

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Efectos de nitrito en *Penaeus Vannamei* cultivados en  
aguas de baja salinidad.

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**INGENIERO(A) ACUICULTOR**

Presentado por:

Dayanna Mickaela Escobar Aveiga

Carolina Estefania Nieto Viteri

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

# DEDICATORIA

Agradezco principalmente a Dios por ser un padre protector, guiarme y brindarme lucidez para continuar con esta meta.

A las mujeres de mi vida que han sido un ejemplo de lucha constante y empoderamiento femenino: Tania Aveiga, mi madre que siempre ha estado presente con sus sabios consejos, gran comprensión y creyendo ciegamente en mí. Marina Mosquera, mi abuela quién me ha apoyado durante todas mis noches de desvelo. Michell Escobar, mi hermana, por enseñarme a creer en mis ideales y Daniella Nivelá, mi amiga incondicional.

A mi hermano, Eduardo Escobar por ser mi compañero de sueños.

A mis tíos, Arturo y Kleber Aveiga, así como a la Dra. Carmen Mosquera por haber sido un pilar fundamental durante esta etapa y estar siempre presentes con un abrazo o palabras de aliento.

A mi padre, Allan Escobar por ser la niña de sus ojos.

A mis verdaderos amigos sobre todo a los que conocí a inicios de esta travesía, quiénes estuvieron presentes con una sonrisa o un consejo durante los momentos difíciles y compartieron mis logros.

A mis profesores quiénes no solo me guiaron profesional sino también éticamente y me inspiraron a mantener el amor por mi carrera, sobre todo a aquellos de los que tuve el placer de ser su ayudante.

Finalmente, a ESPOL por permitirme consolidar un sueño que empezó a muy corta edad. Hoy puedo decir que gracias a ustedes soy alumna de la POLITÉCNICA. Los llevo grabados en mi mente y corazón. Gracias por todo.

Mickaela Escobar Aveiga

## DEDICATORIA

Esta tesis va dirigida ante todo a Dios por saberme guiar en el transcurso de mi carrera, por la salud que ha dado y por tener una familia y amigos extraordinarios.

Agradezco a la persona quien me dio todo su apoyo y en ocasiones me hacía compañía en Guayaquil, mi madre Mónica Viteri quien me demostró que la vida no siempre es fácil pero que una madre estará en cada momento. A quien admiro constantemente por su esfuerzo, las ganas de salir adelante y de que siempre está pendiente de sus hijos a pesar de todo, mi padre Wellington Nieto quien me enseñó que en la vida hay momentos buenos y malos pero que uno debe ser perseverante para alcanzar las metas propuestas. A quienes siempre estuvieron apoyándome, dándome consejos y ánimos en el transcurso de mi carrera; mis hermanas Mónica Nieto y Brittany Viteri, a mi enamorado José Miguel Fernández y a mi amiga incondicional Arianna Villarruel quien me brindó su casa para poder realizar mis estudios. Y finalmente a todas las personas que de alguna manera me brindaron su apoyo para alcanzar este objetivo. Los amo y aprecia a todos.

Carolina Estefania Nieto Viteri

# AGRADECIMIENTO

Agradecemos principalmente a nuestra tutora, PhD. Francisca Burgos por su guía, paciencia y dedicación, una excelente profesional; sin ella la realización del presente proyecto no hubiera sido posible.

A la Ing. Sussan Beltrán y su equipo de trabajo por abrirnos las puertas de su laboratorio y permitirnos la continuidad de nuestro experimento.

A los amigos politécnicos, Franklin Ramírez, así como a Tatiana Villamar por su apoyo emocional e intelectual.

A los docentes de Espol por transmitirnos sus conocimientos y principios. De manera especial a: MSc. Eduardo Cervantes, PhD. Bonny Bayot, PhD. Marco Álvarez, PhD. Wilfrido Argüello, MSc. Adrián Márquez, PhD. Víctor Osorio, MSc. Jorge Blacio y MSc Jerry Landívar grandes profesionales de los que tuvimos el honor de aprender.

