papel vital en estas respuestas del sistema inmunológico, siendo los representantes de la inmunidad celular, capaces de realizar funciones de fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y de citotoxicidad. Ellos constituyen la fracción celular de la hemolinfa. Los crustáceos tienen circulación abierta, en donde la hemolinfa es un análogo de la sangre y la linfa de los vertebrados. Esta baña los tejidos y el espacio por la que circula en los camarones, se conoce como hemocele (Rendón & Balcázar, 2003).

En los humanos, para conseguir la remisión de una enfermedad crónica, es imprescindible eliminar las principales causas que la mantienen activa: la inflamación de los tejidos y su dificultad para desintoxicarse y repararse. En otras palabras, las causas que han "puesto en marcha" la predisposición genética del organismo a padecer determinados trastornos o enfermedades. El organismo tiene una buena capacidad para eliminar residuos tóxicos del interior de las células y de su entorno (Cardona, 2016). En el caso de los crustáceos, no poseen inmunógeno contra agentes causales de infección, ya que no tienen memoria inmunológica ni leucocitos (línea celular blanca). Por esta razón, han desarrollado un sistema defensivo inespecífico basado en hemocitos circulantes y en varias proteínas de defensa, más bien, la falta de una memoria inmunológica, impide el desarrollo de vacunas (Fonseca Moreno, González Salas, & Rico Gutiérrez, 2013).

Debido a esto se ha vuelto necesario acoger medidas preventivas para la detección de patógenos y mantener controladas estas enfermedades; normalmente para la vigilancia y la previsión de los patógenos bacterianos, se ha dependido de la utilización de fármacos y compuestos químicos, (Cuéllar-Anjel & Peña, 2019), sabiendo que su uso indiscriminado (específicamente los antibióticos) puede inducir al desarrollo de resistencia bacteriana en camarones *P. vannamei*, riesgo en el ambiente y en el bienestar humano, debido a que el ingerir camarones con trazas de antibióticos en sus tejidos, pueden desequilibrar la flora del intestino, originando problemas de intoxicación o alergias al comérselo los humanos (Gómez-Gil, 1998).

En Ecuador, los antibióticos mayormente utilizados y que se rigen bajo el plan nacional de control, son Oxitetraciclina (OTC) y Florfenicol (FFC), siendo el primero bacteriostático y el segundo bactericida (Cuéllar-Anjel, com. pers.). Estos deben administrarse bajo un diagnóstico adecuado y con prescripción de un Médico Veterinario. No obstante, la recomendación es que estos deben usarse como último recurso (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MPCEIP), 2022). Para el tratamiento para la Vibriosis, se han obtenido resultados variables utilizando el Florfenicol (250 a 300 ppm) y Enrofloxacin (200 a 300 ppm), siendo agregado en el pellet del camarón y suministrado por el tiempo de 10 días, en intervalos de 8 horas. La eficacia del tratamiento va a depender de que tan oportuna sea la detección y el inicio de la medicación (Cuéllar-Anjel, 2015). Además, las bacterias puede ser controladas bajo un control estricto del agua y prevenir así la entrada del vibrios al cultivo (M. C. L. Baticados, 1990), al mismo tiempo reducir el estrés de los camarones. Por lo anterior, se recomienda disminuir la cantidad de materia orgánica en el agua y fondo de los estanques, el incremento de la cantidad de recambio de agua diario, la disminución de biomasa en el estanque con cosechas parciales para aminorar las mortalidades por causa de Vibriosis y el drenaje, secado y encalado

luego de la cosecha (Cuéllar-Anjel J. V., 2014) (Cuéllar-Anjel J. , 2018) (Cuéllar-Anjel J. a., 2018).

Como lo reportan Cuéllar-Anjel y Peña (2019), en el caso de una finca camaronera en Maracaibo (Venezuela), se presentaron repetidas mortalidades además de signos clínicos asociados con bacteriosis, en piscinas de crecimiento de camarón blanco *P. vannamei*, con aproximadamente 50 días de cultivo. De acuerdo con la anamnesis y las observaciones clínicas, se llegó a la conclusión que el diagnóstico que más encajaba era Vibriosis. La recomendación que dieron fue la mejora del manejo de reproducción y las técnicas de cultivo, siendo más rigurosos en la gestión de la fuente hídrica a través de probióticos y biorremediadores, para poder así reforzar el control de las bacterias degradadoras de materia orgánica. De esa forma, observaron una mejoría progresiva en la condición de la piscina (Cuéllar-Anjel & Peña, 2019).

1.2 Descripción del problema

La enfermedad EMS/AHPND se encuentra afectando desde hace casi una década al sector camaronero ecuatoriano, tanto en granjas de engorde (zonas de agua dulce o de agua salada), como en laboratorios de producción postlarvas de camarón. El agente etiológico de esta enfermedad corresponde a cepas patógenas de vibrios Gram negativos, principalmente de la especie *V. parahaemolyticus*, las cuales pueden producir altas mortalidades si la enfermedad no se detecta a tiempo. En esta patología, las toxinas bacterianas causan daño severo en el hepatopáncreas y afectan de manera directa los procesos fisiológicos asociados con la digestión en el camarón, causando la muerte en pocos días. Esta enfermedad puede producir mortalidades masivas en explotaciones comerciales, tanto en laboratorios de larvas como en las piscinas de engorde, con pérdidas económicas muy importantes para el sector.

1.3 Justificación del problema

La enfermedad EMS/AHPND, produce frecuentemente mortalidades en empresas camaroneras del Ecuador, incluyendo laboratorios de larvicultura y fincas de engorde. A pesar de que ha sido extensamente detectada mediante técnicas moleculares como la PCR, aún se le llama de manera general en el Ecuador “Vibriosis atípica”. Además del *V. parahaemolyticus*, esta enfermedad es también producida por cepas patógenas de *V. owensii* y *V. campbellii*. Se sugiere que hay especies de otros géneros bacterianos que también producen esta enfermedad. En una publicación de 2018, Cuéllar-Anjel y Brock presentaron una nueva hipótesis sobre la patogénesis de la enfermedad, distinta a la reportada originalmente (Bullet, 2023) y en la que se sugiere colonización del epitelio gástrico por cepas patógenas, que desde allí producen y liberan toxinas que van a la hepatopáncreas causando efectos devastadores (Pantoja y Lightner, 2014). Por su lado, Cuéllar-Anjel y Brock (2018) proponen, basados en estudios de caso, que las bacterias patógenas colonizan las partículas orgánicas presentes al fondo y dentro de la columna de agua, en las que se impregnan grandes cantidades de toxinas dañinas; al ser consumidas dichas partículas orgánicas por los camarones (dados sus hábitos detritívoros), se produce una ingesta de alta concentración de toxinas, las cuales llegan rápidamente al hepatopáncreas y causan lesiones agudas que conducen a mortalidades en muy poco tiempo (Cuéllar-Anjel J. a., 2018). Sin embargo, dichos autores reportan además que, realizando un manejo adecuado y dirigido de las unidades de producción afectadas, se puede revertir la enfermedad y frenar la mortalidad. Estos resultados fueron logrados por dichos investigadores, mediante recambio intenso de agua (>100% diario), sifoneo del fondo (2 veces al día) y optimización de la nutrición de los camarones (dieta de alta proteína y de 200 µm para postlarvas

pl-14). Esta población de postlarvas enfermas por EMS/AHPND, presentó signos clínicos y mortalidad inicial, que lograron mitigarse con el manejo mencionado por los investigadores y los cuales fueron confirmados de manera simultánea como EMS/AHPND, a partir de análisis histopatológicos y biología molecular (PCR para los genes bacterianos que codifican para la producción de las toxinas PirA y PirB) (Cuéllar-Anjel, com. pers.).

En este estudio de tesis (materia integradora), se buscó demostrar mediante condiciones controladas y ambiente de laboratorio, las hipótesis de Cuéllar-Anjel y Brock (2018), en cuanto a revertir una infección por cepas patógenas de bacterias causantes de EMS/AHPND, mediante un protocolo profiláctico y/o curativo similar al reportado en su estudio de 2018 y partiendo de camarones pre-adultos (a diferencia de las postlarvas de dicha publicación), infectados por vía natural con cepas bacterianas patógenas causantes de dicha enfermedad y confirmadas mediante PCR.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluación de un protocolo profiláctico y curativo para obtener la remisión total de infección por bacterias causantes de EMS/AHPND en camarones pre-adultos *Penaeus vannamei*.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar un sistema de bioensayos bajo condiciones controladas, para la manutención adecuada de camarones pre-adultos *P. vannamei*, capaz de permitirles su adecuado desarrollo en función de bajo estrés, así como de crecimiento y sobrevivencia óptimos

2. Lograr la remisión “total” de las bacterias causantes de EMS/AHPND en camarones pre-adultos *P. vannamei*, aplicando medidas estrictamente cuidadosas de manejo de calidad del agua, durante un período de 30 días bajo condiciones controladas y verificando por PCR
3. Corroborar una alimentación frecuente y normal así como correctos procesos digestivos en los camarones experimentales, mediante biometría y cuantificación diaria de mudas, para confirmar la ausencia de la enfermedad EMS/AHPND y presencia de HP

1.5 Marco teórico

1.5.1 Importancia de la Acuicultura en el Ecuador

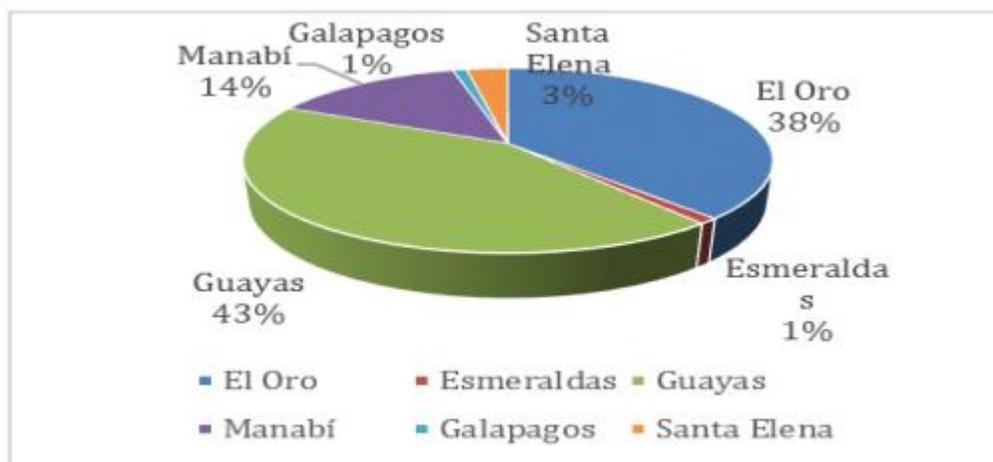
Ecuador ha sido históricamente exportador petrolero y de productos primarios como: banano, camarón, atún, flores, madera, entre otros. Por lo que una de las prioridades políticas comerciales debe ser la de diversificar las exportaciones (Sánchez, 2017). Aproximadamente, hace casi 5 décadas el cultivo de camarón en el Ecuador inició, a partir de que un grupo capitalistas de la provincia de El Oro empezó a explotar las salinas o salitrales. En los 80 esta actividad creció agresivamente, las granjas pioneras se situaron en el sur del país y han ido incrementándose desde entonces, llegando a casi 220.000 ha de estanques de producción en la actualidad. El Oro es una de las principales provincias productoras, ya que cuenta con 15% del total de producción del Ecuador (Gonzabay-Crespin, Vite-Cevallos, Garzón-Montealegre, & Quizhpe-Cordero, 2021).

De acuerdo con el Ministerio de Coordinación y Producción, Empleo y Competitividad, el sector acuícola camaronero cuenta con seis subsectores empiezan a partir de la elaboración de alimentos balanceados hasta lo que implica exportar al camarón en sus diferentes

presentaciones. Los laboratorios de maduración en el país tienen aproximadamente una capacidad de producción alrededor de 410 millones de nauplios diarios, con un valor al año de 149.650 millones. Los laboratorios de larvicultura tienen una capacidad de producción de aproximadamente 89.790 millones de postlarvas/año. En 2014, la Subsecretaria del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca mencionó que las empresas camaroneras están concentradas en 5 provincias: Guayas, Santa Elena, Manabí, El Oro y Esmeraldas. Éstas abarcan la totalidad de la producción. La Gráfica 1 presenta en detalle, el número de predios camaroneros en tierras altas y en zonas de playa y bahía. La provincia más importante de producción es Guayas, con un 43%, El Oro con un 38%, y Manabí con 14% (Gonzabay-Crespin, 2021).

Gráfica 1

Principales provincias que producen camarón en el Ecuador



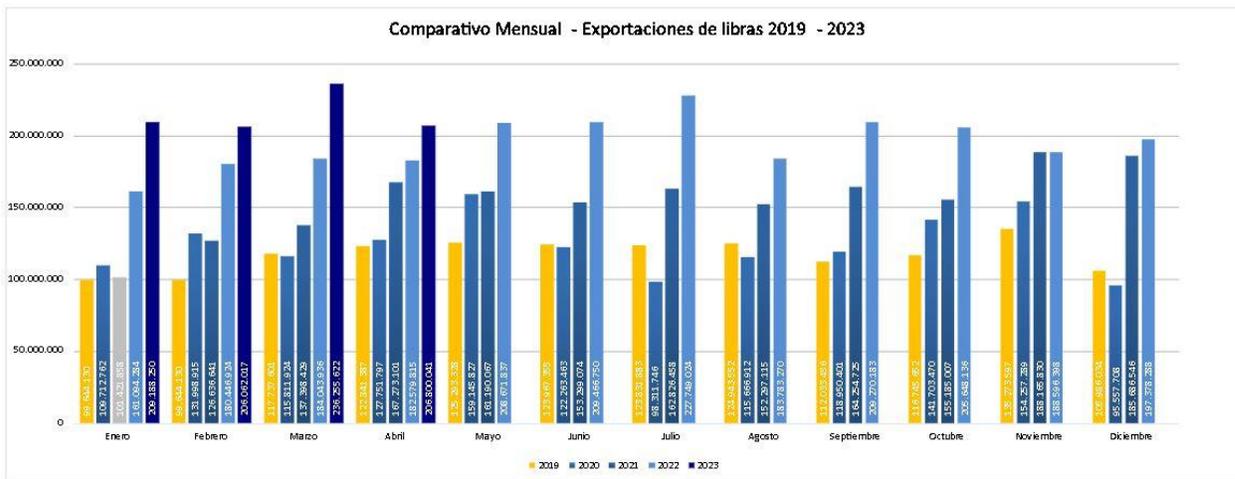
Nota. Datos tomados de la Cámara Nacional de Acuicultura, CNA (2020).

Las empacadoras/exportadoras son empresas de gran envergadura, por su infraestructura y cámaras de frío, que requieren los mercados internacionales. La mayoría tienen uno o algunos

accionistas (Consult, 2010). A raíz de las pérdidas económicas iniciales por la Mancha Blanca en 1999 y su posterior diseminación a todas las provincias camaroneras del país, se optó por el cultivo de camarones a baja densidad, con 7 a 15 organismos por metro cuadrado. En 2013, el país produjo entre 1.000 lb/ha en la región norte, hasta 2.500 lb/ha en la región sur, siendo aproximadamente 225.000 toneladas de camarón al año y utilizando un espacio total de 191.000 ha (Sánchez, 2017). La especie de camarón blanco *P. vannamei* es la más sembrada en acuicultura, y el principal producto acuícola no petrolero que el Ecuador exporta a la Unión Europea y a los Estados Unidos. La producción en el año 2021 presentó un incremento del 20%, con respecto al año anterior. La Tabla 1 presenta el reporte de exportaciones ecuatorianas totales de camarón, desde el año 2019 hasta abril del 2023 (CNA, 2023). De acuerdo con el Banco Central del Ecuador, las ventas de camarón de enero a marzo del 2023, sumaron USD 1.871 millones. Y las exportaciones del crudo alcanzaron USD 1.669 millones, superando con USD 202 millones a los envíos del crudo. Posicionándose el camarón como principal “commodity” o producto sin procesar en las exportaciones del primer trimestre del 2023 del país (CAMA, 2023).

Tabla 1

Comparativo mensual - Exportaciones en libras 2019-2023



Nota. Datos tomados de la Cámara nacional de Acuicultura (2023).

La comercialización del camarón en el mundo es el mayor productor de divisas y empleo, ya que este lidera uno de los sectores con un mayor dinamismo en la economía nacional. Debido al rápido aumento se ha posicionado como uno de los mayores productos exportados no petroleros, dejando de lado al banano desde el 2017 (CNA, 2023). Esta actividad produce gran número de ingresos en el Producto Interno Bruto (PIB) del Ecuador, cerca de 200 mil familias dependen de esta producción acuícola, además de otros empleos vinculados como: laboratorios de producción de post-larvas, fábricas de balanceados, insumos, empacadoras, logística y transporte (Paredes Floril, Bravo Bravo, & Delgado Naranjo, 2022).

Aun cuando Asia, China, Indonesia, Taiwan, Vietnam entre otros, producen grandes cantidades de camarón, su producto por usar antibióticos en sus producciones, posee menor calidad que el camarón ecuatoriano. Es oportuno mencionar que en 2018 la producción de camarón alcanzó 1.115,22 millones de libras lo sería igual a USD 3.199 millones (CNA, 2023).

La cantidad de hectáreas sembradas de camarón entre los años 2015 – 2020 mantuvo un aumento constante, permitiendo las exportaciones a la Unión Europea en constante crecimiento.

En 2020 a nivel mundial se vivió la Pandemia Covid-19, esto representó problemas severos para la economía local, debido a que al reducir la demanda, algunos de los pequeños productores dejaron de producir (Gonzabay-Crespin, Vite-Cevallos, Garzón-Montealegre, & Quizhpe-Cordero, 2021). Además de los numerosos obstáculos que presentó el sector económico ecuatoriano; uno de los mayores problemas fue cuando China, uno de los países con mayor destino de exportaciones de camarón, junio de 2020 encontró trazas del virus en el interior de los contenedores de tres empresas del Ecuador: Industrial Pesquera Santa Priscila, Empracreci y Edpacif, que fueron sancionadas luego. Como consecuencias, se retiró el producto de sus mercados, provocando una drástica disminución de los ingresos no petroleros en el país (Paredes Floril, Bravo Bravo, & Delgado Naranjo, 2022). Desde junio a julio de 2020, las exportaciones disminuyeron un 30%. Desde entonces a partir del mes de agosto, el camarón ecuatoriano ingresa a China sin restricción alguna ya que, mediante un comunicado especial, los elementos que dieron positivo para Covid-19, no estaban contaminados en el interior del paquete, ni en el camarón, sino en los empaques externos del envío. Hasta ese periodo, se registraron ingresos de USD 3.611,87 millones, cerrando con un crecimiento del 6% (CNA, 2023).

Al finalizar el 2021, Ecuador se convirtió en el primer exportador a nivel mundial (Paredes Floril, Bravo Bravo, & Delgado Naranjo, 2022) y en el 2022 llegó a casi 2.338,69 millones de libras (más de 1 millón de TM), aportando un valor de USD 6.653,08 millones (CNA, 2023), por lo que se puede notar que la producción de camarón es actualmente el punto central de la generación de empleo en el Ecuador.

1.5.2 Parámetros físico – químicos para el cultivo del Penaeus vannamei.

La crianza del camarón blanco se lo hace por diferentes sistemas de producción que se clasifican como: extensivo, semi-intensivo, intensivo y súper-intensivo. La diferencia entre éstos radica en los metros cuadrados de densidad de siembra, la cantidad y calidad de alimento entregado y en la tecnología requerida para cultivar los camarones. Durante la etapa de crecimiento, hay varios factores importantes que se deben tener en cuenta como pH, salinidad, oxígeno disuelto, alcalinidad, temperatura, densidad de siembra y calidad/cantidad/frecuencia del alimento (Arzola González, Flores Campaña, Izabal Ceja, & Gutiérrez Rubio, 2008). Debido a los episodios negativos que han surgido en los últimos años tales como el virus de la mancha blanca y otras enfermedades dentro de los sistemas de cultivos, se ha visto obligado el sector a replantearse el manejo que se utilizaba. Uno de los aspectos fue el utilizar menos recambios de agua, lo que crea un efecto de evaporación y filtración además de aumentar gradualmente la salinidad (Tandazo, 2000). Esto, con el objetivo de evitar el ingreso de patógenos a los estanques o el uso de agua contaminada (Arzola González, Flores Campaña, Izabal Ceja, & Gutiérrez Rubio, 2008). En nuestro país hay 2 estaciones principales (seca y lluviosa) y una intermedia que es el paso de una a la otra (transición); en la época de lluvia, la cantidad de agua de los ríos aumenta y la salinidad se reduce. Durante la época seca, disminuye la descarga de los ríos, incrementando la cantidad de sal en el agua, por lo que los estuarios pueden tener un rango de salinidad entre 0 a más de 30 ppt (Lodeiros & Castañeda, 2023) (Arzola González, Flores Campaña, Izabal Ceja, & Gutiérrez Rubio, 2008). A continuación, veremos a detalle la importancia de cada parámetro:

La salinidad es la concentración total de todos los iones disueltos dentro del agua (carbonatos, sodio y cloruros, principalmente). Este es un factor importante para las especies

acuáticas, ya que afecta en el equilibrio osmótico que tiene que existir entre el medio externo y los organismos (Arzola González, Flores Campaña, Izabal Ceja, & Gutiérrez Rubio, 2008). Las variaciones de salinidad pueden causar distintas respuestas metabólicas, por eso es necesario el conocer los requerimientos ambientales y nutricionales de los camarones (Tandazo, 2000). El período de vida de la especie *P. vannamei* requiere de distintas salinidades, en su etapa larval precisan aguas marinas para su desarrollo, en la etapa juvenil habita en aguas salobres o estuarinas hasta la maduración y en la etapa adulta regresan a las salinidades del océano para seguirse reproduciendo. A pesar de que el camarón blanco puede ser cultivado exitosamente en altas y bajas salinidades, los resultados obtenidos indican que su crecimiento disminuye en altas salinidades (Robertson, 1993).