A la MSc. Patricia Urdiales por su ardua labor en la coordinación de la carrera de Ing. Acuícola.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Dayanna Mickaela Escobar Aveiga y Carolina Estefania Nieto Viteri damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

---

Dayanna Mickaela  
Escobar Aveiga

---

Carolina Estefania Nieto  
Viteri

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:

FRANCISCA  
ARACELLY BURGOS  
VALVERDE

---

**MSc. Jerry Landívar**

PROFESOR DE LA MATERIA

---

**PhD. Francisca Burgos Valverde**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

*Penaeus vannamei* a nivel nacional generalmente se cultiva en altas salinidades; aunque, actualmente la camaricultura se está desplazando a zonas no costeras, lo que implica realizar estos cultivos en aguas de bajas salinidades que presentan múltiples beneficios, sin embargo, la desventaja que existe es la toxicidad de los compuestos de nitrógeno que tienden a incrementarse y en este medio causan mayores afectaciones al camarón. En Ecuador no existe información sobre la respuesta de animales adultos y post larvas ante toxicidad aguda; por esta razón, el siguiente estudio estuvo enfocado en evaluar los efectos de la toxicidad aguda del nitrito en adultos y post larvas de *P. vannamei*. El diseño experimental consistió en exponer a animales adultos (8g) y a post larvas (41 pl/g) a cuatro tratamientos: control y tres diferentes concentraciones de nitrito con 3 réplicas por cada tratamiento (n=3). Los animales adultos fueron expuestos durante 96 h a tres concentraciones diferentes 20, 40 y 60 ppm; mientras que las post larvas fueron expuestas durante 72h a concentraciones de 20, 30 y 40 ppm de nitrito respectivamente. Los parámetros de cultivo fueron monitoreados diariamente y las mortalidades fueron registradas cada 24 h en cada estudio. Se determinó la toxicidad en cada una de las etapas, la tasa de mortalidad acumulada y los valores seguros de exposición que en camarones adultos fue entre (0.98-1.85) ppm a las 96 horas mientras que es post larva es de 0.97 ppm a las 72 horas. Complementariamente se estudió la correlación entre las mortalidades observadas y los parámetros de cultivo. Morfológicamente se determinó si existieron cambios celulares a través de histopatología en animales sobrevivientes, en adultos reveló lesiones en el hepatopáncreas y el grado de aseveración aumentaba conforme incrementaba el nitrito, en cambio, en post larva existió daño en las lamelas branquiales con un nivel de aseveración igual para todos los tratamientos. La exposición a concentraciones de 20–40 ppm de nitrito afectaron la respuesta toxicológica de manera diferentes los estadios ensayados. En los adultos la CL-96 fue igual para las concentraciones ensayadas; mientras que en post larva el incremento de nitrito de 20 a 40 ppm cambio la CL50-72 a CL50-48. De manera similar sucede cuando se expone a los adultos a concentraciones de 60 ppm ubicando la CL50-72. El porcentaje de mortalidad acumulada total más alto observado entre todos los tratamientos en adultos fue de 70% en animales expuestos a 60 ppm (96h). Mientras que en las post larvas la tasa más alta observada entre todos los tratamientos fue de 94.4% a las 72 h a una exposición de 40 ppm. En ningún caso los tratamientos control en adultos y en post larva presentaron mortalidad durante los ensayos.

## ABSTRACT

The *Penaeus vannamei* at the national level is generally cultivated in high salinities although, currently shrimp farming is moving to non-coastal areas, which implies making these crops in low salinity waters that present multiple benefits, however, the disadvantage that exists is the toxicity of nitrogen compounds that tend to increase and, in this environment, cause greater damage on shrimp. In Ecuador there is no information on the response of adult animals and post larvae to acute toxicity; For this reason, the following study was focused on evaluating the effects of acute nitrite toxicity in adults and post larvae of *P. vannamei*. The experimental design consisted of exposing adult animals (8g) and post larvae (41 pl / g) to four treatments: control and three different concentrations of nitrite with 3 replications for each treatment (n=3). Adult animals were exposed for 96 h to three different concentrations 20, 40 and 60 ppm; while the post larvae were exposed for 72h to concentrations of 20, 30 and 40 ppm of nitrite respectively. Culture parameters were monitored daily and mortalities were recorded every 24 h in each study. The toxicity was determined in each of the stages, the accumulated mortality rate and the safe exposure values that in adult shrimp was between (0.98-1.85) ppm at 96 hours while in post-larvae it is 0.97 ppm at 72 hours. In addition, the correlation between the observed mortalities and the culture parameters was studied. Morphologically, it was determined if there were cellular changes through histopathology in surviving animals, in adults it revealed lesions in the hepatopancreas and the degree of assertion increased as nitrite increased, on the other hand, in post larva there was damage to the branchial lamellae with a level of assertion the same for all treatments. Exposure to concentrations of 20-40 ppm of nitrite affected the toxicological response differently at the stages tested. In adults, CL-96 was the same for the concentrations tested; while in post-larvae, the increase in nitrite from 20 to 40 ppm changed the LC50-72 to LC50-48. Similarly, it happens when adults are exposed to concentrations of 60 ppm, locating the LC50-72. The highest total cumulative mortality percentage observed among all treatments in adults was 70% in animals exposed to 60 ppm (96h). While in post larvae, the highest rate observed among all treatments was 94.4% at 72 h at an exposure of 40 ppm. In no case did the control treatments in adults and post larvae show mortality during the trials.