La cantidad de oxígeno disuelto en el agua, es uno de los parámetros de calidad más importante en los sistemas de cultivo, puesto que este tiene la capacidad de limitar el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de los organismos si no se tiene una buena solubilidad de oxígeno. La cantidad de oxígeno disuelto disponible va a depender de la respiración del fondo del estanque, el fitoplancton y los sistemas de cultivo (Carranza, 2020). El consumo de oxígeno de los animales marinos depende de la temperatura, salinidad y el tamaño de los animales como se observa en la Tabla 2 (Vinatea, 2020).

Tabla 2

Consumo de oxígeno (mg O₂/ g/ hora) del camarón blanco Penaeus vannamei relacionado con la temperatura, salinidad y tamaño de los animales.

Salinidad	Temperatura	5 g	10 g	15 g	20 g
		(mg O ₂ /gramo/hora)			
37 ‰	20 °C	0,160	0,191	0,213	0,230
	25 °C	0,244	0,184	0,157	0,139
	30 °C	0,346	0,319	0,303	0,293
25 ‰	20 °C	0,162	0,188	0,205	0,218
	25 °C	0,246	0,250	0,252	0,254
	30 °C	0,326	0,322	0,320	0,318
13 ‰	20 °C	0,202	0,222	0,235	0,244
	25 °C	0,250	0,253	0,255	0,256
	30 °C	0,322	0,328	0,331	0,332
1 ‰	20 °C	0,172	0,166	0,161	0,159
	25 °C	0,238	0,255	0,265	0,272
	30 °C	0,382	0,425	0,451	0,471

Bett y Vinatea (2009). Brazilian Journal of Oceanography, 57 (4), p. 305-314.

El potencial de hidrogeno (pH) nos da un indicio de que tan ácido o básico es un líquido, va del 1 al 14, donde 7 es un valor neutral. Valores superiores a 7 son conocidos como básicos e inferiores a 7 son considerados ácidos. Los rangos óptimos para obtener buenas producciones de camarones peneidos son de 6.5 a 8.5. Valores por encima o por debajo de esa escala, provocan retrasos en el crecimiento, incremento del factor de conversión alimenticia (FCA) y los vuelve más aptos a contraer enfermedades infecciosas. Un ejemplo es el incremento de amonio en pH básico, otro es el sulfuro de hidrógeno (H₂S) que es un gas extremadamente tóxico en pH ácido. Por lo general, los fondos de los estanques son levemente ácidos cuando se encuentran inferiores a 5.9, es ahí cuando requieren de encalado (carbonato de calcio y

magnesio). Pero si las piscinas reciben agua de mar, difícilmente estarán inferiores a 5.9 y ahí el encalado no es necesario (Vinatea, 2020).

Cuando las proteínas son metabolizadas por los organismos de cultivo acuático, estas son excretadas vía branquial o renal, la descomposición de la materia orgánica también genera amonio. Dependiendo del pH del agua, el amonio puede presentarse en 2 formas: una toxica y otra menos toxica. Cuando el pH esta debajo de 7 (ácida) el amonio adopta una forma ionizada (NH_4^+), es decir menos toxica; y cuando el pH está por encima de 7 (básica) adopta una forma no ionizada (NH_3), más toxica. El amonio total vendría a ser la suma de la forma ionizada y no ionizada. En los sistemas de cultivo abiertos, el recambio de agua es para controlar los niveles de amonio. En presencia del oxígeno, el amonio es oxidado a nitrito por las bacterias *Nitrosomas sp.*, luego las bacterias *Nitrobacter sp.* oxidan el nitrito transformándolo en nitrato. Este proceso se llama nitrificación y va a depender del pH, cantidad de bacterias nitrificantes y substrato amoniacal. El nitrito es tóxico, por ejemplo, cuando el hierro ferroso de la hemoglobina entra en contacto con el nitrito, se convierte en hierro férrico, siendo este incapaz de transportar oxígeno, lo que provoca que los animales mueran cianóticos. En el caso de los camarones marinos son más resistentes a esta toxina gracias a la salinidad (Vinatea, 2020). Ya que, en aguas salinas disminuye significativamente debido al ion cloro (Cl^-) y la molécula de nitrito. Para camarones adultos *Penaeus vannamei*, el CL50 (Concentración letal capaz de matar el 50% de la población) del nitrito NO_2^-/L es de 19.6 - 37.0 ppm a las 96 h y 58.3 ppm a las 72 h mientras que en post-larvas es de 19.3 ppm a las 72h y entre 32.0- 37.3 ppm a las 48h en salinidad de 2 ppt. El porcentaje de muertes acumuladas en animales adultos fue del 70% expuestos a 60 ppm, en cambio en post-larvas fue 94.4% a una exposición de 40 ppm. Por lo que se sugiere que los

rangos seguros de exposición medidos son de 0.98 - 2.91 ppm (adultos) y 0.97 - 1.87 ppm (post-larvas) (Escobar, Nieto, Muñoz, & Burgos, 2021).

El nitrato también es tóxico a altas concentraciones. Durante mucho tiempo fue considerado seguro debido a su baja toxicidad, pero si las concentraciones superan los niveles máximos de seguridad reportados, pueden llegar a afectar a los animales. En el caso de los *P. vannamei* las concentraciones no pueden ser mayores a 220 mg/L, ya que, si pasan de ese valor afecta tejidos hepáticos, renales y branquiales. Un dato curioso es el acortamiento de las antenas cuando las concentraciones superan las recomendadas (Vinatea, 2020).

La alcalinidad es la capacidad de un líquido para neutralizar ácidos (H^+) y bases (OH^-). Esta puede ser baja (5 – 10 mg/L) o alta (más de 100 mg/L). se pueden considerar que los valores menores de 50 mg/L son considerados bajos, de 50 a 80 mg/L son moderados y más de 80 mg/L son elevados. La importancia de la alcalinidad radica en la estabilidad que le puede dar al pH del agua. Es decir que reacciona como *buffer* o tampón, evita así que el pH baje mucho por la noche y se eleve durante el día. El pH oscila a lo largo del día por el fitoplancton, ya que en la noche las microalgas liberan grandes cantidades de CO_2 , gas que al estar en contacto con el agua se convierte en ácido carbónico (H_2CO_3), pero como es un ácido débil difícilmente va a bajar el pH de 4.5. en cambio, durante el día sobre todo las aguas con un pH mayor a 8, obliga al fitoplancton a realizar hidrólisis, lo cual hace que el pH se eleve bastante. Esa elevación de pH puede provocar intoxicación a los organismos con amonio no ionizado. En aguas con alcalinidad baja, el pH puede cambiar hasta 3 unidades en 24 horas (ejemplo: 6 a 9) y en aguas con alcalinidad moderada, raramente la oscilación de pH supera la unidad (Vinatea, 2020).

La dureza es un parámetro irrelevante para el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, a no ser que haya sido aclimatado para cultivarlo en agua dulce o de muy baja salinidad. En tal caso, se recomiendan concentraciones no menores de 100 mg/L, tanto de alcalinidad como de dureza (Vinatea, 2020).

1.5.3 EMS/AHPND

La estructura productiva en las granjas en Ecuador presenta limitaciones operativas para la aplicación de procesos mecánicos e hidráulicos eficientes en la remoción sistemática de materia orgánica, en comparación con aquellos sistemas de producción intensivos en Asia (Jamil, Moreira Zambrano, & Bastidas Sánchez, 2021). La acumulación de carbono orgánico, especialmente los desechos ricos en quitina entre otros residuos en el fondo de las piscinas, se convierten en sustratos ideales para la proliferación de bacterias patógenas, entre ellos *Vibrio* sp., en especial *V. parahaemolyticus* (Aguilera-Pesantes, Castro, Bucheli, & Vargas, 2022). Se sabe que la enfermedad de la Vibriosis es bacteriana a quien se le atribuye las mortalidades del camarón blanco a nivel mundial (Donald V., Lightner, & H., 1975). El género *Vibrio* sp. se encuentran especialmente en esteros y aguas de mar (Guzmán-Hernández, Hernández-Vélez, & Contreras-Rodríguez, 2016). Las variaciones más agresivas de estas patologías se observan en la forma de AHPND, causante de mortalidad masiva durante los primeros 30 días después de la siembra. Al ser identificado el *V. parahaemolyticus* y verse involucrado, estos producen toxinas específicas (toxina binaria PirAB *Photobacterium – insect related*) que afectan a las células epiteliales ubicadas en los túbulos del hepatopáncreas, afectando a los camarones en cualquier momento del ciclo de producción (Aguilera-Pesantes, Castro, Bucheli, & Vargas, 2022). Estos son patógenos oportunistas cuando el mecanismo defensivo de los animales está suprimido.

Haciendo que las mortalidades alcancen hasta un 95% (Cuéllar-Anjel & Peña, 2019) (Panorama, 2022). Esto ocurre cuando los animales están sujetos a factores que generan estrés como: calidad de agua pobre, temperaturas elevadas en el agua, altas densidades de siembra, bajo intercambio de agua y bajo oxígeno disuelto (Donald V., Lightner, & H., 1975). Los signos clínicos que pueden presentar los camarones infectados por *Vibrio* sp. son: enrojecimiento corporal con branquias rojas o marrones, letargia, nado errático sobre la superficie del estanque además de los bordes, reducción de la alimentación, melanización del cuerpo, apéndices y branquias, pérdida de miembros, infección en el tracto intestinal o en el hepatopaneas, dando lugar a una posible infección sistemática en todo el cuerpo (Lightner, 1993).

La forma en que se puede identificar esta enfermedad, es a través de observación directa de los signos clínicos que puedan presentar, análisis con muestras frescas, ensayos de bacteriología en medios de cultivo selectivo TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa) en los que permiten cultivos de órganos como la hepatopaneas o hemolinfa; identificación histopatológica de las bacterias en forma de bacilo en las lesiones y técnicas moleculares como la PCR y la hibridación *in situ* (Cuéllar-Anjel, 2015).

En 2018 se realizó una investigación cuyo propósito fue identificar una proteína vinculada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND). Se identificó la cepa bacteriana conocida como *V. parahaemolyticus* en cultivos semi-intensivos asociada a las mortalidades de camarones cultivados en el Ecuador, por medio de técnicas histológicas y de biología molecular. Por lo recomiendan que se mantenga una vigilancia sanitaria rigurosa en los cultivos de camarón en Ecuador (Saavedra-Olivo, Peralta-Ortiz, & Ordinola-Zapata, 2018).

Capítulo 2

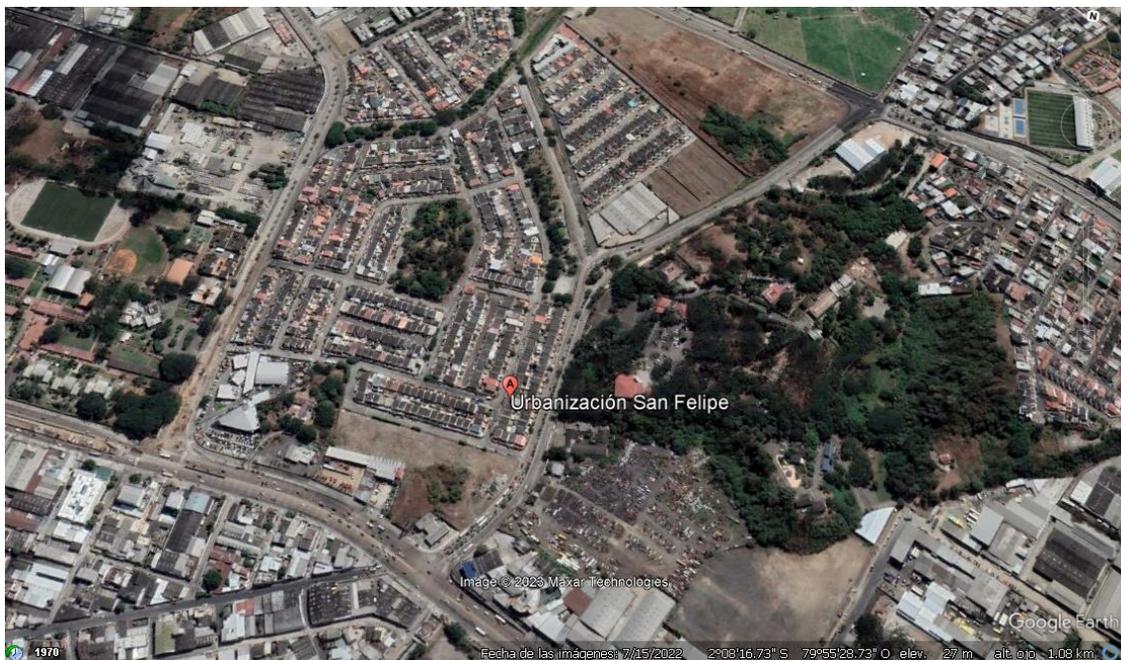
2.1 Metodología

2.1.1 Área de estudio

Este bioensayo lo llevamos a cabo en instalaciones apropiadas para bioensayos en la ciudad de Guayaquil, específicamente en la cdla. San Felipe (Figura 1). Los camarones utilizados en el estudio fueron obtenidos de la estación experimental del CENAIM, la cual se encuentra en la zona de San Pedro de Manglaralto (Santa Elena, Ecuador) (Figura 2).

Figura 1

Ubicación en el mapa del lugar donde se desarrolló el bioensayo



Nota. La figura fue tomada de Google Earth (2023).

Figura 2

Ubicación geográfica de la estación experimental CENAIM



Nota. La figura fue tomada de Google Earth (2023).

2.1.2 Preparación del Sistema

Construcción de los acuarios:

Se construyeron 12 acuarios con dimensiones de 20 x 20 x 25 cm cada uno (Figura 3) y con un volumen aproximado de 10 litros de agua (

Figura 5, c). Se colocaron ángulos de aluminio en la base y a los lados de cada acuario para asegurarnos de que estén reforzadas y evitar posibles fugas de agua (Figura 4, f). Las tapas, se construyeron con ángulos de aluminio y en el centro se les colocó una malla de plástico con orificios de 1 mm (Figura 4, a y g). Se usó vidrios de 3 mm de grosor tomando en cuenta la presión que este genera y para mayor seguridad. El pegamento que se utilizó fue silicón multiuso, especialmente para acuarios (Figura 4, d). Además, se armaron 2 acuarios adicionales de reposición (

Figura 8, a), estos tuvieron dimensiones de 20 x 25 x 30 cm (Figura 4, b). La capacidad de estos era de 20 litros de agua aproximadamente (

Figura 5, d). Por último, se rotuló cada pecera con masking tape y un marcador permanente negro de punta fina (

Figura 5, a y b).

Figura 3

Construcción de acuarios



Nota. a) 12 acuarios construidos 20 x 20 x 25 cm, b) Vista superior de los acuarios 1, 2, 3, 4, 5 y 6 con tapa y aluminios laterales, c) Vista superior acuarios con sus respectivos aireadores, d) Ubicación de los acuarios 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con tapa, e) Vista superior de acuarios de 20 x 20 x 25 cm.

Figura 4

Construcción de acuarios



Nota. a) Malla de 1 mm y ángulos de aluminio para tapa, b) Vista superior acuarios reposición, c) Vista frontal acuarios reposición, d) Silicón para acuarios y masking tape, e) Vista lateral acuarios reposición, f) Vidrio de 3mm y ángulos, g) Tapa terminada acuarios reposición.

Figura 5

Construcción de acuarios



Nota. a) y b) Rotulación de los acuarios, c) Acuarios llenos, d) Acuarios de reposición con capacidad de 20 litros aproximadamente.

Figura 6

Cálculo de la capacidad de los acuarios

Calcular capacidad del acuario (litros)

Largo: cm

Ancho: cm

Alto: cm

La capacidad de tu acuario es de

litros

galones

A

Calcular capacidad del acuario (litros)

Largo: cm

Ancho: cm

Alto: cm

La capacidad de tu acuario es de

litros

galones

B

Nota. a) Capacidad de acuarios de reposición, b) Capacidad de las 12 réplicas. Imagen tomada de Calcuworld.com (2023).

2.1.3 *Instalación del sistema*

Se utilizaron 6 regletas para conectar los aireadores (

Figura 7, a). Se instalaron 15 aireadores marca JAD de 1 sola salida para los acuarios (

Figura 7, d) y 2 aireadores marca JAD de doble salida para el reservorio (

Figura 7, c). Se usaron 5 gavetas grandes de plástico como reservorio, con una capacidad aproximada de 84 litros de agua cada una (

Figura 7, f). Los aireadores se ubicaron en un nivel por encima del nivel del agua de cada pecera, para aumentar su eficiencia (

Figura 7, g). Se utilizó manguera de silicona elástica marca JAD, para conectar los difusores de aire con los aireadores (

Figura 7, b y e). Cada pecera tenía un difusor de aire y aireador independiente, incluso para cada gaveta del reservorio de colocó un difusor de aire independiente (

Figura 7 y

Figura 8). Se usaron 6 trapos de microfibra en total, ya que se distribuyó un trazo de microfibra para la limpieza de 3 peceras y 1 trazo individual para cada acuario de reposición y evitar cualquier tipo de contaminación (

Figura 8, b, c y d). Así mismo, ocupamos 6 mangueras de plástico con 3 mm de diámetro y 1 metro de largo, que se usaron para el sifoneo de los acuarios (

Figura 8). Se le asignó a cada acuario una jarra pequeña de plástico rotulada y una pipeta Pasteur de 1.5 mL, para la toma de parámetros y evitar introducir los instrumentos de medición dentro de las peceras (

Figura 8, d). En total se usaron 16 jarras plásticas pequeñas con capacidad de 1 litro y 15 pipetas Pasteur de 1.5 mL.

Figura 7

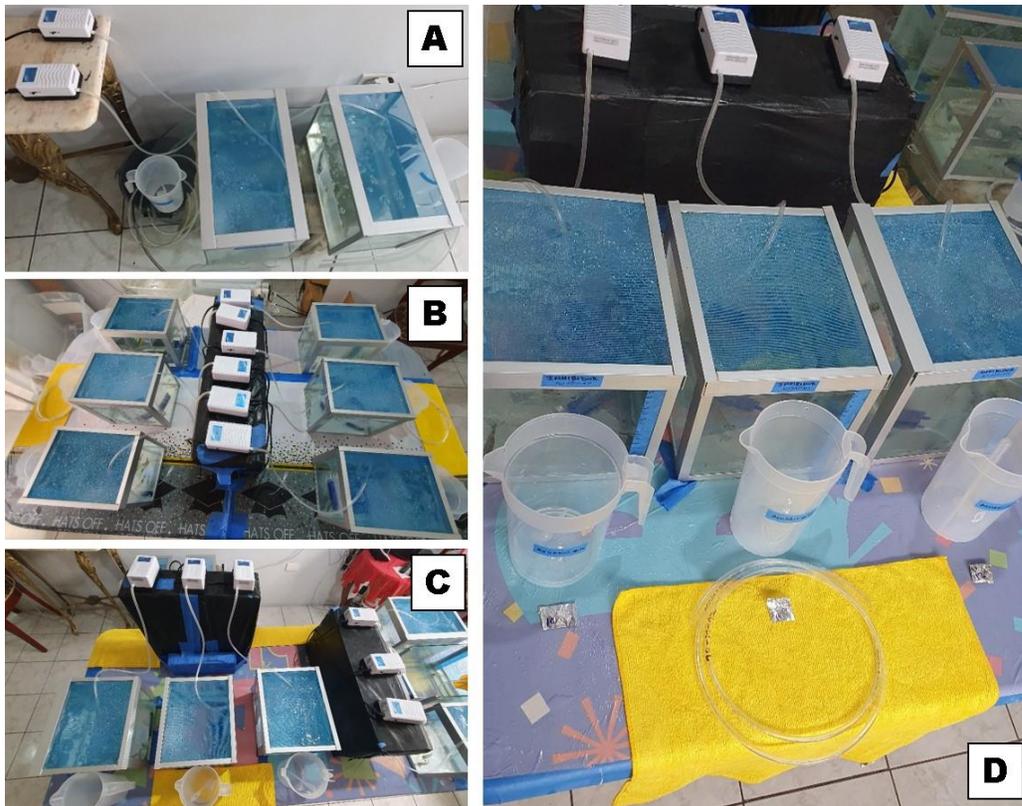
Instalación de acuarios



Nota. a) Regletas b) Manguera de silicona JAD, c) Aireador doble salida JAD, d) Aireador 1 salida JAD, e) Vista superior manguera silicona, f) Gaveta reservorio de 84 litros aproximadamente, g) Instalación de reservorio.

Figura 8

Instalación de acuarios



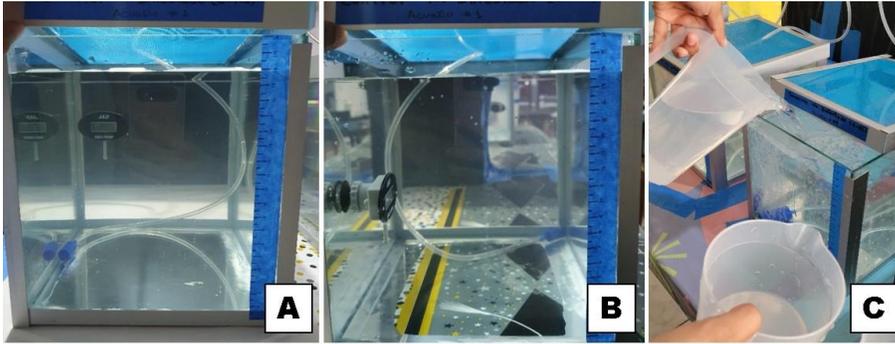
Nota. a) Instalación de acuarios de reposición, b) Instalación de las primeras 6 réplicas de acuarios, c) Instalación de las siguientes 6 réplicas de acuarios, d) Distribución de instrumentos individuales para cada pecera.

2.1.4 Llenado de los acuarios

Se llenaron las peceras con agua dulce 24 horas previas a la utilización de las mismas para ver si existían fugas, disipar el olor y los restos del silicón que se utilizó para pegar los acuarios (Figura 9, a y b). Pasado ese tiempo, se llenó con 10.5 litros de agua de mar (33 ppt) a cada acuario (Figura 9, c). El agua de mar se la obtuvo de un laboratorio de larvas ubicado en Monteverde (Santa Elena, Ecuador).

Figura 9

Llenado de los acuarios



Nota. a) y b) Peceras con agua dulce, c) Peceras con agua de mar.

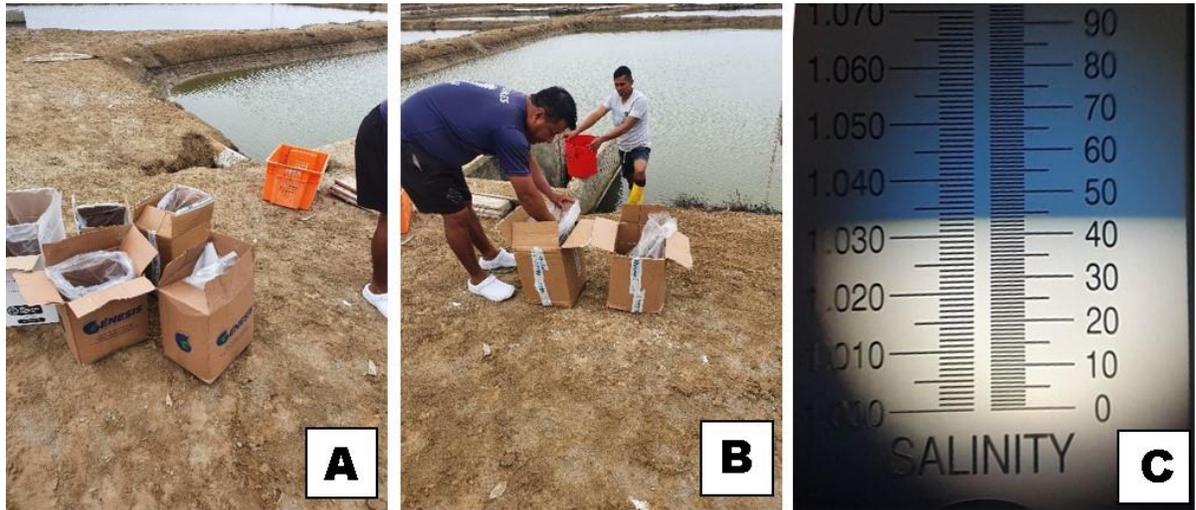
2.1.5 Desarrollo parte experimental

Obtención de los camarones:

Los camarones se obtuvieron de la estación experimental del Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en la zona de San Pedro de Manglaralto (Santa Elena, Ecuador) (Figura 2). Se recibieron 120 camarones juveniles de 4 g aproximadamente. Se los transportaron en cajas de cartón, dentro de fundas larveras hasta Guayaquil, por un tiempo de 2 horas y media, sin aireación. Se colocaron 8 animales aproximadamente por funda (Figura 10, a). La salinidad del agua donde se obtuvo los camarones era de 44 ppt (Figura 10, c). El carro donde se los movilizó era particular, por lo que se evitó encender el aire acondicionado para no afectar la temperatura de los animales.

Figura 10

Obtención de los camarones



Nota. a) y b) Recepción de camarones, c) Salinidad del agua (44 ppt) de los camarones.

Aclimatación de los camarones:

A penas llegaron los animales al lugar donde se iba a realizar el bioensayo, se le puso aireación a cada funda y se mantuvieron controlados los parámetros de oxígeno disuelto, pH, temperatura. Se les bajo la salinidad 1 ppt cada hora con la ayuda de un refractómetro marca VEE GEE, como la literatura lo sugiere, para evitar estresar demasiado a los animales (Figura 11). Se utilizó la misma agua de mar del reservorio, para bajarles el nivel de salinidad. Se llevaron 2 días aproximadamente hasta llegar a la salinidad deseada (Figura 12). Previo al traslado de los camarones a los acuarios, se les realizó una biometría inicial con la ayuda de una balanza gramera marca CAMRY, para tener más exactitud del peso. Se colocaron 6 animales en cada pecera y fueron pesados individualmente. Se registró su peso inicial en la bitácora (Figura 13).

Figura 11

Aclimatación de los camarones



Nota. a) y b) Aireación en los camarones, c) Medición de salinidad, d) Medición de pH, e) Medición de oxígeno disuelto y f) Registro de parámetros en la bitácora.

Figura 12

Aclimatación de los camarones



Nota. Disminución de la salinidad de los camarones (44 ppt a 26 ppt).

Figura 13

Aclimatación de los camarones



Nota. Biometría de los camarones.

Medición de parámetros físico – químicos:

Se tomaron parámetros diarios de salinidad (ppt), oxígeno disuelto (mg/L), pH y temperatura (°C). Para medir la salinidad se utilizó una pipeta Pasteur de 1.5 mL y un refractómetro marca VEE GE (Figura 14, b); para el pH se usó un pH metro marca TRI METER (Figura 14, a), para el pH y la temperatura; y un oxigenómetro marca BLE – 9100 (Figura 14, c). Los nitritos (mg/L), nitratos (mg/L), alcalinidad (mg/L) y amonio (mg/L) se midieron con la ayuda de tiras reactivas marca API (Figura 14, d) y Quantofix (para el amonio) (Figura 14, e). Para evitar la contaminación del agua de cada acuario, se utilizaron jarras pequeñas de plástico con capacidad de 1 litro para realizar las mediciones (Figura 14, f). Se registró diariamente las mudas y la cantidad de animales muertos de cada pecera, en la bitácora y mediante evidencia fotográfica (Anexo 5- Anexo 16).

Figura 14

Instrumentos para medición de parámetros



Nota. a) pipeta 1.5 mL y pH metro, b) refractómetro, c) oxigenometro, d) y e) tiras reactivas y f) Jarras de 1 litro.

Recambio y sifoneo:

El agua para el recambio era adquirida de los laboratorios de larva Quimilab, ubicados en la zona de Monteverde (Santa Elena, Ecuador). El agua era transportada en un carro particular, en fundas larveras con capacidad de 30 litros cada una, desde Monteverde hasta Guayaquil (Figura 15). Una vez que llegaba el agua al destino, se colocaba en las gavetas con aireación que servían de reservorio y se les agregaba hipoclorito de sodio al 5.25% de una marca comercial, para eliminar cualquier impureza que haya podido adquirir durante el transporte. El agua se la usaba luego de 24 horas con aireación, para asegurarnos de utilizar agua de clorada (

Figura 16). De igual manera, nos ayudábamos con tiras reactivas para medir el cloro y verificar que esté totalmente libre de este. Las gavetas que se usaban como reservorio se lavaban y desinfectaban con cloro cada vez que se vaciaban y se llenaban nuevamente. Para mayor seguridad y evitar la introducción de cualquier vector al agua,

se mantenían parcialmente tapadas y con aireación las gavetas, hasta el momento en que se necesite usar el agua para los recambios o sifoneos (

Figura 7, g).

Figura 15

Obtención y transporte de agua de mar.



Figura 16

Desinfección del agua de reservorio con hipoclorito de sodio al 5.25%.



Se realizaron recambios de agua del 80% diarios en la mañana y sifoneo en la tarde antes de la última comida. Se bajaba el nivel de agua en los recambios y sifoneos, con mangueras de plástico de 2 mm de diámetro y 1 metro de largo aproximadamente. Con la ayuda de trapos de microfibra se realizaba la limpieza interna de cada acuario, aprovechando que se bajaba el nivel del agua de estos (Figura 17). Los trapos de microfibra y las mangueras se las lavaba diariamente con cloro y agua dulce luego de ser utilizadas. Los trapos que eran compartidos entre 3 acuarios, se lavaban con agua dulce luego de limpiar cada unidad experimental (Figura 13). La cantidad de agua que se colocaba en cada acuario era de 10.5 litros, ya que se manejaba una biomasa de 29.4 g aproximadamente. El agua se recolectaba en baldes de 10 litros, se usaron 6 baldes en total. Y la capacidad de cada gaveta del reservorio era de 84 litros cada una aproximadamente.

Figura 17

Sifoneo, recambio y limpieza de los acuarios



Alimentación:

El alimento que se utilizó durante los 30 días que duro el bioensayo fue de una marca comercial, con pellets de 1500 micras de diámetro y 35% de proteína cruda. Se comenzó suministrando 7 pellets por camarón diario y se les fue aumentando la dosis de acuerdo con el consumo que mostraban los animales. Se dividió la ración en 3 porciones al día. El alimento fue pesado y separado en funditas de aluminio rotuladas con acuario, día y hora. El peso diario del alimento fue registrado en la bitácora (

Figura 18).

Figura 18

Preparación del alimento para los acuarios.



2.1.6 Recolección de muestras y preparación de medios

Preparación de agar TCBS:

Se llevaron 20 platos nuevos, desechables y esterilizados al laboratorio de Salud Animal de la ESPOL, lugar donde se realizó la preparación del agar TCBS. Los primeros 20 platos de agar TCBS que se prepararon, fueron para realizar la parte de bacteriología de los primeros 15 camarones de muestra del bioensayo y así conocer la abundancia de Unidades Formadoras de Colonias con la que vinieron los camarones infectados de forma natural por AHPND/EMS (Figura 19, a). Los instrumentos que se usaron del laboratorio fueron: 1 matraz de 500 mL, 1 balanza marca CAMRY, agar TCBS, agua destilada, 3 mecheros, una fosforera, 1 placa calefactora marca CIMAREC 2, papel aluminio, 1 guante térmico, 1 trapo y 1 vaso de precipitación de 250 mL (Figura 19, b). Primero se debe desinfectar la superficie donde se van a colocar los platos y los mecheros, para esto usamos un atomizador del laboratorio con alcohol al 70° (Figura 20, a). Después, se ubican los platos vacíos en el mesón con los 3 mecheros intercalados y con las tapas puestas en el filo de las cajas para facilitar el cerrado de estas (Figura 20, b). Luego se pesa la cantidad de 35.6 g de agar TCBS en la balanza y se coloca 400 mL de agua destilada (cantidad para 20 platos de agar) en el matraz con la ayuda de un vaso de precipitación (Figura 20, c). Se cubre con un poco de aluminio la boca del matraz y se procede a calentar en la placa calefactora a un heat de 8 hasta que este empiece a ebullición (Figura 21, a). Con la ayuda de un guante térmico, se agita el matraz cada cierto tiempo para ayudar a que se mezcle bien el agar (Figura 21, b). Hay que estar pendiente de que apenas ebullición, sacar el matraz de la placa calefactora para evitar que se derrame el mismo (Figura 21, c). Una vez que este haya hecho ebullición, se espera un poco a que baje la espuma e inmediatamente se procede a llenar los platos lentamente para evitar que se formen burbujas dentro del plato. Hay que tener la precaución de no pasar por encima de los platos el matraz, para evitar la contaminación de los mismos (Figura 21, d). Por último, una vez que se enfría el agar se procede a taparlos y

voltearlos para evitar que estos se contaminen (Figura 21, e). De ahí se los guarda en refrigeración bien sellados y rotulados para evitar que se deshidraten hasta el momento en que se los vaya a usar (Figura 21, f). Se recomienda la preparación de los agares hasta un máximo de 7 días previo a su utilización, para evitar que estén deshidratados y no vayan a servir. La segunda vez se prepararon 60 platos de agar TCBS días previos a la finalización del proyecto. Usando el mismo procedimiento, se prepararon cantidades para 20 platos, hasta completar los 60 platos que se necesitaban.

Figura 19

Materiales para la preparación de agar TCBS



Nota. a) 20 platos de agar TCBS en refrigeración y b) Instrumentos y materiales para preparar agar TCBS.

Figura 20

Preparación de agar TCBS



Nota. a) Limpieza de superficie, b) Colocación de platos y mecheros y c) Peso de agar y cantidad de agua destilada.

Figura 21

Preparación de agar TCBS



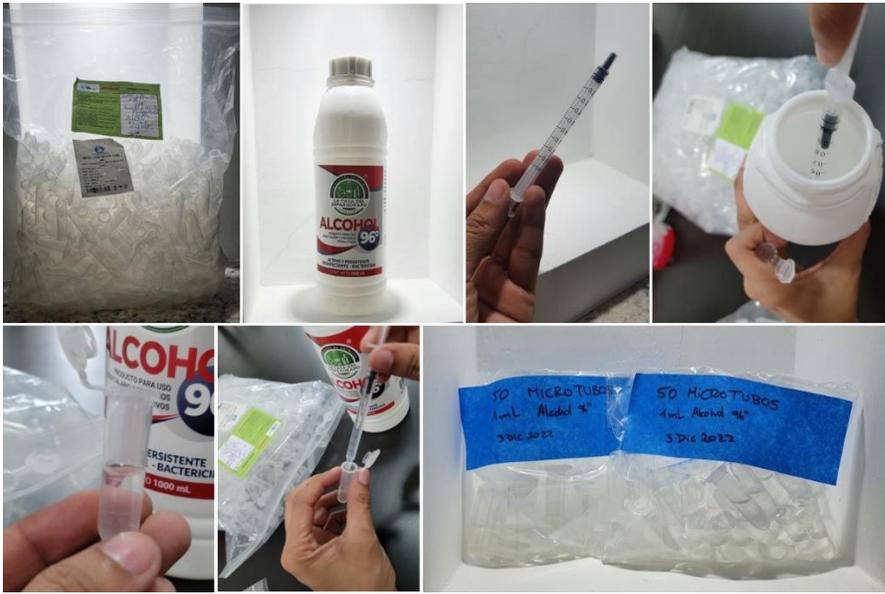
Nota. a) Colocación de agar en calefactor, b) Agitación del matraz, c) Ebullición de agar TCBS, d) Llenado de los platos de agar TCBS, e) Platos de agar volteados y f) Rotulación y refrigeración de los platos agar TCBS.

Preparación de micro tubos para PCR:

Se prepararon al principio del bioensayo 15 micro tubos de 2 mL, para la toma de muestra de hepatopáncreas para PCR. Cada micro tubo se llenó con 1 mL de alcohol al 96%, haciendo uso de una jeringa de 1 mL de capacidad. Cada micro tubo estaba rotulado y se depositó 50 mg de hepatopáncreas aproximadamente, usando unas tijeras quirúrgicas previamente esterilizadas. Al finalizar el proyecto se prepararon 12 micro tubos más. Habiendo utilizado un total de 27 micro tubos de 2 mL. Dentro de la bitácora estaba registrado el número de micro tubo y a que camarón pertenecía respectivamente cada muestra (Figura 22).

Figura 22

Preparación de micro tubos para PCR



Toma de muestras:

La obtención de muestras se hizo al inicio del proyecto y al finalizar el mismo. Al inicio del ensayo se tomaron 15 animales de los acuarios de reposición y se les realizó bacteriología de hepatopáncreas, PCR de hepatopáncreas y biometría.

En la biometría inicial y final se sacaron los animales del agua de manera individual, se los secaba con papel toalla y se procedía a pesar cada camarón en una balanza gramera marca CAMRY. El peso fue registrado dentro de la bitácora (Figura 13).

Inmediatamente al mismo camarón se le exponía la hepatopáncreas sin matarlo y con la ayuda de un asa bacteriológica calibrada, se perforaba la hepatopáncreas (sin tocar el intestino) para tomar la muestra de 10 microlitros y sembrarlos en los platos de agar TCBS, previamente preparados y rotulados. Cabe recalcar, que el asa bacteriológica se había esterilizado previamente colocando su punta en un mechero hasta visualizarla al rojo vivo, y de esa forma eliminar residuos con tejidos que está pudiera tener. Este proceso se lo repetía antes de tomar las diferentes muestras de cada camarón (Figura 23).

Figura 23

Procedimiento toma de muestra para bacteriología



Una vez terminada la parte bacteriológica, con la ayuda de tijeras quirúrgicas (previamente desinfectadas), se tomaba 50 mg aproximadamente de hepatopáncreas y se la colocaba dentro del microtubo con alcohol al 96% para preservar el tejido. Hay que tener precaución en no introducir los dedos dentro del microtubo para evitar la contaminación de la muestra, ni que este toque por fuera del mismo. Al finalizar el proyecto, se realizó el mismo procedimiento, solamente se aumentó la siembra de hemolinfa en bacteriología usando una jeringa de capacidad de 1 mL y así colocar 50 microlitros de hemolinfa en los agares. Se utilizó una jeringa para cada camarón (Figura 24).

Figura 24

Procedimiento toma de muestras para PCR



Los instrumentos que se utilizaron en todo este proceso fueron: una balanza gramera marca CAMRY, papel toalla, 1 mechero, 2 asas bacteriológicas, tijeras quirúrgicas, 2 frascos con alcohol al 96%, jeringas de 1 mL, micro tubos previamente rotulados y con alcohol al 96%, gradilla y platos con agar TCBS previamente preparados y rotulados. Los platos de agar una vez sembrados, se los incubaron a 30° aproximadamente por un periodo de 24 a 48 horas, luego se procedió a realizar el conteo de colonias que presentaron cada uno de estos (Figura 25). Y con respecto a las muestras de hepatopáncreas para PCR, se las mandó a un laboratorio comercial a que sean procesadas. El método que utilizó el laboratorio privado fue PCR IQ PLUS (Figura 26).

Figura 25

Instrumentos utilizados

Capítulo 3

3.1 Resultados y análisis

3.1.1 Siembra bacteriológica en agar TCBS

Al inicio del estudio, los camarones presentaron infección natural por las bacterias causantes de AHPND/EMS, con una prevalencia de 60% ($n= 15$). A pesar de lo anterior, no se presentó crecimiento bacteriano ni en la hepatopáncreas ni en la hemolinfa de estos 14 camarones examinados individualmente. Solamente 1 camarón (1%) del total de animales, presentó una colonia amarilla dentro del hepatopáncreas (Figura 28, j).

Figura 27

Placas iniciales de bacteriología de hepatopáncreas, cultivados en agar TCBS, de 5 camarones al inicio del proyecto



Nota. A) camarón 1, B) camarón 2, C) camarón 3, D) camarón 4 y E) camarón 5.