# Índice General

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
ABREVIATURA.....	V
SIMBOLOGÍA .....	VI
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del Problema.....	2
1.2 Justificación de Problema .....	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivo Específico.....	4
1.4 Marco Teórico .....	4
1.4.1 Cultivo de <i>Penaeus vannamei</i> .....	5
1.4.2 Cultivo de Camarón en Agua de baja salinidad .....	5
1.4.3 Calidad de agua en camaronicultura .....	6
1.4.4 Compuestos Nitrogenados en el Agua.....	9
CAPÍTULO 2.....	14
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1 Diseño Experimental.....	14
1.4.6 Bioensayo en Animales Adultos .....	14
1.4.7 Bioensayo en post larvas.....	15
2.2 Monitoreo de calidad de Agua.....	16
2.3 Registro de Mortalidad.....	16
2.4 Análisis histopatológicos .....	16
2.5 Análisis estadístico.....	17
CAPÍTULO 3.....	19
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	19
3.1 Adultos.....	19
3.1.1 Concentración letal media (CL50) de nitrito en adultos .....	19
3.1.2 Evaluación de la mortalidad.....	19
3.1.3 Determinación de las concentraciones seguras de nitrito .....	20
3.1.4 Evaluación de los parámetros de calidad de agua vs la mortalidad	21
3.1.5 Parámetros ambientales: Oxígeno (ppm), temperatura (°C), salinidad (ppt) y pH en el tiempo.....	21

3.1.6	Parámetros Químicos: NH <sub>3</sub> (ppm); NO <sub>3</sub> (ppm); NO <sub>2</sub> (ppm); Fósforo (ppm) en el tiempo. ....	22
3.1.7	Análisis multivariado.....	24
3.2	Post larvas .....	25
3.2.1	Concentración letal media (CL50) de nitrito en post- larvas .....	25
3.2.2	Evaluación de la mortalidad.....	25
3.2.3	Determinación de las concentraciones seguros de nitrito .....	26
3.2.4	Evaluación de los parámetros de calidad de agua vs la mortalidad	26
3.2.5	Parámetros ambientales: Oxígeno (ppm), temperatura (°C), salinidad (ppt) y pH en el tiempo.....	27
3.2.6	Parámetros químicos: NH <sub>3</sub> (ppm); NO <sub>3</sub> (ppm); NO <sub>2</sub> (ppm); Fósforo (ppm) en el tiempo. ....	27
3.2.7	Análisis multivariado.....	29
3.3	Histopatología.....	29
3.4	Discusión.....	30
CAPÍTULO 4.....		31
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	31
4.1	Conclusiones.....	31
4.2	Recomendaciones.....	32
Anexos .....		33
Bibliografía.....		36

## **ABREVIATURA**

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
LC50	Concentración letal media
DL50	Dosis letal media
MTM	Mil toneladas métricas
PL	Post Larva
TC	Tratamiento control
T20	Tratamiento concentración 20 ppm
T30	Tratamiento concentración 30 ppm
T40	Tratamiento concentración 40 ppm
T60	Tratamiento concentración 60 ppm

## SIMBOLOGÍA

ppm	Partes por millón
ppt	Partes por Mil
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitro
P	p-value
h	Horas
n	Número
%	Porcentaje
m <sup>2</sup>	Metros al cuadrado
°C	Grados Celsius
Cl <sup>-</sup>	Cloro
Na <sup>+</sup>	Sodio
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
mg	Miligramos
Kg	Kilogramo
mm Hg	Milímetro de mercurio
O <sub>2</sub>	Oxígeno