Figura 28

Resultados iniciales de bacteriología de hepatopáncreas, cultivados en placas de agar TCBS, de los siguientes 10 camarones al inicio del proyecto

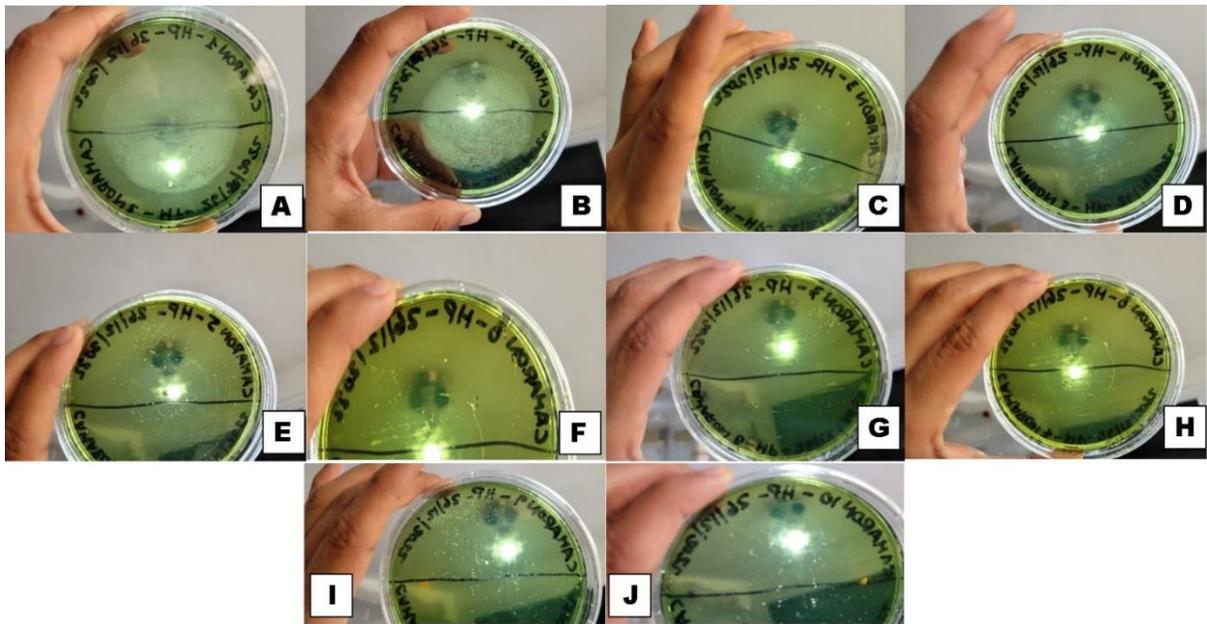


Tabla 3

Resultados iniciales de bacteriología de hepatopáncreas, cultivados en placas de agar TCBS, de 15 camarones al inicio del proyecto

N° Camarón	Etapa	Tratamiento	Amar. HP UFC/g	Amar. HM UFC/mL	Verd. HP UFC/g	Verd. HM UFC/mL
1	Inicial	R	0	0	0	0
2	Inicial	R	0	0	0	0
3	Inicial	R	0	0	0	0
4	Inicial	R	0	0	0	0
5	Inicial	R	0	0	0	0
6	Inicial	R	0	0	0	0
7	Inicial	R	0	0	0	0
8	Inicial	R	0	0	0	0
9	Inicial	R	0	0	0	0
10	Inicial	R	0	0	0	0
11	Inicial	R	0	0	0	0
12	Inicial	R	0	0	0	0
13	Inicial	R	0	0	0	0
14	Inicial	R	0	0	0	0
15	Inicial	R	1	0	0	0

R = Respaldo HM = Hemolinfa HP = Hepatopáncreas

Al terminar el estudio, no se presentó crecimiento de colonias verdes en hemolinfa o HP, en los 72 camarones experimentales. Sin embargo, sí hubo crecimiento de colonias amarillas, con conteos bajos ($<3,0E+02$) y con diferencias significativas entre los cultivos bacterianos iniciales y finales. La proporción de camarones con crecimiento de colonias amarillas se evidenció alta en el bioensayo final (36%) (Tabla 10).

Se tuvieron 26 camarones con presencia de colonias amarillas en la hepatopáncreas, representando un 36% de la población total ($n=72$) (Tabla 10). Y solamente 1 camarón (1%) del total de animales, con colonias verdes dentro de la hepatopáncreas (Figura 29, e). En 30 camarones (41.7%) de la población total ($n=72$), hubo presencia de bacterias, tanto en hepatopáncreas como hemolinfa.

Figura 29

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 1

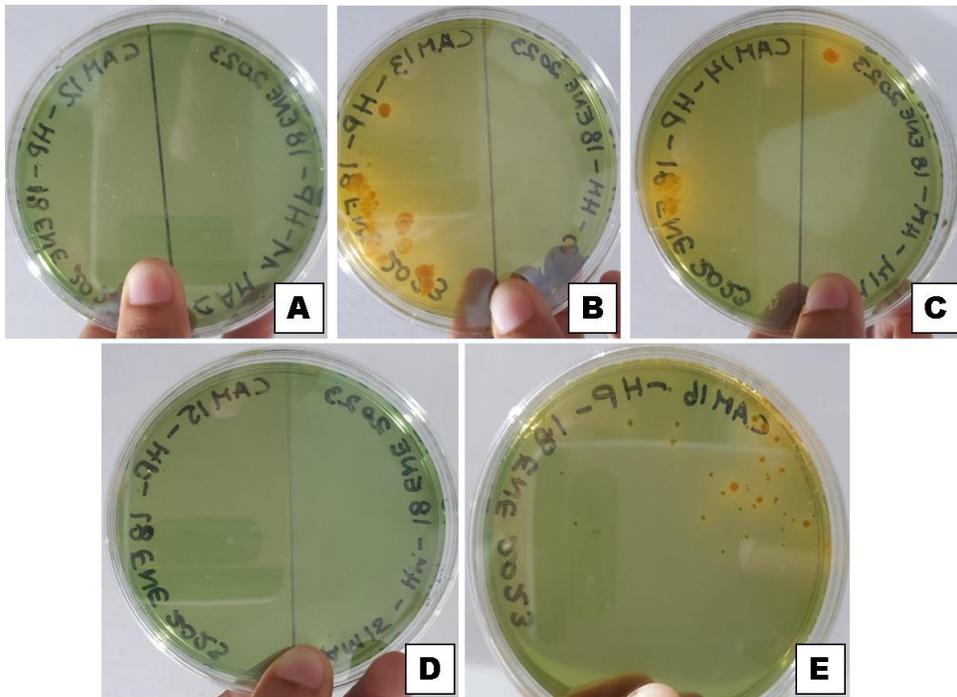


Figura 30

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 2

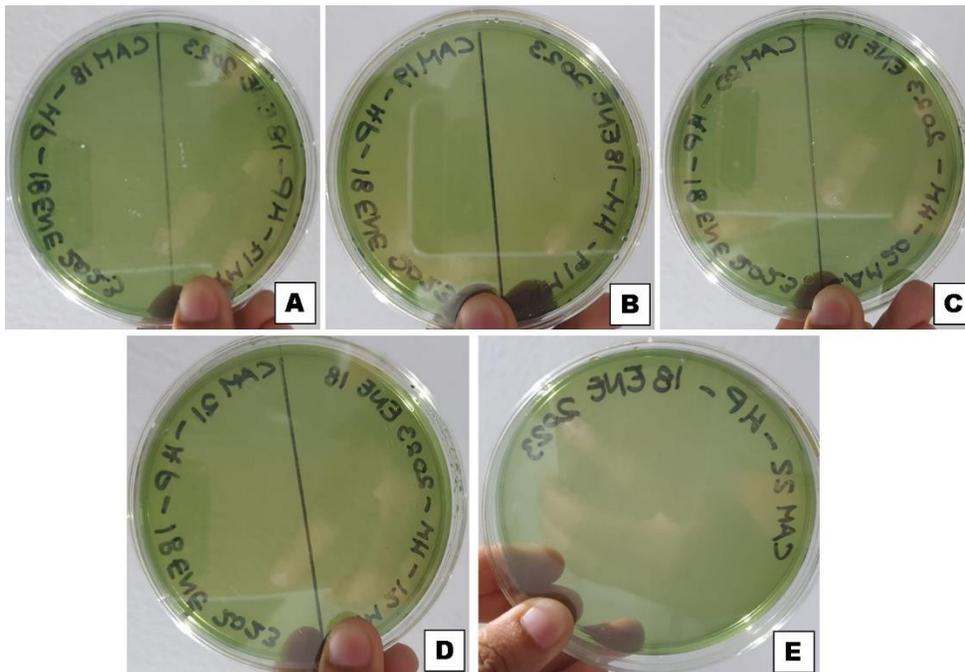


Figura 31

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 3

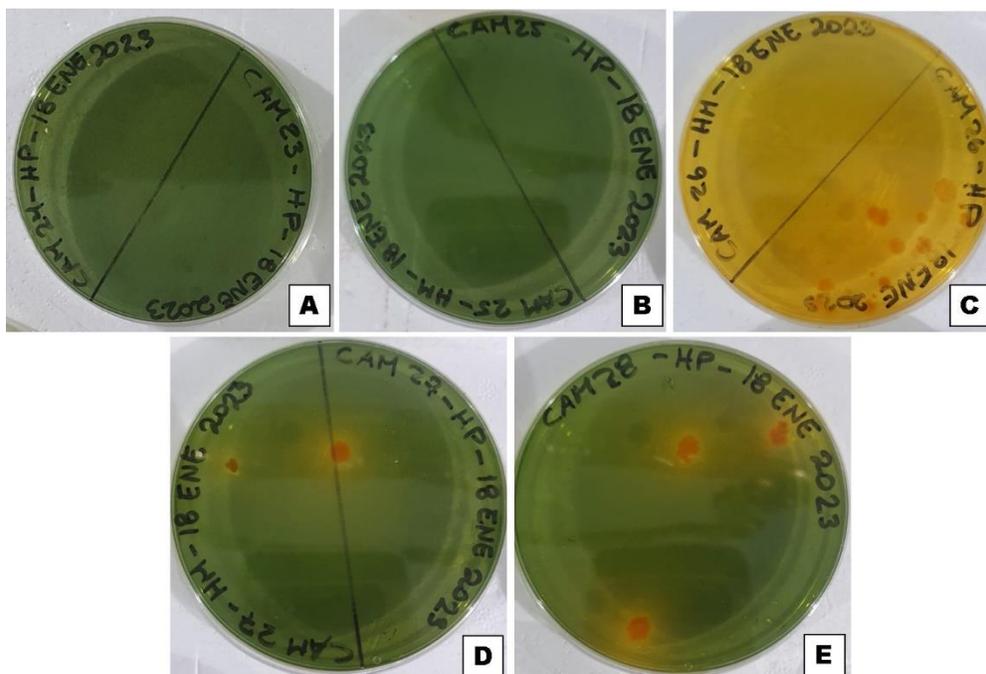


Tabla 4

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, de los acuarios 1, 2 y 3

N° Camarón	Etap	Acuario	Amar. HP UFC/g	Amar. HM UFC/mL	Verd. HP UFC/g	Verd. HM UFC/mL
16	Final	1	0	0	0	0
17	Final	1	0	0	0	0
18	Final	1	18	0	0	0
19	Final	1	5	1	0	0
20	Final	1	0	0	0	0
21	Final	1	18	0	16	0
22	Final	2	0	0	0	0
23	Final	2	0	0	0	0
24	Final	2	0	0	0	0

25	Final	2	0	0	0	0
26	Final	2	0	0	0	0
27	Final	2	0	0	0	0
28	Final	3	0	0	0	0
29	Final	3	0	0	0	0
30	Final	3	0	0	0	0
31	Final	3	15	0	0	0
32	Final	3	1	1	0	0
33	Final	3	3	0	0	0

HM = Hemolinfa

HP = Hepatopáncreas

Figura 32

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 4

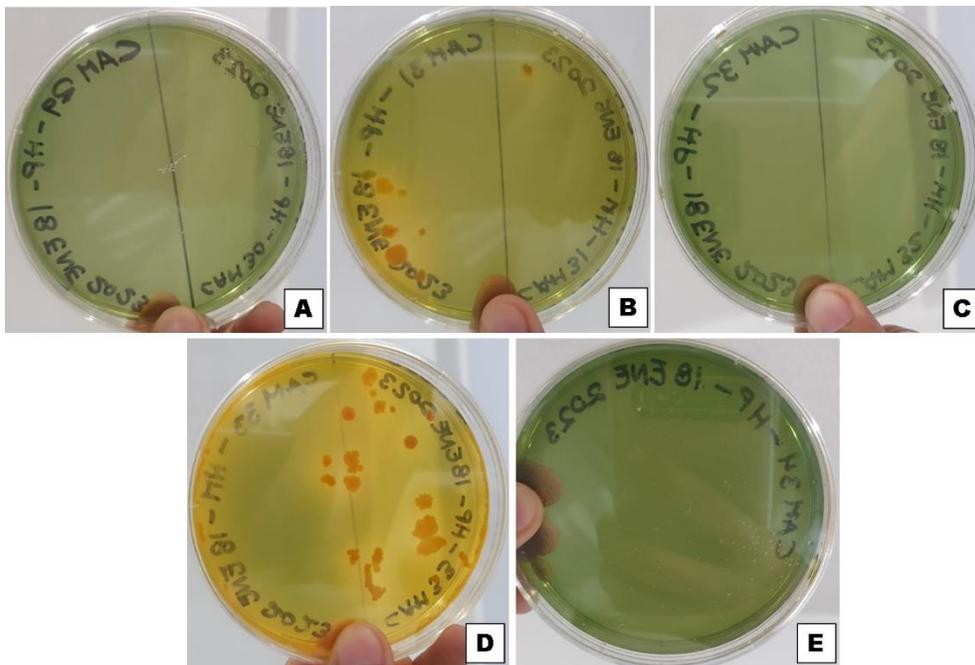


Figura 33

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 5

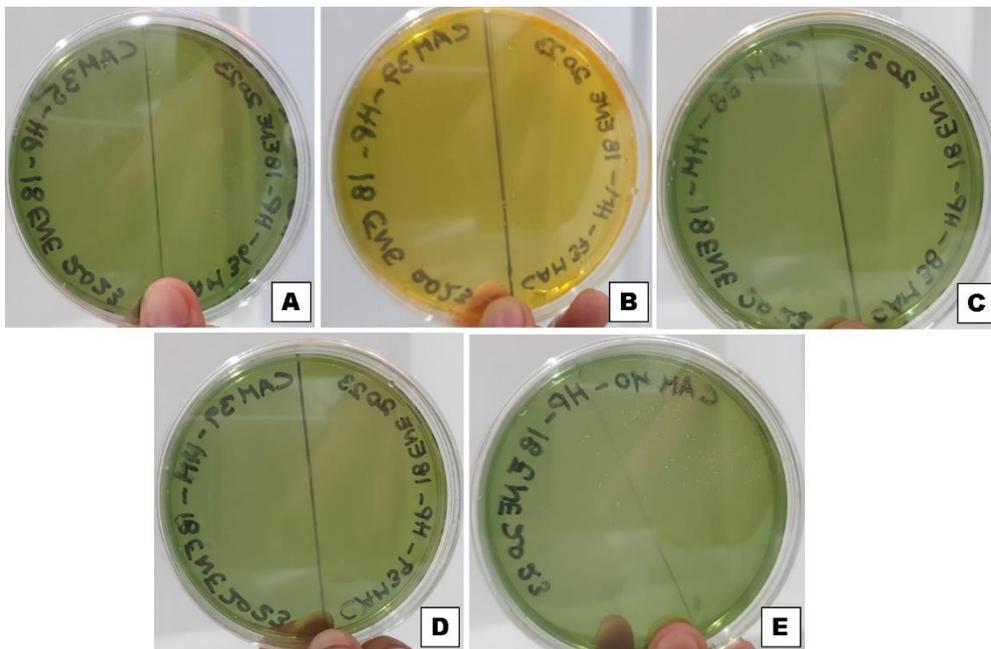


Figura 34

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 6

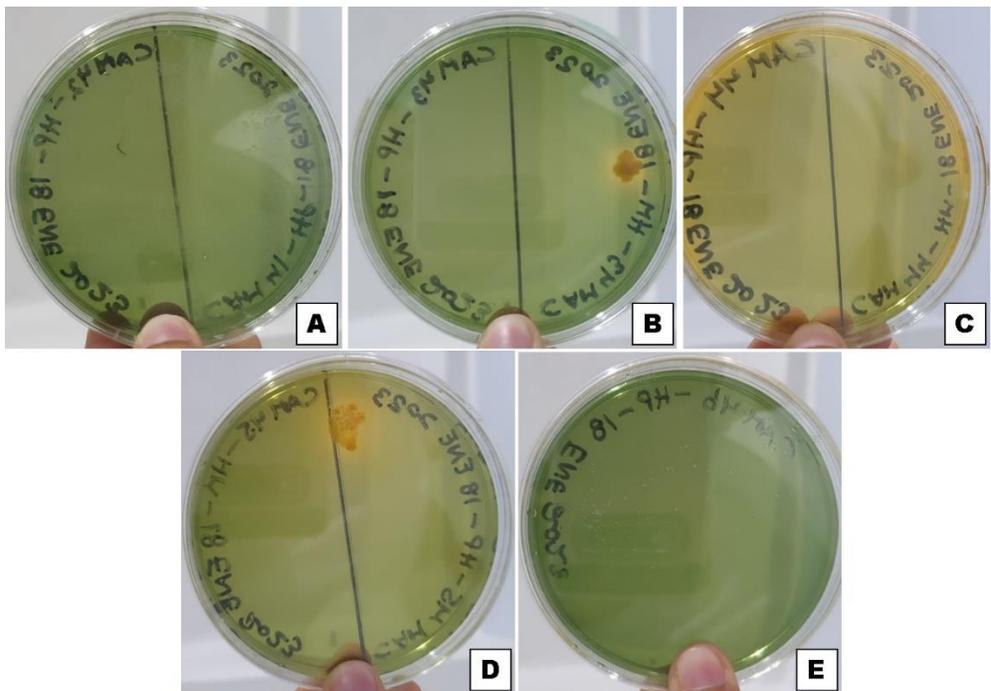


Tabla 5

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, de los acuarios 4, 5 y 6

N° Camarón	Etapa	Acuario	Amar. HP UFC/g	Amar. HM UFC/mL	Verd. HP UFC/g	Verd. HM UFC/mL
34	Final	4	34	0	0	0
35	Final	4	4	0	0	0
36	Final	4	0	0	0	0
37	Final	4	0	1	0	0
38	Final	4	0	3	0	0
39	Final	4	2	0	0	0
40	Final	5	0	0	0	0
41	Final	5	0	0	0	0
42	Final	5	14	5	0	0
43	Final	5	1	0	0	0
44	Final	5	0	2	0	0
45	Final	5	1	0	0	0
46	Final	6	0	0	0	0
47	Final	6	0	0	0	0
48	Final	6	0	0	0	0
49	Final	6	0	0	0	0
50	Final	6	0	0	0	0
51	Final	6	0	0	0	0