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diseño experimental de adultos a diferentes concentraciones. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	15
Figura 2: Diseño experimental de post larva a diferentes concentraciones. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar. ....	16
Figura 3: Mortalidad acumulada (%) de los diferentes tratamientos en adultos Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	19
Figura 4: Mortalidad (%) vs Tiempo según los diferentes tratamientos. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	20
Figura 5: Análisis del comportamiento de los parámetros ambientales vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Temperatura, b) Oxígeno, c) Salinidad y d) pH. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	22
Figura 6: Análisis del comportamiento de los parámetros químico vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Calcio, b) Dureza, c) Amonio, d) Nitrato, e) Nitrito, f) Fósforo. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	23
Figura 7: Matriz de correlación entre variables ambientales y las mortalidades observadas. Autora: Francisca Burgos.....	24
Figura 8: PCA de parámetros ambientales y químicos observados por tratamientos en el tiempo. Los eigenvalues indican las variables que mayor influencia en la distribución de las observaciones provenientes de los tratamientos. Autora: PhD. Francisca Burgos .....	24
Figura 9: Mortalidad acumulada (%) de los diferentes tratamientos en post larva. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar.....	25
Figura 10: Mortalidad (%) vs tiempo según los diferentes tratamientos. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	25
Figura 11: Análisis del comportamiento de los parámetros ambientales vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Temperatura, b) Oxígeno, c) Salinidad y d) pH. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	27
Figura 12: Análisis del comportamiento de los parámetros químico vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Calcio, b) Dureza, c) Amonio, d) Nitrato, e) Nitrito, f) Fósforo. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar .....	28
Figura 13: PCA de parámetros ambientales y químicos observados por tratamientos en el tiempo. Los eigenvalues indican las variables que mayor influencia en la distribución de las observaciones provenientes de los tratamientos. Autora: PhD. Francisca Burgos. ....	29
Figura 14: Resultados histopatológicos del Hepatopáncreas de animales adultos. a) T20, b) T40, c) T60. ....	30
Figura 15: Resultados histopatológicos de las lamelas branquiales de post larva. a) T20, b) T30, c) T40. ....	30
Figura 16: Fotografías de la experimentación para determinar el LC50 de nitrito en post larvas y adultos de <i>Penaeus vannamei</i> . ....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Rangos aceptables de concentración para sustancias inorgánicas disueltas en agua de estanques de cultivo. Extraído de: Consideraciones sobre la calidad de agua y suelo en cultivo de camarón. Autor: Claude Boyd. ....	9
Tabla 2: Concentraciones seguras de nitrito (ppm) para adultos determinado a partir del LC50. Autores: Mickaela Escobar y Carolina Nieto .....	20
Tabla 3: Promedio de los parámetros evaluados en el bioensayo de camarones adultos con respecto a los diferentes tratamientos. Autoras: Mickaela Escobar y Carolina Nieto .....	21
Tabla 4: Concentraciones seguras de nitrito (ppm) para post larvas determinado a partir del LC50. Autores: Mickaela Escobar y Carolina Nieto .....	26
Tabla 5: Promedio de los parámetros evaluados en el bioensayo de post larvas con respecto a los tratamientos empleados. Autoras: Mickaela Escobar y Carolina Nieto .....	26

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

La Cámara Nacional de Acuicultura (2021), estima que Ecuador en el 2010 exportó 151 MTM de *Penaeus vannamei*, mientras que, en el 2020 fueron 688 MTM, es decir, existe un aumento en la demanda de aproximadamente 5 veces más. Este crecimiento perenne se debe a múltiples factores como: Su sabor, el buen precio de mercado, así como a la suma de los esfuerzos realizados por el sector acuícola local para poder posicionar el producto y cumplir amplios estándares de calidad. Sin embargo, alcanzar este nivel de producción implica el uso de estrategias más agresivas con el medio, tales como: Incremento de las densidades de siembra y también de las dosis del alimento balanceado para así cumplir los requerimientos nutricionales de este organismo.

La aplicación de estas medidas para la intensificación del cultivo provoca una capacidad de carga demasiado alta que junto a la respuesta de regeneración natural del medio que es muy lenta da como resultado un cultivo saturado de materia orgánica con elevadas concentraciones de diversos metabolitos, entre ellos los más tóxicos: Los compuestos nitrogenados, provenientes principalmente del alimento balanceado que aporta un 78% N al estanque, sin embargo, se calcula que entre el 25-45% es asimilado por el camarón y utilizado para el desarrollo de sus funciones fisiológicas. Por ende, existe un 33-53% de nitrógeno desaprovechado por el organismo y que se encuentra disponible para interactuar en el estanque por medio de las reacciones biogeoquímicas (Saldias & Sonnenholzner, 2002). Por ello, consideramos imprescindible realizar un bioensayo de LC50 para conocer la reacción de post larvas y camarones adultos expuestos a nitrito con el fin de determinar la concentración letal, segura, su alteración morfológica y el comportamiento de este compuesto al ser influenciado por otros parámetros.