HM = Hemolinfa

HP = Hepatopáncreas

Figura 35

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 7

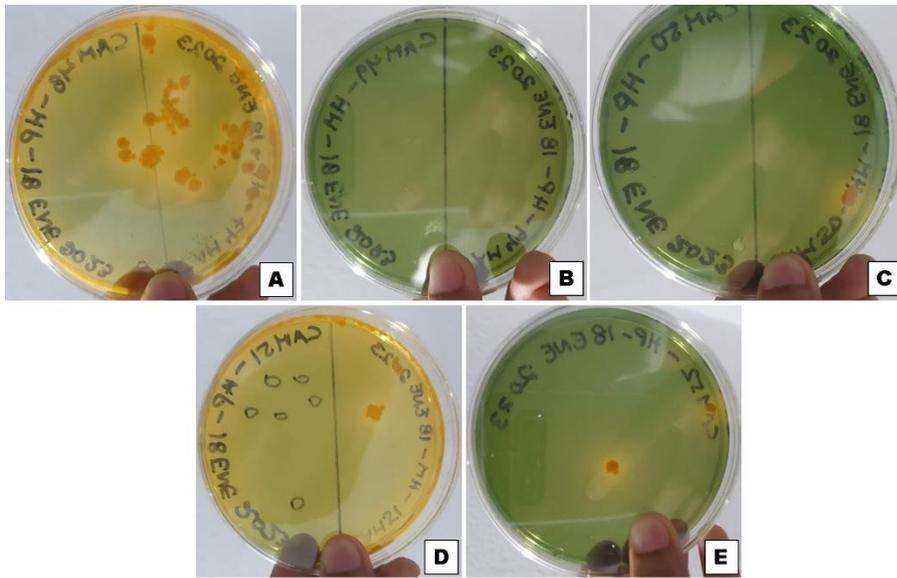


Figura 36

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 8

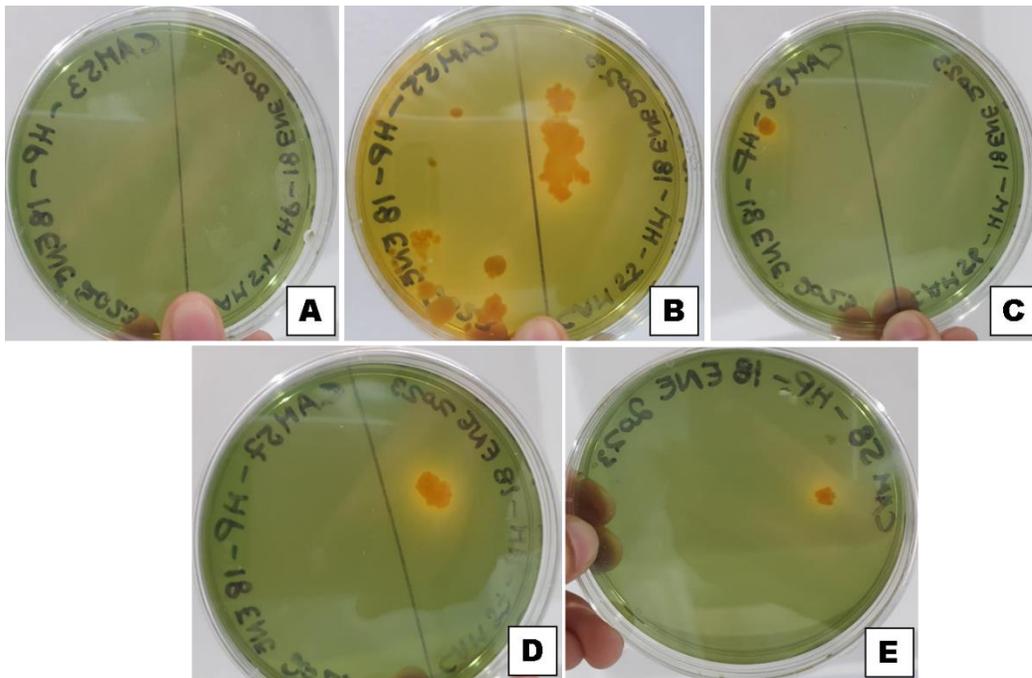


Figura 37

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 9

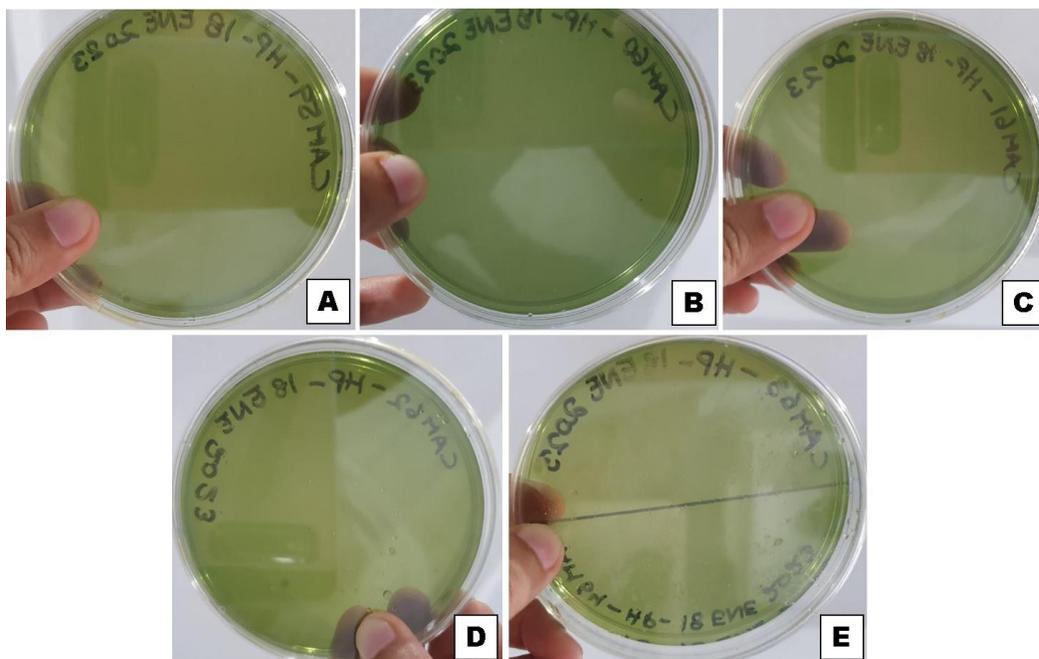


Tabla 6

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, de los acuarios 7, 8 y 9

N° Camarón	Fecha	Acuario	Amar. HP UFC/g	Amar. HM UFC/mL	Verd. HP UFC/g	Verd. HM UFC/mL
52	Final	7	0	0	0	0
53	Final	7	0	0	0	0
54	Final	7	7	1	0	0
55	Final	7	0	0	0	0
56	Final	7	15	3	0	0
57	Final	7	0	0	0	0
58	Final	8	0	0	0	0
59	Final	8	0	0	0	0

60	Final	8	0	0	0	0
61	Final	8	0	0	0	0
62	Final	8	0	0	0	0
63	Final	8	0	0	0	0
64	Final	9	0	0	0	0
65	Final	9	0	0	0	0
66	Final	9	0	1	0	0
67	Final	9	0	0	0	0
68	Final	9	1	0	0	0
69	Final	9	0	0	0	0

HM = Hemolinfa

HP = Hepatopáncreas

Figura 38

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 10

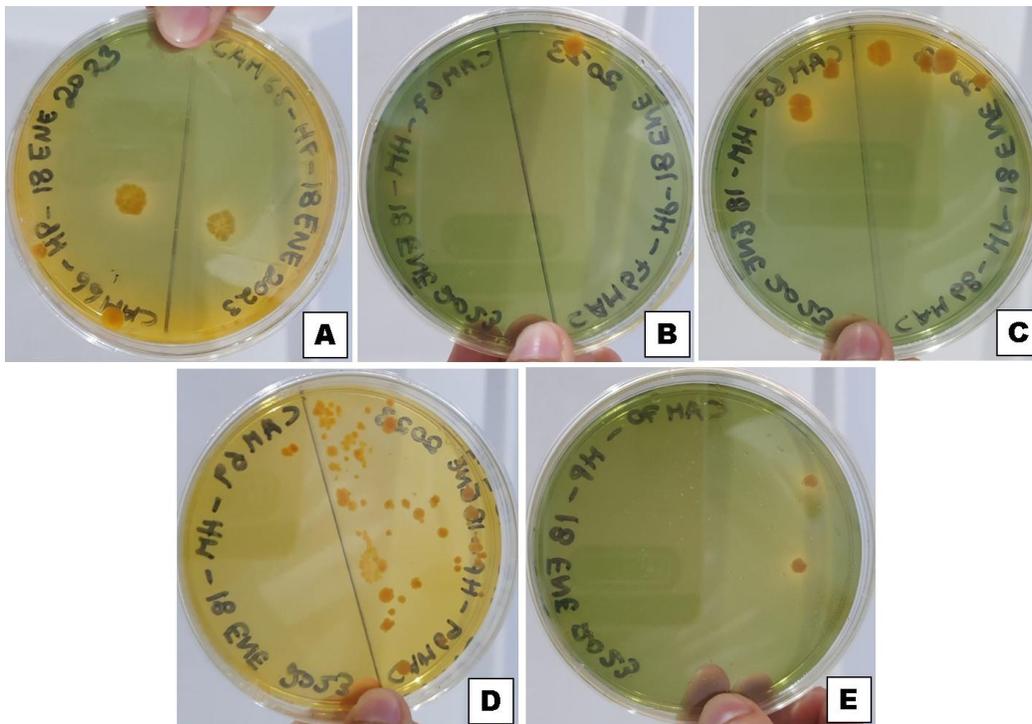


Figura 39

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 11

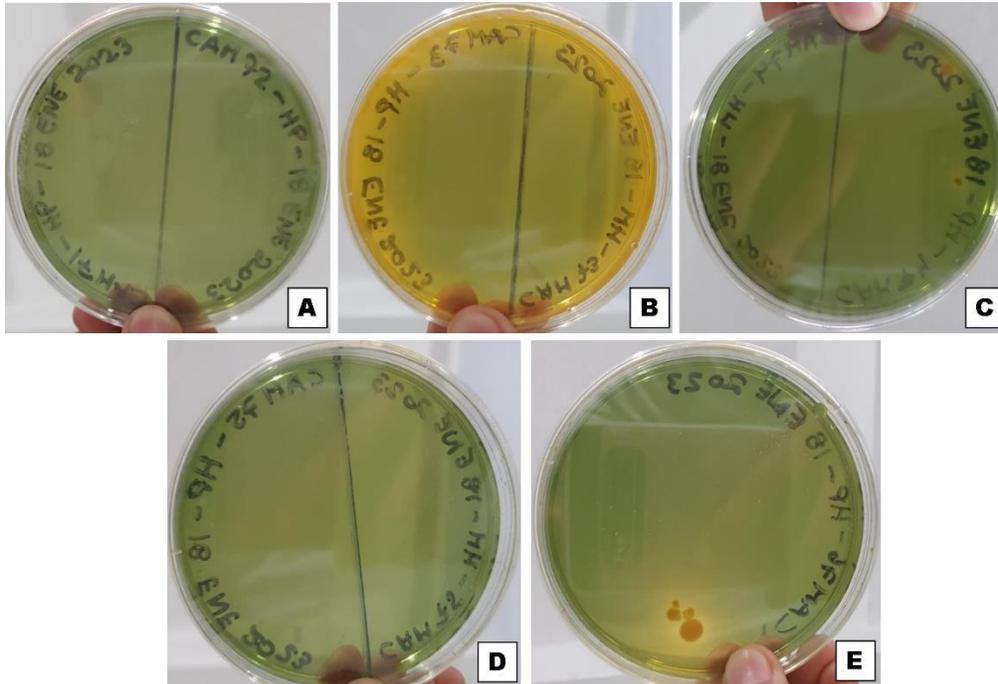


Figura 40

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas, cultivados en placas de agar TCBS, del acuario 12

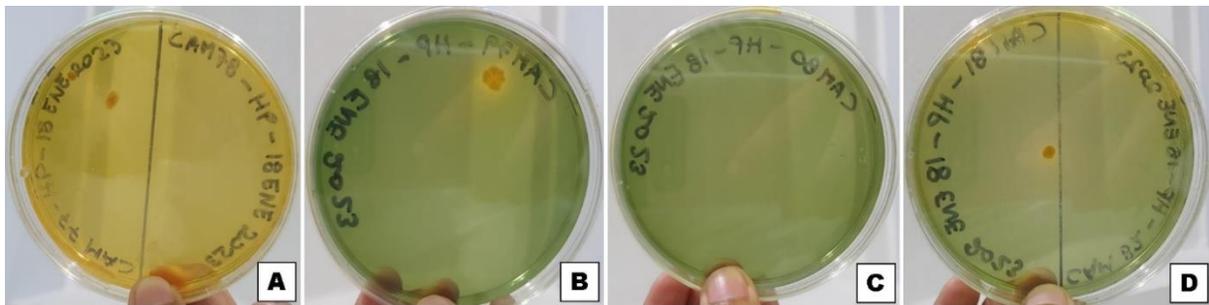


Tabla 7

Resultados finales de bacteriología de hepatopáncreas y hemolinfa, cultivados en placas de agar TCBS, de los acuarios 10, 11 y 12

N° Camarón	Fecha	Acuario	Amar. HP	Amar. HM	Verd. HP	Verd. HM
			UFC/g	UFC/mL	UFC/g	UFC/mL
70	Final	10	1	0	0	0
71	Final	10	3	0	0	0
72	Final	10	1	0	0	0
73	Final	10	4	2	0	0
74	Final	10	54	2	0	0
75	Final	10	2	0	0	0
76	Final	11	0	0	0	0
77	Final	11	0	0	0	0
78	Final	11	0	0	0	0
79	Final	11	2	0	0	0
80	Final	11	0	0	0	0
81	Final	11	4	0	0	0
82	Final	12	2	0	0	0
83	Final	12	0	0	0	0
84	Final	12	1	1	0	0
85	Final	12	0	0	0	0
86	Final	12	2	0	0	0
87	Final	12	0	0	0	0

HM = Hemolinfa HP = Hepatopáncreas

Tabla 8

Conversión de micro litros para hepatopáncreas y hemolinfa

	µL	g	g/µL
HP	10	1000	100
HM	50	1000	20

Tabla 9

Resumen de los resultados finales de bacteriología, cultivados en placas de agar TCBS, que presentaron colonias bacterianas en hepatopáncreas y hemolinfa

N° Camarón	Etapa	Acuario	Amar. HP UFC/g	Amar. HM UFC/mL	Verd. HP UFC/g	Verd. HM UFC/mL
18	Final	1	1800	0	0	0
19	Final	1	500	20	0	0
21	Final	1	1800	0	1600	0
31	Final	3	1500	0	0	0
32	Final	3	100	20	0	0
33	Final	3	300	0	0	0
34	Final	4	3400	0	0	0
35	Final	4	400	0	0	0
37	Final	4	0	20	0	0
38	Final	4	0	60	0	0
39	Final	4	200	0	0	0
42	Final	5	1400	100	0	0
43	Final	5	100	0	0	0
44	Final	5	0	40	0	0
45	Final	5	100	0	0	0
54	Final	7	700	20	0	0
56	Final	7	1500	60	0	0
66	Final	9	0	20	0	0
68	Final	9	100	0	0	0
70	Final	10	100	0	0	0
71	Final	10	300	0	0	0
72	Final	10	100	0	0	0
73	Final	10	400	40	0	0
74	Final	10	5400	40	0	0
75	Final	10	200	0	0	0
79	Final	11	200	0	0	0
81	Final	11	400	0	0	0
82	Final	12	200	0	0	0
84	Final	12	100	20	0	0
86	Final	12	200	0	0	0

HM = Hemolinfa

HP = Hepatopáncreas

Fórmula para sacar el porcentaje de la cantidad de camarones con presencia de colonias:

N = N° total de camarones analizados

$$\% = \frac{\text{N° camarones con presencia de colonias}}{\text{N muestra}} \times 100$$

Tabla 10

Resultados de la cantidad de camarones con presencia de colonias en la etapa final del proyecto

N = 72	N° camarones	%
Camarones con HP con colonias amarillas	26	36.1%
Camarones con HP con colonias verdes	1	1.4%
Camarones con HM con colonias amarillas	11	15.3%
Camarones con HM con colonias verdes	0	0.0%
Camarones con bacterias en HP y HM	30	41.7%

HM = Hemolinfa HP = Hepatopáncreas

Tabla 11

Resumen de conteos de colonias y la respectiva prevalencia

TRATAMIENTO	UFC/mL	UFC/0.1 mL	PREVALENCIA (%)	
	Amar. HP	Amar. HM	Amar. HP	Amar. HM
INICIO	0,0E+00	0,0E+00	0,0%	0,0%
FINAL	2,99E+05	6,11E+03	36,1%	15,3%

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

3.1.2 Pruebas iniciales de PCR para EMS/AHPND

Al inicio del estudio los camarones presentaron infección natural por las bacterias causantes de EMS/AHPND, con una prevalencia del 60% (n=15). A pesar de no presentar signos clínicos ni presencia de crecimiento de colonias bacterianas (Figura 27 y Figura 28), se

corroboró la presencia de la vibriosis a través de técnicas moleculares estos 15 camarones examinados individualmente como se observa en la Tabla 12 (Anexo 1 y Anexo 2).

Tabla 12

Resultados iniciales de PCR, AHPND (EMS) en hepatopáncreas, de los primeros 15 camarones

N° Camarón	Fecha	Día de tratamiento	Origen	Resultado AHPND (EMS)	Método empleado
1	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
2	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
3	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
4	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
5	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
6	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
7	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
8	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
9	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
10	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
11	18-dic-22	0	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
12	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
13	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
14	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS
15	18-dic-22	0	HP	Positivo	PCR IQ PLUS

HP = Hepatopáncreas

3.1.3 Pruebas finales de PCR para EMS/AHPND

No se detectó EMS mediante la técnica de PCR en los camarones examinados al final del experimento (revisados por PCR el 33% de cada acuario), lo que sugiere depuración "total" de dichas bacterias por parte de un sistema inmune activo y eficiente (Tabla 13 y Anexo 3).

Tabla 13

Resultados finales de PCR, AHPND (EMS) en hepatopáncreas, de los últimos 12 camarones

N° Camarón	Fecha	Acuario	Día de tratamiento	Origen	Resultado AHPND (EMS)	Método empleado
16	18-ene-23	1	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
17	18-ene-23	1	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
22	18-ene-23	2	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
23	18-ene-23	2	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
28	18-ene-23	3	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
29	18-ene-23	3	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
52	18-ene-23	7	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
53	18-ene-23	7	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
58	18-ene-23	8	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
59	18-ene-23	8	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
64	18-ene-23	9	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS
65	18-ene-23	9	30	HP	Negativo	PCR IQ PLUS

HP = Hepatopáncreas

3.1.4 Análisis del crecimiento de los camarones

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por medio de las medias de los pesos promedios (Tabla 16), las cuales presentaron un coeficiente de variación similarmente bajo (4 - 6%) entre el inicio como al final, de acuerdo con el Anexo 4.

Tabla 14

Biometría peso promedio inicial, final, ganancia promedio y ganancia total del peso por acuario

ACUARIO	PESO INICIAL	PESO FINAL	GANANCIA G.	GANANCIA MEDIA
1	4.1	5.3	1.2	1.1±1.0
2	4.0	5.4	1.5	
3	4.9	5.7	0.8	

4	4.8	5.7	0.9
5	4.9	5.7	0.8
6	4.5	5.9	1.4
7	4.8	5.8	1.0
8	4.6	5.8	1.3
9	5.2	6.3	1.1
10	5.1	6.3	1.2
11	4.9	6.4	1.5
12	5.7	6.5	0.7

Tabla 15

Biometría de pesos por acuario

PROMEDIO DE PESOS

<i>Inicial</i>	<i>Final</i>
4.1	5.3
4.0	5.4
4.9	5.7
4.8	5.7
4.9	5.7
4.5	5.9
4.8	5.8
4.6	5.8
5.2	6.3
5.1	6.3
4.9	6.4
5.7	6.5

Tabla 16

Peso promedio por acuario durante el proyecto

Etapa **Peso promedio g.**

Inicio	4.79 ± 0.46
Final	5.90 ± 0.39

Al finalizar el proyecto el 66% de las unidades experimentales tuvieron una mayor cantidad de mudas (Gráfica 2). Así mismo, el 66% de las unidades experimentales tuvieron un mayor consumo de alimento balanceado (Gráfica 3).

Tabla 17

Número de mudas por acuario

ACUARIO	TOTAL MUDAS	PROMEDIO DE MUDAS
1	12	12.25 ± 3.3
2	6	
3	12	
4	18	
5	15	
6	8	
7	12	
8	15	
9	13	
10	10	
11	15	
12	11	
TOTAL	147	

Tabla 18

Total y promedio de mudas durante el proyecto

MUDAS

Total de Mudas	Promedio de Mudas
147	12.25 ± 3.3

Gráfica 2

Gráfica de mudas totales al final del proyecto y por acuario

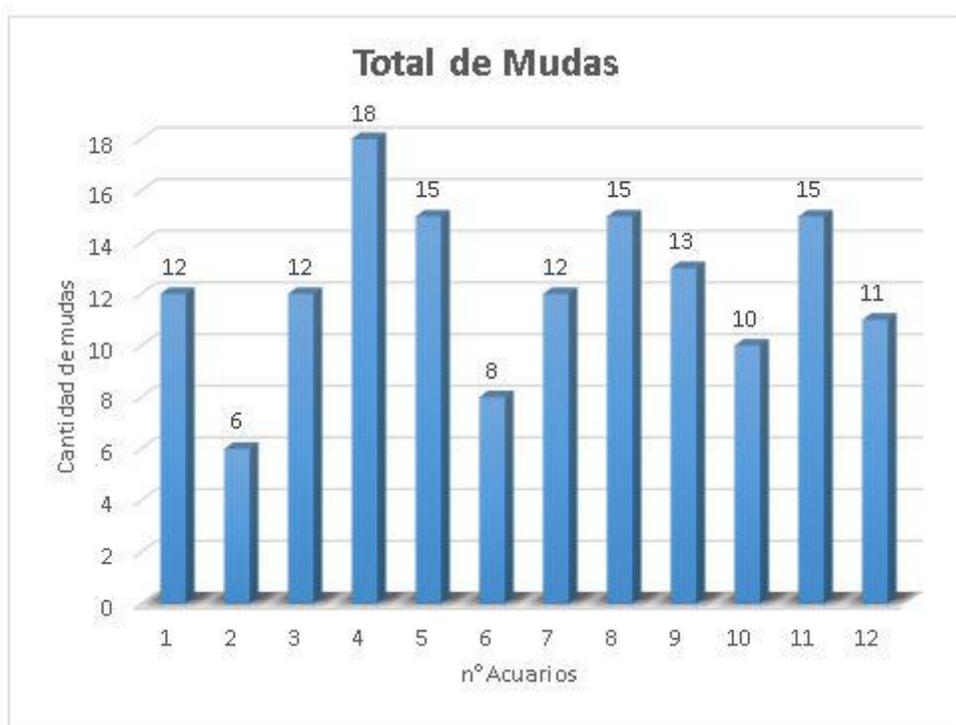


Tabla 19

Peso total de los pellets suministrados diariamente por hora y por acuario durante los 30 días

ACUARIO	PESO TOTAL			PESO TOTAL
	7 A.M	3 P.M	11 P.M	
1	6.40	6.24	6.02	18.66
2	6.30	6.26	6.30	18.86
3	6.46	6.28	6.32	19.06
4	6.22	6.34	6.36	18.92
5	6.34	6.24	6.30	18.88
6	6.24	6.34	6.50	19.08

7	6.40	6.40	6.46	19.26
8	6.46	6.46	6.42	19.34
9	6.44	6.46	6.36	19.26
10	6.34	6.52	6.36	19.22
11	6.46	6.48	6.48	19.42
12	6.38	6.52	6.40	19.30

Gráfica 3

Gráfica de pesos totales del alimento suministrado al final del proyecto y por acuario



3.1.5 Presencia de signos clínicos y mortalidad

Al finalizar el proyecto, el 58% de las unidades experimentales tuvieron un 100% de sobrevivencia. El 33% presentó 83% de supervivencia y el 9% restante tuvo 67% de sobrevivencia (Tabla 21).

Se extrajeron sólo 6 animales muertos durante los 30 días del proyecto, siendo un 8% del total de los animales con los que se experimentó (Tabla 20). Se tuvo un 91,7% de supervivencia durante todo el bioensayo (Tabla 22). Se visualizó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) por medio de las medias de supervivencia final e inicial de los acuarios (Anexo 17).

Tabla 20

Número de muertos de cada acuario durante los 30 días

MORTALIDAD	
Acuario	Muertos
1	0
2	1
3	1
4	1
5	0
6	0
7	0
8	0
9	2
10	1
11	0
12	0

Tabla 21

Número de animales al inicio y al final del proyecto y el porcentaje de supervivencia por acuario

ACUARIO	n Inicial	n Final	Sobrevivencia %
1	6	6	100
2	6	5	83

3	6	5	83
4	6	5	83
5	6	6	100
6	6	6	100
7	6	6	100
8	6	6	100
9	6	4	67
10	6	5	83
11	6	6	100
12	6	6	100

Tabla 22

Porcentaje de sobrevivencia, promedio de sobrevivencia al inicio y al final del proyecto

SOBREVIVENCIA

Inicio	Final	Sobrevivencia (%)
6.00 ± 0.00	5.50 ± 0.67	91.7%

3.1.6 Análisis de los parámetros químicos: oxígeno disuelto, temperatura, salinidad, amonio, alcalinidad, nitrato y pH.

Se mantuvo un promedio de salinidad ideal tanto en el día como en la noche para la especie cultivada (Tabla 24). No se vio grandes diferencias significativas ($P \leq 0.05$) a través de las medias de salinidad de la mañana con respecto a la de la tarde durante todo el proyecto (Anexo 18).

Tabla 23

Promedio de parámetro de salinidad de mañana y tarde de cada acuario

Salinidad (ppt)

A.M	P.M
28	28
28	28
28	28
29	29
29	29
29	29
29	29
29	29
29	29
29	29
30	29
30	30

Tabla 24

Promedio de salinidad de la mañana y tarde durante el proyecto

Salinidad (ppt)

A.M	28.92 ± 0.67
P.M	28.83 ± 0.58

Las mediciones de oxígeno disuelto de la mañana con respecto a las de la tarde, evidenciaron una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) durante el proyecto, puesto que sus medias no fueron parecidas (Anexo 19).

Tabla 25

Promedio de parámetro de oxígeno disuelto de la mañana y tarde por acuario

Oxígeno Disuelto (mg/L)

A.M	P.M
6.90	6.89
6.62	7.18
6.67	6.73
6.56	6.64

6.53	6.93
6.51	6.80
6.62	7.06
6.56	6.70
6.46	6.94
6.52	6.94
6.45	7.16
6.44	7.30

Tabla 26

Promedio de oxígeno disuelto de la mañana y tarde durante el proyecto

Oxígeno Disuelto (mg/L)

A.M	6.57 ± 0.13
P.M	6.94 ± 0.21

La temperatura media de la mañana con respecto a la de la tarde tuvo valores significativamente menores ($P \leq 0.05$), así lo muestra el análisis de varianza del Anexo 20. Las medias de los valores de pH de la mañana y la tarde, presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) (Anexo 21).

Tabla 27

Promedio de parámetros de temperatura y pH de cada acuario

Temperatura (°C)		pH	
A.M	P.M	A.M	P.M
26.2	26.9	8.35	8.33
26.1	26.8	8.36	8.29
26.1	26.1	8.35	8.34
26.0	26.1	8.34	8.35

26.0	26.6	8.33	8.34
26.0	26.4	8.33	8.31
26.0	26.6	8.34	8.34
25.9	26.3	8.36	8.37
25.9	26.4	8.36	8.35
25.9	26.4	8.36	8.33
25.9	26.6	8.35	8.32
25.9	26.5	8.35	8.32

Tabla 28

Promedio de temperatura y pH durante el proyecto

TEMPERATURA Y PH

	Temperatura	pH
A.M	25.99 ± 0.10	8.35 ± 0.01
P.M	26.48 ± 0.25	8.33 ± 0.02

Los valores de nitratos y amonio, fueron cero durante todo el estudio. Los valores medios de alcalinidad fueron los mismo durante todo el tiempo que duró el bioensayo.

3.2 Análisis de costos

El proyecto tiene como objetivo usar el protocolo de remisión bacteriana de EMS/AHPND como una medida preventiva o curativa, para lo cual se proporcionará una asesoría en las instalaciones de las camaroneras y laboratorios de larvas de camarón. El servicio incluye inspecciones en el sitio, análisis de datos y la entrega final de un informe final con observaciones y recomendaciones.

Costos de la asesoría:

- El costo de la asesoría será diario
- La duración dependerá de la complejidad de las instalaciones y las necesidades específicas del proyecto
- El número de días se calculará de acuerdo con el tiempo necesario para llevar a cabo la inspección y la elaboración del informe final

Costos adicionales:

- Los costos adicionales relacionados con las mejoras del sitio, adquisición de suministros o equipos específicos para la implementación del protocolo correrán por cuenta del cliente
- Estos costos adicionales serán determinados y gestionados directamente por el cliente, en consulta con el asesor del proyecto

Es fundamental destacar que el éxito de la implementación del protocolo de remisión bacteriana EMS/AHPND, depende en gran medida de la colaboración y el compromiso del cliente. Además de los costos mencionados anteriormente, es responsabilidad del cliente asegurar la disponibilidad de los recursos necesarios y realizar cualquier mejora pertinente en las instalaciones.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y Recomendaciones

4.1.1 Conclusiones

Bacteriología:

1. Se sugiere acerca de la carga bacteriana presente por EMS/AHPND con la que los camarones llegaron del CENAIM era muy bajita, debido a que se detectó por PCR infección por bacterias causantes de EMS/AHPND (sensibilidad: 10 copias de DNA bacteriano en 50 mg de muestra) y a que:
 - a. No se observaron signos clínicos
 - b. No se presentó mortalidad importante durante la aclimatación en la sala de bioensayos
 - c. Por bacteriología, no se presentó crecimiento de colonias en agar TCBS
2. Se evidenció mediante bacteriología en agar TCBS y PCR para EMS/AHPND, remisión “completa” de la infección por cepas patógenas de las especies de *Vibrio* causantes de esta enfermedad.
3. Al terminar el estudio, no se presentó crecimiento de colonias verdes en hemolinfa o HP, en los 72 camarones experimentales. Sin embargo, sí hubo crecimiento de colonias amarillas, con conteos bajos ($<3,0E+02$) al final. La prevalencia entre los camarones con crecimiento de colonias amarillas, fue alta (36%).
4. De lo anterior se concluye que al final del estudio, los camarones estaban presentando una Vibriosis insipiente por bacterias Sucrosa positiva (colonias amarillas), no asociada con la enfermedad EMS/AHPND.

5. La ausencia de colonias verdes al terminar el estudio, sugiere que hubo “total” remisión de las bacterias causantes de EMS/AHPND, de acuerdo con la cepa de *V. parahaemolyticus* reconocida por la WOA (OIE) como causante de la enfermedad.

PCR:

1. Mediante PCR, se confirmó que los camarones que se recibieron del CENAIM, tenían infección natural por la cepa bacteriana causante de EMS/AHPND.
2. A pesar de estar infectados con EMS/AHPND desde su origen, los camarones no presentaron enfermedad subclínica, ni presencia de signos clínicos, ni mortalidad.
3. El hecho de que fueron PCR positivos a EMS y no hubiera crecimiento en TCBS, sugiere una carga bacteriana extremadamente baja en el HP, que fue apenas detectable.
4. El manejo del agua utilizado en el presente estudio, permitió obtener resultados homogéneos y sin diferencias significativas en el desempeño fisiológico y productivo que fue consistente en todas las unidades experimentales.

Biometría y Crecimiento:

1. Las abundantes mudas observadas durante el estudio, sugieren que los camarones presentaron buena salud y crecimiento permanente, presumiblemente debido a lo siguiente:
 - a. Disponibilidad y calidad alta de la dieta que se utilizó, favoreciendo el crecimiento y las funciones fisiológicas de los animales.
 - b. La condición del agua, incluyendo salinidad y concentración de oxígeno disuelto, pudieron afectar positivamente la salud de los organismos.

- c. Niveles bajos de estrés, ya que se evitaron cambios bruscos en las condiciones físico-químicas del experimento, del entorno y por manipulación.
2. El tipo de alimento que se suministró con un alto nivel de proteína (35%), el tamaño de pellet adecuado para la talla (\varnothing 1.5 mm) y la frecuencia de 3 raciones al día, cubrieron los requerimientos nutricionales de los camarones.
3. El 66% de las unidades experimentales presentó un mayor consumo de alimento y cantidad de mudas, lo que sugiere un manejo adecuado de la alimentación.
4. Más del 60% de las unidades experimentales (66%) presentó buen consumo de alimento, lo que sugiere que sus procesos digestivos estuvieron funcionando correctamente sin que hubiera daños en el HP a causa de EMS/AHPND.
5. Al inicio del proyecto, el peso promedio por acuario fue de 4.79 ± 0.46 , mientras que al final fue de 5.90 ± 0.39 . Esto indica una ganancia media de peso de 1.11 g entre el inicio y el final del proyecto.
6. El coeficiente de variación bajo (4-6%) en los pesos promedio tanto al inicio como al final del proyecto, indica que los datos presentan una dispersión reducida alrededor de la media. Esta baja variabilidad aumenta la confiabilidad y consistencia de los resultados.

Sobrevivencia:

1. La mortalidad tan baja en las 12 unidades experimentales demuestra un manejo cuidadoso de las condiciones durante los 30 días del estudio.
2. La sobrevivencia alta indica que a pesar de la infección demostrada con EMS/AHPND, no se presentó esta enfermedad ni algún otro patógeno letal en los camarones.

3. Durante el estudio no hubo mortalidad por EMS/AHPND, probablemente debido a una o varias de las siguientes opciones:

- a. Carga bacteriana infectante muy baja (apenas detectable por PCR pero no por bacteriología de rutina en medios sólidos)
- b. Sistema inmune eficiente
- c. Mínima presencia de materia orgánica en las unidades experimentales debido al alto recambio y frecuente sifoneo, reduciendo así el sustrato orgánico necesario para el crecimiento de bacterias patógenas
- d. Posible procedencia de líneas genéticas de alta resistencia a EMS/AHPND
- e. Control adecuado de parámetros físico-químicos permanentemente en las unidades experimentales, con lo cual el estrés fue mínimo.

Parámetros físico-químicos:

1. Se controlaron los parámetros físico-químicos requeridos por la especie para mantenerla bajo condiciones ideales de cultivo (cero estrés ambiental = sistema inmune activo).

2. Se consiguió de manera constante una concentración supra óptima de oxígeno disuelto con un rango entre 6.57 ± 0.13 y 6.94 ± 0.21 durante todo el estudio, favoreciendo todas las funciones fisiológicas de los camarones incluido consumo de alimento, digestión y respuesta inmune.

3. Se evitó la acumulación de compuestos nitrogenados tóxicos (amonio y nitritos) para el camarón, a partir de recambios diarios que evitaron el estrés toxigénico.

En conclusión, se logró cumplir con los objetivos planteados para este estudio, habiendo validado y demostrado la efectividad del protocolo publicado por Cuéllar-Anjel y Brock (2018), en cuanto a su uso profiláctico y curativo para la remisión de la infección por bacterias causantes de EMS/AHPND en camarones pre-adultos *P. vannamei*.

Mediante el sistema de bioensayos y bajo condiciones controladas, se logró una reducción “total” de las bacterias causantes de EMS/AHPND en los camarones infectados, evidenciada mediante la técnica de PCR. Además, los camarones adultos mostraron un aumento promedio de peso de 1.1 g y una alta supervivencia (91%) durante los 30 días del estudio. Es importante destacar que el protocolo se adaptó para camarones pre-adultos, a partir del protocolo para postlarvas (en raceways) descrito por Cuéllar-Anjel y Brock (2018), quienes obtuvieron una supervivencia del 67% en tanques enfermos por EMS/AHPND frente a 80% en tanques no infectados. Este evento ocurrió en raceways y hubo varios elementos diferentes:

- a) Se presentaron signos clínicos
- b) Se presentó mortalidad
- c) Se confirmó la enfermedad por PCR e histopatología

Habiendo sufrido enfermedad y mortalidad en dicho estudio, reportan que hicieron correctivos realizando el protocolo validado en esta tesis y luego pudieron obtener 67% de supervivencia contra 80% en los tanques no afectados por la enfermedad.

En nuestro estudio se usó el mismo protocolo como base de referencia, siendo considerado una medida preventiva al controlar la calidad del agua y fondo desde el principio, no permitiendo la presencia de materia orgánica y residuos de materia orgánica. Y una medida

curativa ya que, partiendo de camarones infectados, se evitó que se presentara la enfermedad al aplicar el protocolo de Cuéllar-Anjel y Brock (2018).

Además, con el presente estudio se corroboró la hipótesis planteada por Cuéllar-Anjel y Brock (2018), respecto a la patogénesis de la enfermedad. Esta sostiene que “las bacterias causantes de EMS/AHPND, colonizan las partículas orgánicas de la columna de agua y del fondo. Las bacterias liberan e impregnan de toxinas las partículas orgánicas y cuando el camarón se alimenta de ellas, se “envenena” y dichas toxinas van al hepatopáncreas causando un daño agudo (en muy poco tiempo)”.

Gracias a los recambios y sifoneos diarios, se redujo la carga de materia orgánica y por ende las bacterianas causantes de EMS/AHPND, evitando ingesta de toxinas por parte de los camarones y su consiguiente fase de enfermedad aguda.

Estos resultados destacan la efectividad y relevancia del protocolo de Cuéllar-Anjel y Brock (2018) en postlarvas y que en esta tesis fue adaptado a camarones pre-adultos, brindando una estrategia prometedora para futuras investigaciones y prácticas en el campo tendientes a la prevención y/o control de la EMS/AHPND.

4.1.2 Recomendaciones

Se recomienda continuar con la práctica de un alto recambio y alto sifoneo para reducir la presencia de materia orgánica en las unidades experimentales o en el cultivo. La reducción de sustrato orgánico ayudará a disminuir el crecimiento de bacterias infecciosas y mejorar la salud general de los camarones.

Se sugiere proporcionar una dieta adecuada que cubra todos los requerimientos nutricionales contribuirá a mantener un buen crecimiento y salud en los camarones.

Se sugiere mantener un registro detallado y sistemático de los valores de los parámetros físico – químicos a lo largo del tiempo, ya que esto permitirá un análisis más profundo de los resultados y facilitará la toma de decisiones para mejorar el cultivo en el futuro.

Se sugiere mantener un monitoreo continuo de la carga bacteriana en los camarones para detectar cualquier signo temprano de infección. La vigilancia regular permitirá tomar medidas preventivas en caso de que haya repunte de la infección.

Se recomienda reforzar las medidas de bioseguridad en el manejo de los camarones. Esto incluye la limpieza y desinfección adecuadas de las instalaciones y equipos, así como el control de posibles fuentes de contaminación bacteriana.

Se recomienda mantener y seguir aplicando el mismo manejo para mantener la estabilidad y el rendimiento productivo en futuros proyectos o cultivos. Además, un ambiente óptimo y estable es esencial para reducir la susceptibilidad a enfermedades y garantizar una alta sobrevivencia.

Se recomienda la capacitación y formación adecuada del personal encargado del cultivo en el manejo de los parámetros físico-químicos. Un conocimiento sólido permitirá un monitoreo y ajuste preciso de las condiciones, lo que favorecerá el éxito del cultivo.

Referencias

- Aguilera-Pesantes, D., Castro, J., Bucheli, P., & Vargas, D. (2022). Biotecnología para el control de patologías de origen bacteriano en los cultivos de camarón. Estudio de caso de utilización de bacteriófagos líticos endémicos contra *Vibrio parahaemolyticus*. *REVISTA AQUACULTURA* 150, 39.
- Arzola González, J. F., Flores Campaña, L. M., Izabal Ceja, A., & Gutiérrez Rubio, Y. (2008). Crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un estanque rústico a baja salinidad. *Revista AquaTIC*, 8-15.
- Bullet, S. (2023). Early mortality syndrome. *Fish site*.
- CAMAE, C. M. (22 de Mayo de 2023). *CAMAE*. Obtenido de Cámara Marítima del Ecuador: <http://www.camae.org/exportaciones/exportaciones-de-camaron-superaron-por-primera-vez-al-petroleo-sin-refinar/>
- Cardona, D. (31 de Octubre de 2016). *Medicina Micronutricional*. Obtenido de <http://www.metododoctorcardona.com/blog/posible-la-remision-las-enfermedades-cronicas/>
- Carranza, É. O. (2020). Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno del *Penaeus vannamei* con relación a la salinidad, temperatura y peso corporal. *Revista Ciencia Y Tecnología*, 55–65.
- CNA, C. N. (2023). *Análisis de las Exportaciones de Camarón ENERO - 2023*. Ecuador: Estadísticas CNA.
- Consult, G. (2010). *Levantamiento de la estructura de costos de producción y su* . Ministerio de Coordinación de la Producción, Empleo y Competitividad.
- Cuéllar-Anjel, A. J. (2015). Vibriosis. *The Center for Food Security & Public Health*, 1–5.
- Cuéllar-Anjel, J. (2018). Enfermedades de potencial riesgo económico para la camaronicultura en Venezuela. *ACUIPESCA Magazine (Venezuela)*.
- Cuéllar-Anjel, J. a. (2018). Clinical case report: EMS/AHPND outbreak in Latin America. *Global Aquaculture Advocate*.
- Cuéllar-Anjel, J. V. (2014). Buenas prácticas y bioseguridad para el cultivo del camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. En *Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones* (pág. 382). Panamá: OIRSA-OSPESCA-SICA.
- Cuéllar-Anjel, J., & Peña, L. (2019). *VIBRIOSIS EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO Penaeus vannamei REPORTE DE CASO*. Maracaibo - Venezuela.