## **1.1 Descripción del Problema**

El mercado del camarón ecuatoriano crece anualmente como consecuencia directa del aumento de la demanda alimenticia, por esta razón el sector acuícola ha aprovechado los beneficios que posee el país para explotar este modelo de negocio y suplir las tasas de consumo internacionales. Para llegar a los niveles productivos actuales se ha tenido que implementar estrategias que incluyen tecnificación, cambios de infraestructura, incremento de densidades por m<sup>2</sup> y por ende de alimentación artificial que cumpla con los requerimientos nutricionales tanto en la etapa de pre-cría y engorde (Balod, 2021).

Como resultado, no solo que el camarón crece adecuadamente a tallas comerciales esperadas, sino que a su vez excreta más compuestos de desechos, generando un aumento de materia orgánica en el sistema que en bajas cantidades puede ser descompuesto por biofiltros naturales, siempre y cuando no supere su capacidad de biotransformación.

La falta de prácticas que den soporte a los filtros biológicos naturales del sistema de cultivo provoca que haya una sobresaturación del sistema por material no degradado, generando altas concentraciones de compuestos nitrogenados tóxicos para el organismo.

Por otro lado, en Ecuador la especie que mayormente se cultiva es el *Penaeus vannamei* debido a que tolera una amplia gama de salinidades que se encuentran entre 1-40 ppt (Valencia et al., 2020). Sin embargo, la continua expansión de los criaderos de camarón blanco en la zona costera se convierte en una limitante para el crecimiento de esta industria, obligando al sector acuícola a buscar nuevas opciones de producción y actualmente se está implementando el cultivo tierras adentro -aguas de baja salinidad- que presenta múltiples beneficios, tales como: Terrenos más económicos, menor presencia de patógenos, y disminución de recursos comunes -como los efluentes- con otras granjas camaroneras (Jorry, 2017). No obstante, en sistemas con bajas salinidades existe menor tolerancia de los camarones hacia los compuestos nitrogenados lo cual está directamente relacionado a la densidad de organismos en la piscina, exceso de alimento, heces y la descomposición de la materia orgánica provocando aumento de las

concentraciones de amonio, nitrito y nitrato (Huang et al., 2020), siendo el  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$  los más tóxicos.

En sistemas de cultivo con salinidades entre 2 y 3 ppt se conoce que el límite permisible del nitrito es de 0.23 ppt (Martins & Cupertino, 2019). Sin embargo, existe escasa información sobre las concentraciones a las cuales los animales presentan problemas de salud y/o mortalidad cuando son expuestos a salinidades inferiores de 6 ppt.

## **1.2 Justificación de Problema**

En acuicultura es imprescindible el continuo monitoreo de los parámetros de calidad del agua para mantener una producción sana y estable; permitiendo detectar a tiempo las problemáticas presentes en el estanque. De esta manera posibilita implementar medidas capaces de evitar/mitigar el impacto ocasionado por los desbalances biogeoquímicos en las piscinas, tales como: Elevadas mortalidades, crecimiento lento o un cultivo vulnerable ante desafíos propios de las piscinas camaroneras (Gross et al., 2004).

Aunque las mortalidades en el estanque causan tangibles pérdidas económicas, no es el único efecto ocasionado por una mala calidad de agua, ya que la descompensación iónica dentro de la granja no permite que el camarón exprese todo su potencial genético debido a que el entorno no es amigable con su fisonomía. Por ello, es de vital importancia recordar que este sector cultiva seres vivos que requieren de condiciones propicias para emplear su energía únicamente en su correcto desarrollo y supervivencia, lo que finalmente implicará mayor rentabilidad para el acuicultor (Boyd, 2007).

La acumulación de nitrito es un problema durante la producción en estanques sobre todo en aguas con baja salinidad debido a que los camarones ante estas condiciones absorben rápidamente los compuestos nitrogenados; provocando cambios fisiológicos que llegan a ser letales convirtiéndose finalmente en pérdidas económicas en el sector. La escasa tolerancia de la especie con respecto a los metabolitos tóxicos. El principal interés de este proyecto es el estudio del efecto ejercido por diferentes concentraciones de nitrito en *Penaeus vannamei* ya que actualmente no existen suficientes investigaciones que reflejen este potencial problema a una salinidad de 2 ppt, por ende, se dificulta la toma de medidas eficaces para contrarrestar las repercusiones de este compuesto dentro del cultivo.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- Evaluar el grado de tolerancia del *Penaeus vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de nitrito en aguas con baja salinidad.

#### **1.3.2 Objetivo Específico**

- Identificar la concentración letal media (CL50) de nitrito en camarones post larvas y adultos.
- Establecer la tasa de mortalidad bajo las concentraciones anteriormente mencionadas.
- Encontrar las concentraciones seguras del nitrito para camarones adultos (8gr) y post larva (41pl/gr)
- Identificar las correlaciones existentes entre los parámetros y la mortalidad.
- Determinar la respuesta morfológica a las diferentes concentraciones de nitrito.