- Donald V., L., Lightner, & H., D. (1975). A Septicemic Bacterial Disease Syndrome Penaeid Shrimp. *Marine Fisheries Review, Volumen 37*, 5-6.
- Escobar, D., Nieto, C., Muñoz, M., & Burgos, F. (22 de Noviembre de 2021). *ZENODO*. Obtenido de <https://zenodo.org/record/5789705>
- Fonseca Moreno, E. (5 de Mayo de 2010). *REDVET*. Obtenido de Revista Electrónica de Veterinaria: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613160011>
- Fonseca Moreno, E., González Salas, R., & Rico Gutiérrez, R. (2013). *Revista AquaTic*. Obtenido de Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura: <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/99>
- Gómez-Gil, B. T.-M.-F. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture, 163*, 1-9.
- Gonzabay-Crespin, Á. N., Vite-Cevallos, H. A., Garzón-Montealegre, V. J., & Quizhpe-Cordero, P. F. (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*, DOI: 10.23857/pc.v6i9.3093.
- Gonzabay-Crespin, Á. N.-C.-M.-C. (Septiembre de 2021). *Polo del conocimiento*. Obtenido de <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/3093/0>
- Guzmán-Hernández, R., Hernández-Vélez, R., & Contreras-Rodríguez, Á. (2016). *Revista chilena de infectología*. Obtenido de *Vibrio fluvialis*: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400011>
- Jamil, Moreira Zambrano, G. G., & Bastidas Sánchez, C. (2021). *Análisis de ciclo de vida del camarón cultivado de la especie Litopenaeus vannamei en la provincia del Guayas (tesis)*. Guayaquil.
- Lightner, D. V. (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC handbook of mariculture*, 393-486.
- Lodeiros, C., & Castañeda, J. (2023). ¿Sabías que desde el 2010, la salinidad recuperó su unidad? *Aquacultura, 29*.
- M. C. L. Baticados, C. R.-P.-L. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, 133-139.
- Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MPCEIP). (2022). *Plan de Monitoreo de Residuos*. Ecuador.
- Panorama, A. (2022). Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND): Virulencia, patogénesis y estrategias de mitigación en la acuicultura del camarón. *Panorama acuícola magazine*.

- Paredes Floril, P. R., Bravo Bravo, G. L., & Delgado Naranjo, G. A. (2022). Efectos de la pandemia por Covid-19 en el sistema de precios del sector camaronero ecuatoriano. *Revista Latinoamericana de Difusión Científica*, Vol. 4 Núm. 7.
- Rendón, L., & Balcázar, J. L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes. *Revista AquaTic*, 27-33. Obtenido de <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/256>
- Robertson, L. L. (1993). Interaction of salinity and feed protein level on growth of *Penaeus vannamei*. *Journal of Applied Aquaculture*, 43-53.
- Saavedra-Olivo, K. Y., Peralta-Ortiz, T., & Ordinola-Zapata, A. (enero-marzo de 2018). *Scielo Perú*. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000100032#:~:text=No%20existen%20reportes%20de%20AHPND,Bondad%2DReantaso%2C%202016).
- Sánchez, M. d. (2017). *Comercio internacional y acuicultura: caso del camarón en Ecuador*. Quito: CC creative commons.
- Tandazo, A. P. (2000). *Efecto de diferentes niveles de salinidad y balance de proteína/energía en el crecimiento del Penaeus vannamei*. Machala: Dspace ESPOL. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8581/1/T56.pdf>
- Vinatea, P. (26 de Mayo de 2020). *Luis Vinatea*. Obtenido de <https://www.luisvinatea.com/post/el-ph>

Anexos

Anexo 1

Resultados iniciales de PCR en hepatopáncreas para AHPND (EMS), primeras 5 muestras

Technology agroindustriales S. A Alborada 3ª. Etapa, Manzana BS Villa-6 +593-9-94763280 kpereira@technologyagroindustriales.net		 Technology agroindustriales S. A.		
INFORME DE RESULTADOS				
Fecha de elaboración:	21 de diciembre de 2022	Registro interno:	1116-2022	
Cliente:	Srta. Ivette Chiquito	Atención:	Srta. Ivette Chiquito	
Dirección:	Cdla San Felipe	Correo electrónico:	imchiqui@espol.eud.ec	
Ciudad	Guayaquil			
DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS				
1. TIPO DE MUESTRA ANÁLISIS SOLICITADO OBSERVACIONES FECHA DE RECEPCIÓN FECHA DE ANÁLISIS	<u>ORGANO FIJADO DE CAMARON</u> <u>PCR AHPND (EMS)</u> <u>SE RECIBEN MUESTRAS FIJADAS EN ALCOHOL</u> <u>20 DE DICIEMBRE DE 2022</u> <u>21 DE DICIEMBRE 2022</u>			
RESULTADOS				
# DE CAMARON	TRATAMIENTO	# ACUARIO	ORIGEN	AHPN (EMS)
1	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
2	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
3	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
4	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
5	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
METODO EMPLEADO				PCR IQ PLUS
Realizado por: Ing. Ketty Pereira MPC				

Anexo 2

Resultados iniciales de PCR en hepatopáncreas para AHPND (EMS), siguientes 10 muestras

Technology agroindustriales S. A
 Alborada 3ª. Etapa, Manzana BS Villa-6
 +593-9-94763280
 kpereira@technologyagroindustriales.net



INFORME DE RESULTADOS

Fecha de elaboración:	7 de enero de 2023	Registro interno:	011-2023
Cliente:	Srta. Ivette Chiquito	Atención:	Srta. Ivette Chiquito
Dirección:	Cdla San Felipe	Correo electrónico:	imchiqui@espol.edu.ec
Ciudad:	Guayaquil		

DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS

1. TIPO DE MUESTRA	<u>ORGANO FIJADO DE CAMARON</u>
ANALISIS SOLICITADO	<u>PCR AHPND (EMS)</u>
OBSERVACIONES	<u>SE RECIBEN MUESTRAS FIJADAS EN ALCOHOL</u>
FECHA DE RECEPCIÓN	<u>04 DE ENERO DE 2023</u>
FECHA DE ANÁLISIS	<u>06 DE ENERO DE 2023</u>

RESULTADOS

# CAMARÓN	MICROTUBO	TRATAMIENTO	# ACUARIO	ORIGEN	AHPN (EMS)
1	10	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
2	11	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
3	12	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
4	13	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
5	14	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
6	15	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
7	16	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
8	17	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
9	18	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
10	19	RESPALDO	13	HEPATOPANCREAS	POSITIVO
METODO EMPLEADO					PCR IQ PLUS

Realizado por: Ing. Ketty Pereira MPC

Anexo 3

Resultados finales de PCR en hepatopáncreas para AHPND (EMS), 12 muestras



INFORME DE RESULTADOS

Fecha de elaboración:	23 de enero de 2023	Registro interno:	051-2023
Cliente:	Srta. Ivette Chiquito	Atención:	Srta. Ivette Chiquito
Dirección:	Cdla San Felipe	Correo electrónico:	imchiqui@espol.edu.ec
Ciudad:	Guayaquil		

DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS

1. TIPO DE MUESTRA	<u>ORGANO FIJADO DE CAMARON</u>
ANALISIS SOLICITADO	<u>PCR AHPND (EMS)</u>
OBSERVACIONES	<u>SE RECIBEN MUESTRAS FIJADAS EN ETANOL</u>
FECHA DE RECEPCIÓN	<u>19 DE ENERO DE 2023</u>
FECHA DE ANÁLISIS	<u>20 DE ENERO DE 2023</u>

RESULTADOS

# CAMARÓN	MICROTUBO	TRATAMIENTO	# ACUARIO	ORIGEN	AHPN (EMS)
11	20	FINAL	1	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
12	21	FINAL	1	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
17	26	FINAL	2	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
18	27	FINAL	2	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
23	32	FINAL	3	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
24	33	FINAL	3	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
29	56	FINAL	7	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
30	57	FINAL	7	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
35	62	FINAL	8	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
36	63	FINAL	8	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
41	68	FINAL	9	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
42	69	FINAL	9	HEPATOPANCREAS	NEGATIVO
METODO EMPLEADO					PCR IQ PLUS

Realizado por: Ing. Ketty Pereira MPC

Anexo 4

Análisis de varianza de un factor peso promedio inicial y peso promedio final.

Análisis de varianza de un factor peso promedio inicial y peso promedio final.

RESUMEN

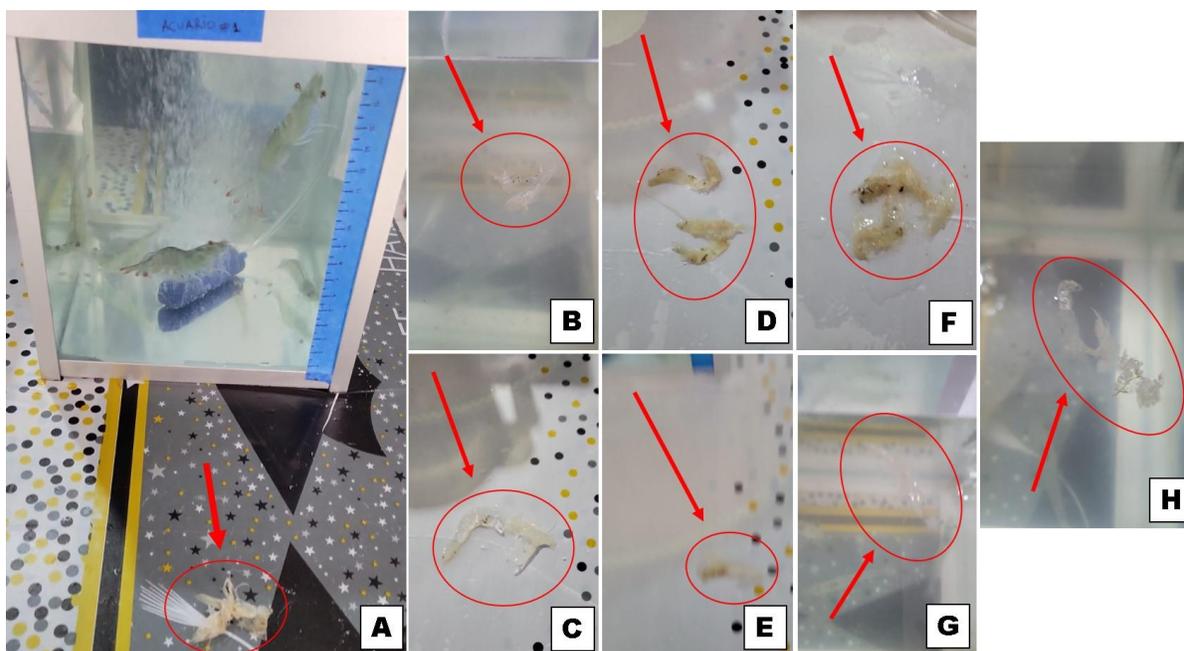
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Peso inicial	12	57,5	4,79	0,21	0,46	9,64
Peso final	12	70,8	5,90	0,15	0,39	6,62

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entregrupos	7,37	1	7,370	40,244	2,2012E-06	4,300950
Dentro de los grupos	4,03	22	0,183			
Total	11,40	23				

Anexo 5

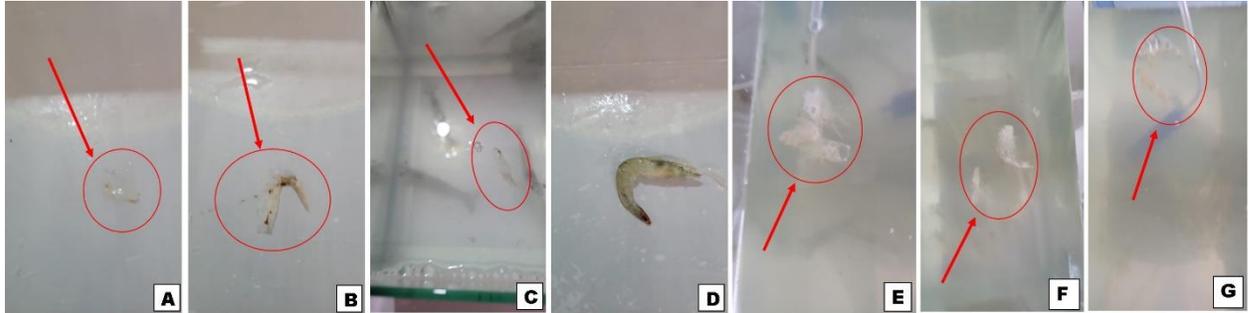
Registro fotográfico de 12 mudas acuario 1



Nota. A) 2 mudas (9 de enero 2023), B) 2 mudas (3 de enero 2023), C) 1 muda (10 de enero 2023), D) 2 mudas (12 de enero 2023), E) 1 muda (13 enero 2023), F) 2 mudas (4 de enero 2023), G) 1 muda (1 de enero 2023) y H) 1 muda (23 de diciembre 2022)

Anexo 6

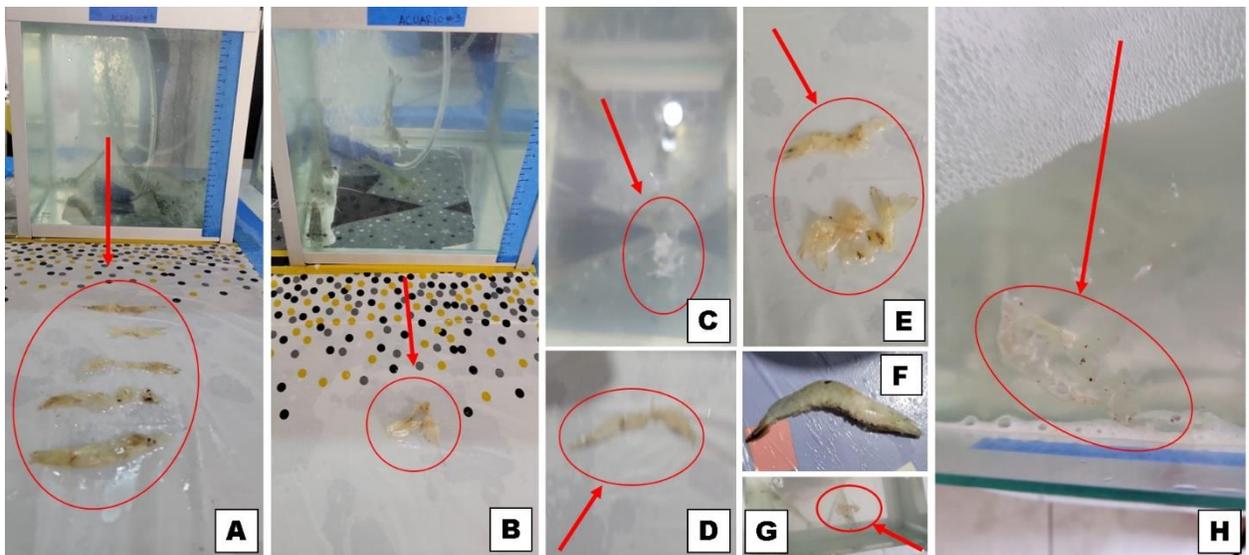
Registro fotográfico de 6 mudas y 1 muerto del acuario 2



Nota. A) 1 muda (12 enero 2023), B) 1 muda (8 enero 2023), C) 1 muda (20 diciembre 2022), D) 1 muerto (20 diciembre 2022), E) 1 muda (7 enero 2023), F) 1 muda (23 diciembre 2022), G) 1 muerto (1 enero 2023)

Anexo 7

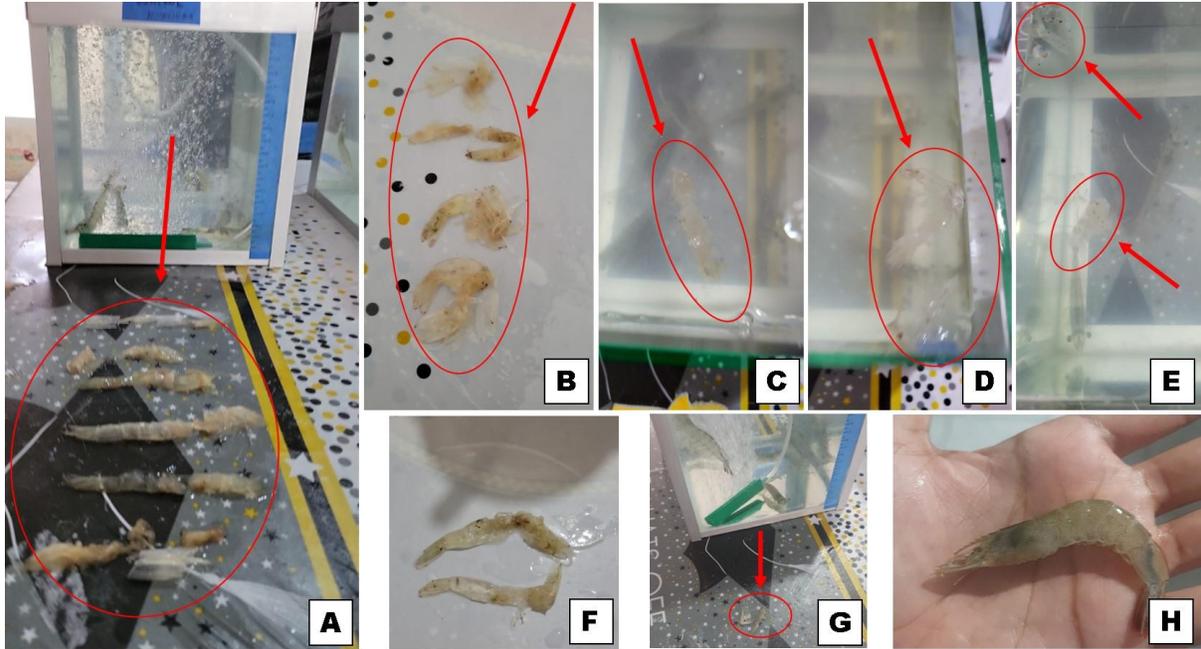
Registro fotográfico de 12 mudas y 1 muerto del acuario 3



Nota. A) 5 mudas (14 enero 2023), B) 1 muda (9 enero 2023), C) 1 muda (21 diciembre 2022), D) 1 muda (10 enero 2023), E) 2 mudas (6 enero 2023), F) 1 muerto (15 enero 2023), G) 1 muda (15 enero 2023) y H) 1 muda (23 diciembre 2022)

Anexo 8

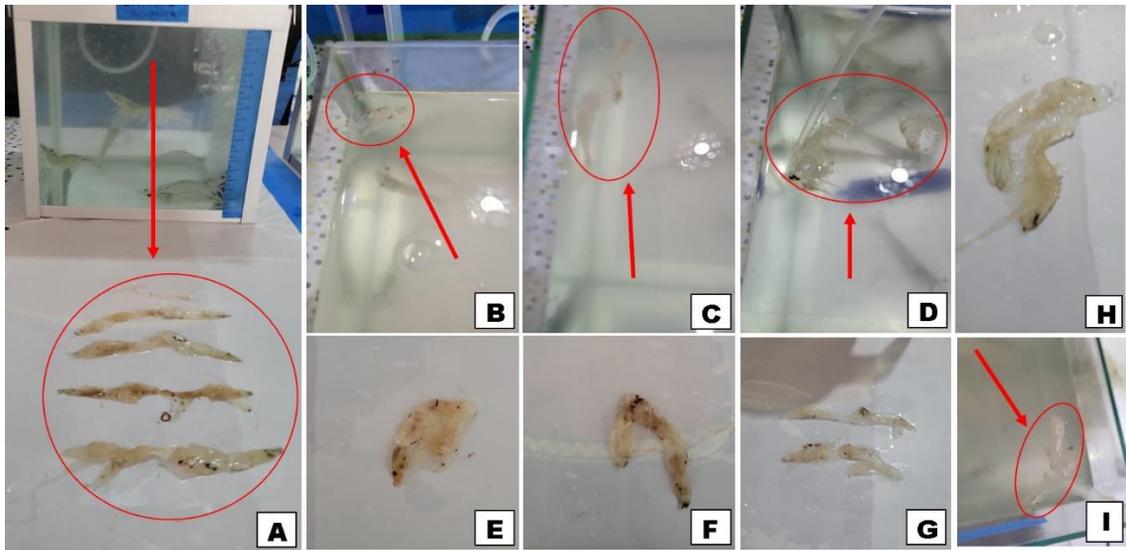
Registro fotográfico de 18 mudas y 1 muerto del acuario 4



Nota. A) 6 mudas (14 enero 2023), B) 4 mudas (6 enero 2023), C) 1 muda (29 diciembre 2022), D) 2 mudas (20 diciembre 2022), E) 2 mudas (28 diciembre 2022), F) 2 mudas (5 enero 2023), G) 1 muda (15 enero 2023) y H) 1 muerto (19 diciembre 2022)