### **1.4 Marco Teórico**

*Penaeus vannamei* es una de las especies de mayor interés productivo a nivel mundial debido a su facilidad de adaptación a diferentes salinidades y su resistencia ante condiciones adversas (Valencia Castañeda et al., 2018). Javier Ramírez (2017) afirma que: El camarón blanco en 2013 alcanzó una producción de 3,3 millones de toneladas métricas, perteneciendo al agua dulce: 0,6 MTM, agua salada: 0,2 MTM y agua potable: 1,9 MTM.

En Ecuador, este organismo es el principal rubro de origen no petrolero, es decir, su comercialización genera un gran impacto en la economía del país, provee fuentes de empleo directa e indirectamente, el sector contribuye con las investigaciones y al aumento de divisas. De esta manera, se consolida una industria en continuo crecimiento que mantuvo su estabilidad económica en la crisis del 2020 ocasionada por COVID-19, consiguiendo una exportación de \$3,823 millones y rompiendo récords por el volumen de ventas con 688 mil toneladas métricas, contribuyendo aproximadamente al 19% del total de exportaciones del país e indicando un crecimiento del 7% en comparación al 2019. Sin embargo, se debe reconocer que los precios del

producto decaen desde el año 2014 por lo que la estrategia del sector es negociar ventas en mayores volúmenes a menor precio para así amortiguar este desbalance (Balod, 2021).

#### **1.4.1 Cultivo de *Penaeus vannamei***

La industria camaronera ha mejorado constantemente su forma de cultivo hoy en día cuenta con dos fases que ayudan a tener un mejor rendimiento en el cultivo, las cuales son:

- **Piscina de pre-crías:** Se siembran las post larvas a una densidad de 150 animales/m<sup>2</sup> hasta alcanzar un peso de 0.5 a 0.8 gramo, en esta fase suelen estar entre 18 a 21 días y son alimentadas con balanceado que contenga un 40% de proteína, el cual contribuirá a su crecimiento, también tienen una tasa de alimentación que se ajusta cada semana dependiendo de su biomasa y al final son transferidos a piscinas de engorde.
- **Piscinas de engorde:** En ellas se siembran los camarones de 1 gramo a una densidad de 30 a 50 animales/m<sup>2</sup> hasta alcanzar una talla comercial (>17g) para ello, se les proporciona durante 2 o 3 meses alimento balanceado al 35% de proteína y con frecuencia de dos veces al día en relación 40:60, es decir, mayor cantidad por la tarde (Piedrahita, 2018).

En las dos fases es importante la fertilización con distintos tipos de abono, realizar recambios de agua para mantener la calidad de las piscinas y llevar un control de los parámetros ambientales que influyen en el cultivo como lo son: La temperatura, ph, salinidad, oxígeno disuelto, entre otros (Crespi & New, 2009)

#### **1.4.2 Cultivo de Camarón en Agua de baja salinidad**

El cultivo de camarón en agua de baja salinidad se comenzó a dar en ciertos países como Tailandia, Australia, India, China, Estados Unidos y México (Ramírez Rochín et al., 2017). La primera especie en ser cultivada en agua dulce fue el *Penaeus monodon*, seguido del *P. vannamei*, especie eurihalina capaz de tolerar amplios rangos de salinidades siendo su productividad igual de rentable ya que no presentan diferencias en su crecimiento, ni

supervivencia entre estos medios. Además de su facilidad en el cultivo, disponibilidad de post-larvas (Valencia Castañeda et al., 2018), insumos y baja presencia de patógenos causantes de enfermedades. Por esta razón la industria camaronera en los últimos años ha crecido en zonas alejadas de la costa.

Existen múltiples ventajas para realizar cultivos de camarón blanco a bajas salinidades, las cuales son:

- Se puede dar empleos a gente de las zonas rurales.
- No se comparten fuentes de agua con otras camaroneras
- Se tiene una mayor bioseguridad y control de las enfermedades
- Mejor sabor en el camarón en comparación con los de agua salada
- Reducción de costos por adquisición de inmuebles independiente de la zona costera
- El uso del suelo y el agua son eficiente debido a que, se realiza un cultivo intensivo.
- Causan menor impacto al medio ambiente, debido a que el agua de la camaronera puede ser utilizadas en cultivos agrícolas.
- No existe riesgo de contaminación biológica debido a que muchas de las enfermedades que atacan a los camarones se presentan más en aguas saladas o salobres (Navia & Gallardo, 2018)

### **1.4.3 Calidad de agua en camaronicultura**

El medio ambiente tiene la capacidad de regenerarse naturalmente debido a la interacción de sus factores bióticos y abióticos, sin embargo, la intervención del ser humano al sobreexplotar los recursos ocasiona un desequilibrio debido a que la capacidad de desgaste del agua y suelo es superior a su potencial de recuperación (Boyd, 2016)

Esta sobreexplotación ocurre porque la capacidad de carga, es decir, la cantidad de organismos por m<sup>2</sup> en un intervalo de tiempo es superior a la que puede soportar el medio, provocando aumento de la materia orgánica, iones o sólidos suspendidos que pueden afectar a nuestro cultivo. Sin embargo, este problema se puede solucionar tomando medidas de mitigación que

aporten a la recuperación del medio acuícola tales como: El uso de probióticos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, entre otros métodos de remediación. Por ello, es fundamental conocer los parámetros que causan mayor afectación a los cultivos y sus respectivos rangos de seguridad para el desarrollo de la especie de interés. A continuación, se mencionará los parámetros a considerar:

#### **1.4.3.1 Parámetros Físicos**

**Temperatura:** Los camarones de aguas cálidas crecen mejor a temperaturas entre 25 °C y 32°C, siendo favorable sembrar en aguas costeras en el trópico porque la mayor parte del año se mantiene entre este rango.

**Oxígeno disuelto:** este es uno de los parámetros más importantes en la calidad de agua por el cual los rangos que se debería mantener es entre 7 y 8 ppm, por debajo de 4 ppm su crecimiento es muy lento porque su energía se deposita más en la supervivencia y son más susceptibles a enfermedades (Boyd, 2016).

**pH:** los camarones se adaptan mejor a pH entre 6.5 y 8, fuera de este rango se reduce la diversidad por estrés fisiológico y su reproducción.

**Dureza total:** Se define por la cantidad de iones de calcio y magnesio. Por lo general si la dureza se encuentra elevada se considera que es muy productiva el agua.

**Salinidad:** puede variar de 10 a 38‰, no es un parámetro que influya en el crecimiento, se considera que el agua de baja salinidad mayor a 4‰ contiene más minerales que favorecen a la producción primaria mejorando la calidad del medio, la alimentación y altas productividades.

La salinidad más bien influye en el amonio no ionizado, es una relación inversamente proporcional, esto quiere decir que mayor salinidad conlleva a menores proporciones de amoníaco no ionizado. Kir & Kumlu (2006), encontraron que a 15 ppt el *Penaeus semisilcatus* presenta un CL50 de 14.81 ppm, en cambio, 40ppt este incrementa hasta 66.65 ppm.

#### **1.4.3.2 Parámetros químicos**

Existe gran variedad de elementos que componen el cuerpo de agua en un estanque y son necesarios para mantener el equilibrio ecosistémico del mismo. Estos compuestos se obtienen principalmente por los procesos de fotosíntesis y respiración de plantas acuáticas/fitoplancton; así también como

del uso de fertilizantes, alimento artificial, minerales del suelo o por la fuente de agua de la camaronera, entre ellos:

**Nitrógeno y Fósforo:** Son los compuestos de mayor relevancia en el cultivo acuícola, ya que de ellos depende la proliferación del fitoplancton que debe estar equilibrado en el estanque, porque un exceso de este microorganismo causa deficiencias de oxígeno por la noche y la escasez significa menos alimento vivo, necesario para el desarrollo del camarón.

El nitrógeno se encuentra en el agua en forma de:

- **Amonio:** Si este elemento se encontrase en concentraciones elevadas podría reducir el crecimiento y se vuelve tóxico para el organismo (Rivera, 2011).
- **Nitrito:** Es la fase intermedia entre el nitrato y el amonio, es menos tóxico que el nitrito y puede causar problemas en los cultivos acuícolas cuando existe un desbalance en el sistema con respecto a las bacterias encargadas del proceso de nitrificación o desnitrificación (Frías & Páez, 2001).
- **Nitrato:** Es el menos tóxico en comparación del nitrito y amonio. Si el agua de la camaronera es rica en nitrato se puede usar en las plantas ya que ellas lo usan como fuente de alimento.

El fósforo se encuentra en forma de:

- **Fosfato:** El agua que entra a las piscinas tiene fósforo en forma de fosfato y también se lo obtiene del suelo, pero su concentración es muy baja y deben ser añadido constantemente para mantener los brotes de fitoplancton. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los alimentos y fertilizantes aplicados al cultivo pueden elevar estos niveles, ocasionando un problema para el cultivo.
- **Calcio:** El calcio protege el agua de un aumento de pH que resulta de la eliminación del CO<sub>2</sub> y el bicarbonato del agua para usarlo en la fotosíntesis (Boyd, 2018).