Anexo 9

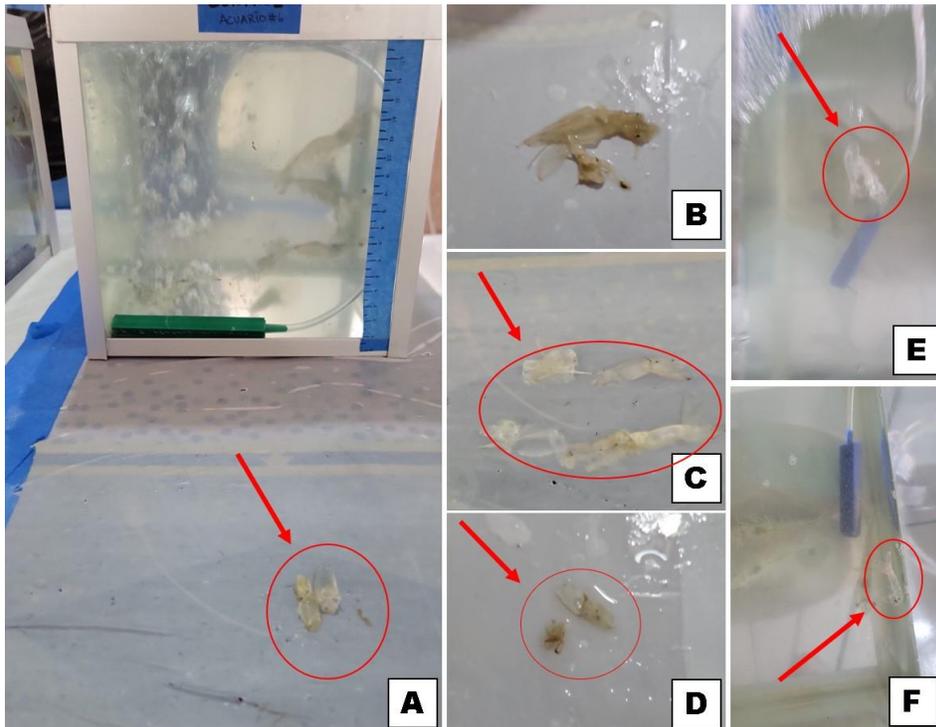
Registro fotográfico de 15 mudas del acuario 5



Nota. A) 4 mudas (14 enero 2023), B) 1 muda (28 diciembre 2022), C) 1 muda (27 diciembre 2022), D) 2 mudas (19 diciembre 2022), E) 1 muda (6 enero 2023), F) 1 muda (13 enero 2023), G) 2 mudas (5 enero 2023), H) 2 mudas (4 enero 2023), I) 1 muda (1 enero 2023)

Anexo 10

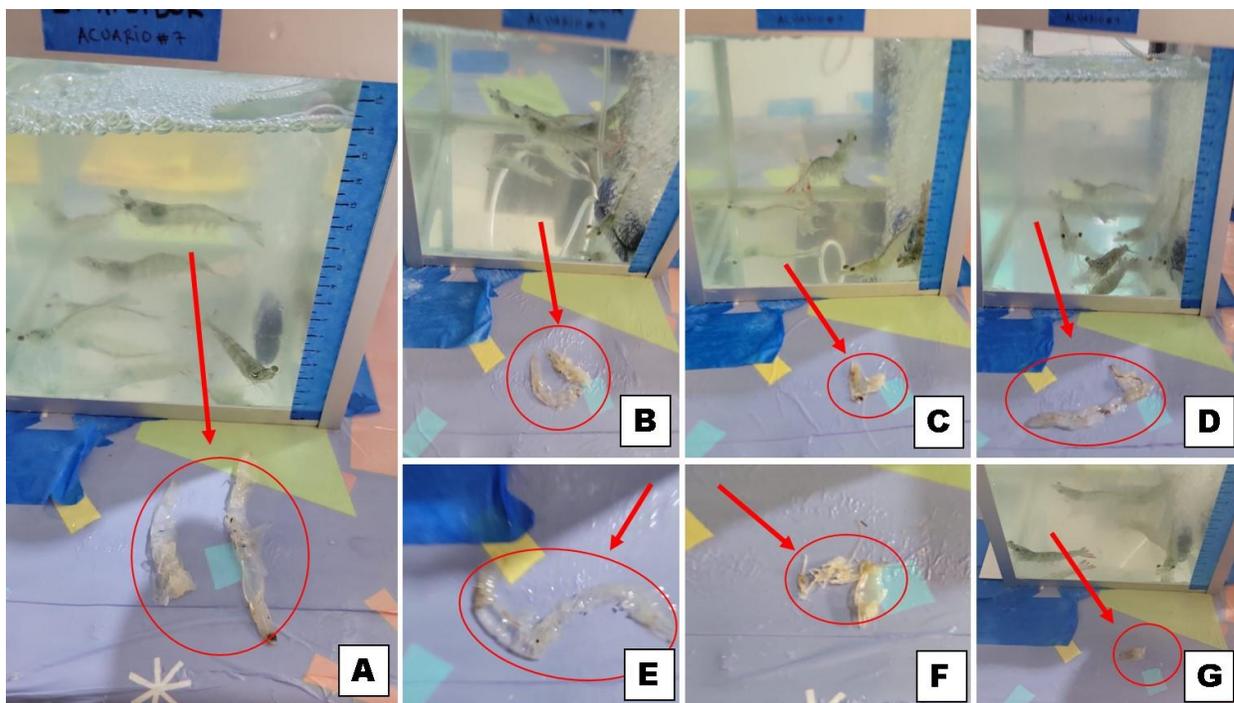
Registro fotográfico de 8 mudas del acuario 6



Nota. A) 1 muda (14 enero 2023), B) 2 mudas (4 enero 2023), C) 2 mudas (13 enero 2023), D) 1 muda (5 enero 2023), E) 1 muda (23 diciembre 2022) y F) 1 muda (1 enero 2023)

Anexo 11

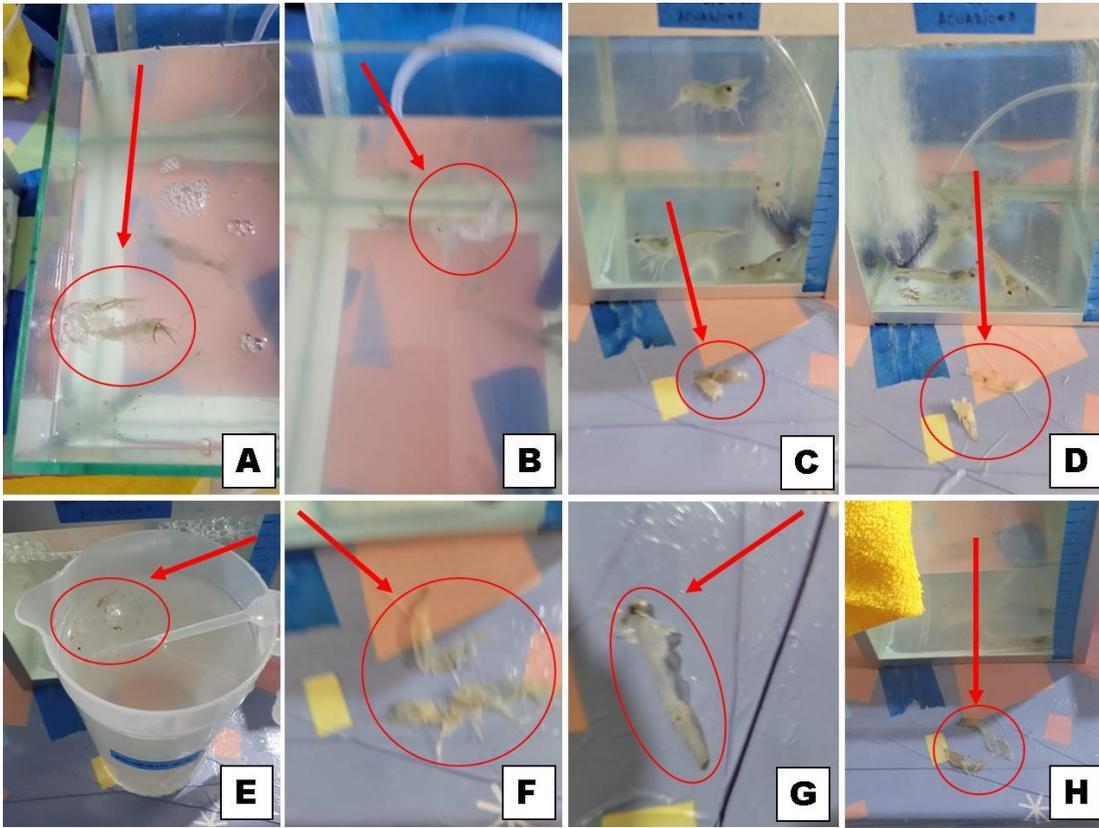
Registro fotográfico de 12 mudas del acuario 7



Nota. A) 2 mudas (8 enero 2023), B) 2 mudas (12 enero 2023), C) 1 muda (14 enero 2023), D) 2 mudas (17 enero 2023), E) 2 mudas (10 enero 2023), F) 2 mudas (6 enero 2023), G) 1 muda (15 enero 2023)

Anexo 12

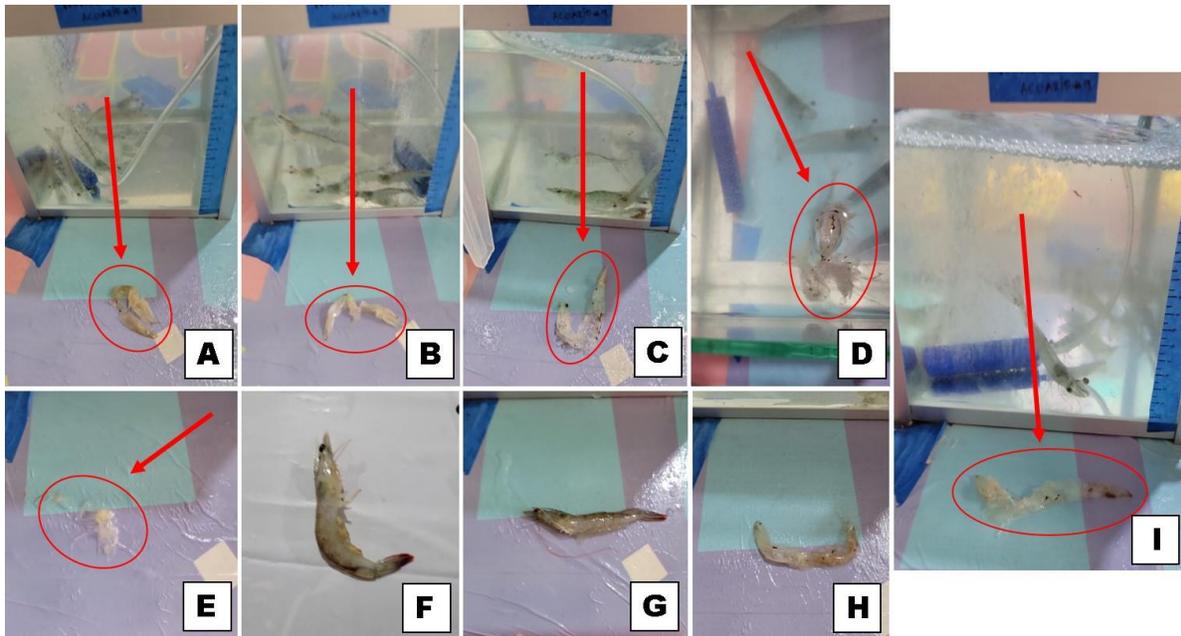
Registro fotográfico de 15 mudas del acuario 8



Nota. A) 3 mudas (28 diciembre 2022), B) 2 mudas (27 diciembre 2022), C) 1 muda (14 enero 2023), D) 2 mudas (11 enero 2023), E) 2 mudas (10 enero 2023), F) 2 mudas (6 enero 2023), G) 1 muda (3 enero 2023) y H) 2 mudas (15 enero 2023)

Anexo 13

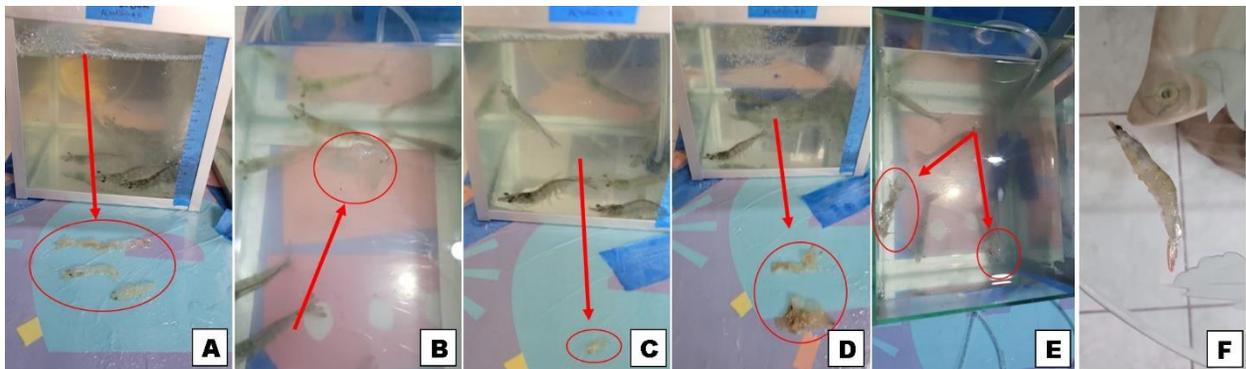
Registro fotográfico de 13 mudas y 2 muertos del acuario 9



Nota. A) 2 mudas (12 enero 2023), B) 2 mudas (11 enero 2023), C) 2 mudas (8 enero 2023), D) 2 mudas (3 enero 2023), E) 1 muda (13 enero 2023), F) 1 muerto (27 diciembre 2022), G) 1 muerto (1 enero 2023), H) 2 mudas (9 enero 2023) y I) 2 mudas (17 enero 2023)

Anexo 14

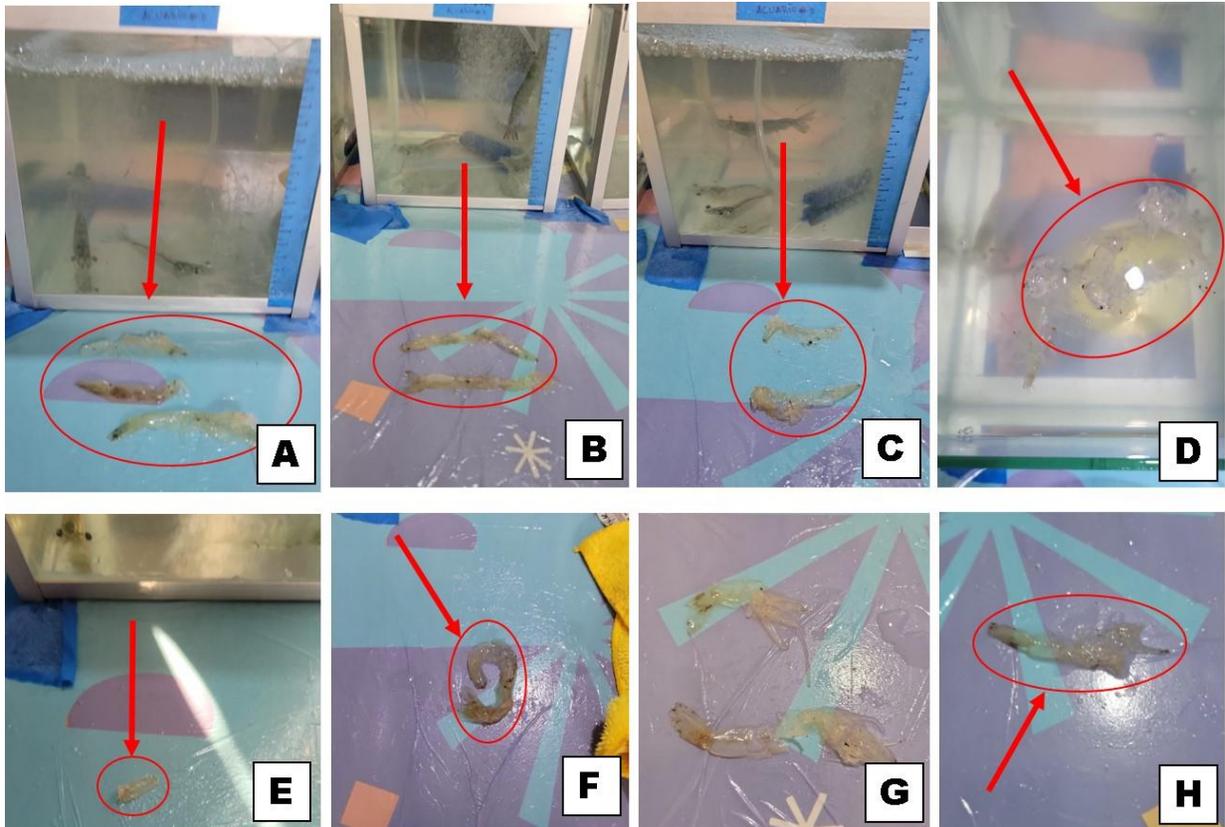
Registro fotográfico de 10 mudas y 1 muerto del acuario 10



Nota. A) 3 mudas (17 enero 2023), B) 2 mudas (21 diciembre 2022), C) 1 muda (11 enero 2023), D) 2 mudas (9 enero 2023), E) 2 mudas (10 enero 2023), F) 1 muerto (24 diciembre 2022)

Anexo 15

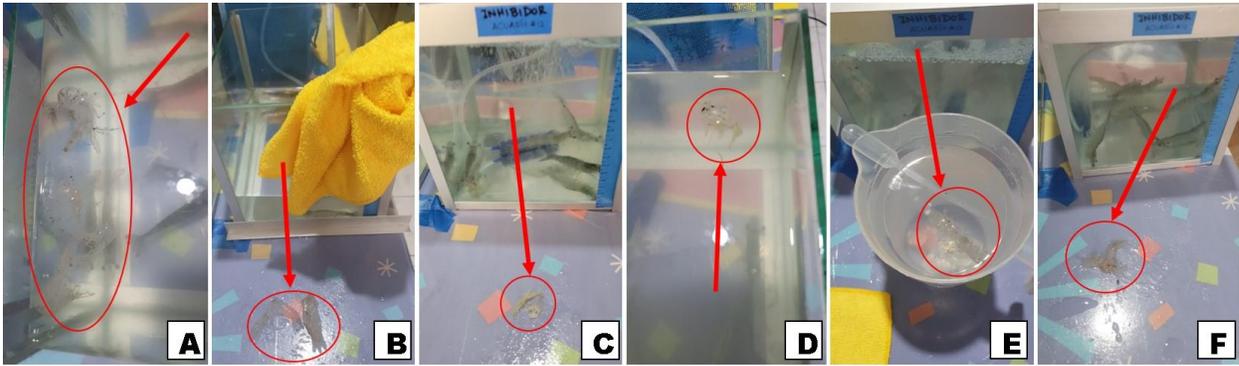
Registro fotográfico de 15 mudas del acuario 11



Nota. A) 3 mudas (17 enero 2023), B) 2 mudas (14 enero 2023), C) 2 mudas (8 enero 2023), D) 3 mudas (21 diciembre 2022), E) 1 muda (13 enero 2023), F) 1 muda (9 enero 2023), G) 2 mudas (6 enero 2023) y H) 1 muda (5 enero 2023)

Anexo 16

Registro fotográfico de 11 mudas del acuario 12



Nota. A) 3 mudas (10 enero 2023), B) 2 mudas (15 enero 2023), C) 1 muda (12 enero 2023), D) 1 muda (23 diciembre 2022), E) 2 mudas (7 enero 2023), F) 2 mudas (7 enero 2023)

Anexo 17

Análisis de varianza de un factor para la sobrevivencia al inicio y al final del proyecto

Análisis de varianza de un factor para la sobrevivencia.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
<i>n</i> inicial	12	72	6,00	0,00	0,00	0,00
<i>n</i> final	12	66	5,50	0,45	0,67	12,26

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,5	1	1,5	6,6	0,018	4,301
Dentro de los grupos	5	22	0,2273			
Total	6,5	23				

Anexo 18

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de salinidad de la mañana con respecto a la de la tarde durante todo el bioensayo

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de salinidad.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Coficiente de variación
A.M	12	347	28,92	0,45	0,67	2,31
P.M	12	346	28,83	0,33	0,58	2,00

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,042	1	0,041666667	0,1067961	0,746910443	4,3009495
Dentro de los grupos	8,583	22	0,390151515			
Total	8,625	23				

Anexo 19

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de oxígeno disuelto durante el proyecto

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de oxígeno disuelto.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desviación Estándar	Coficiente de variación
A.M	12	78,8	6,57	0,02	0,13	1,92
P.M	12	83,3	6,94	0,04	0,21	2,96

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,818	1	0,817704167	28,148531	2,52225E-05	4,3009495
Dentro de los grupos	0,639	22	0,029049621			
Total	1,457	23				

Anexo 20

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de temperatura promedio durante el proyecto

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de temperatura.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de variación</i>
A.M	12	311,9	25,99	0,01	0,10	0,38
P.M	12	317,7	26,48	0,06	0,25	0,93

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1,402	1	1,401666667	39,961123	2,31679E-06	4,3009495
Dentro de los grupos	0,772	22	0,035075758			
Total	2,173	23				

Anexo 21

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de pH promedio durante el proyecto

Análisis de varianza de un factor para el parámetro de pH.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de variación</i>
A.M	12	100,2	8,35	0,00	0,01	0,13
P.M	12	100,0	8,33	0,00	0,02	0,25

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,002	1	0,001504167	5,3445491	0,030534639	4,3009495
Dentro de los grupos	0,006	22	0,000281439			
Total	0,008	23				