Tabla 1: Rangos aceptables de concentración para sustancias inorgánicas disueltas en agua de estanques de cultivo. Extraído de: Consideraciones sobre la calidad de agua y suelto en cultivo de camarón. Autor: Claude Boyd.

Elemento	Forma en Agua	Concentración Objetivo
<b>Oxígeno</b>	Oxígeno molecular ( $O_2$ )	5-15 ppm
<b>Hidrógeno</b>	$H^+$ [ $\log H^+ = pH$ ]	pH 7-9
<b>Nitrógeno</b>	Nitrógeno molecular ( $N_2$ )	Saturación o menor
	Amonio ionizado ( $NH_4$ )	0.2-2 ppm
	Amonio no ionizado ( $NH_3$ )	<0.1 ppm
	Nitrato ( $NO_3$ )	0.2-10 ppm
	Nitrito ( $NO_2$ )	<0.23 ppm
<b>Sulfuro</b>	Sulfato ( $SO_4^{2-}$ )	500-3.000 ppm
	Sulfuro de Hidrógeno ( $H_2S$ )	No detectable
<b>Carbono</b>	Dióxido de carbono ( $CO_3$ )	1-10 ppm
<b>Calcio</b>	Ion de calcio ( $Ca^{2+}$ )	100-500 ppm
<b>Magnesio</b>	Ion de magnesio ( $Mg^{2+}$ )	100-500 ppm
<b>Sodio</b>	Sodio ( $Na^{2+}$ )	2,000-11,000 ppm
<b>Potasio</b>	Ion de Potasio ( $K^+$ )	100-400 ppm
<b>Bicarbonato</b>	Bicarbonato ( $HCO_3$ )	75-300 ppm
<b>Carbonato</b>	Carbonato ionizado ( $CO_3^{2-}$ )	0-20 ppm
<b>Cloro</b>	Ion cloro (Cl)	2,000-20,000 ppm
<b>Fósforo</b>	Ión fosfato ( $HPO_4^{2-}$ ), ( $H_2PO_4$ )	0.005-0.2 ppm
<b>Silicio</b>	Silicato ( $H_2SiO_3$ , $HSiO_3$ )	2-20 ppm
<b>Hierro</b>	Hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ )	0 ppm
	Hierro férrico ( $Fe^{3+}$ )	Trazas
	Hierro total	0.05-0.2 ppm
<b>Manganeso</b>	Ión Manganeso ( $Mn^{2+}$ )	0 ppm
	Dióxido de manganeso ( $MnO_2$ )	Trazas
	Manganeso total	0.05-0.2 ppm
<b>Zinc</b>	Ión de Zinc ( $Zn^{2+}$ )	<0.01 ppm
	Zinc total	0.01-0.05 ppm
<b>Cobre</b>	Ión Cobre ( $Cu^{2+}$ )	<0.005 ppm
	Cobre total	0.005-0.01 ppm
<b>Molibdeno</b>	Molibdato	Trazas
<b>Salinidad</b>	Total de todos iones	5-35 ppt

#### 1.4.4 Compuestos Nitrogenados en el Agua

El incremento de las densidades sembradas con estrategias de alimentación continua supera la capacidad del filtro Biológico de realizar su proceso de nitrificación y desnitrificación. Los compuestos nitrogenados proveniente de materia orgánica no transformada (heces o del balanceado). Se acumulan en las piscinas acuícolas o sistemas de recirculación, llegando en cuestiones de

horas a altas concentraciones que son tóxicos estresando a los animales en el cultivo que puede provocar su muerte

Se debe recordar que las bacterias nitrificantes son organismos aeróbicos requieren de la presencia de oxígeno, es decir, la concentración de Oxígeno es directamente proporcional a la tasa de conversión de los compuestos nitrogenados e inversa al tiempo de descomposición (Boyd, 2016).

Dentro de los compuestos orgánicos que han sido identificados que provocan intoxicación a los animales del cultivo tenemos: amonio, nitrito y nitratos (en menor frecuencia)

En el Ecuador este análisis no ha sido abordado en relación a los diferentes niveles de salinidad que se cultivan a los camarones en las diferentes provincias donde se practica esta actividad comercial

#### **1.4.4.1 Nitrificación**

Es una reacción natural que se lleva a cabo por la acción de las bacterias aeróbicas nitrosomonas que le permite al amonio transformarse a nitrito. Posteriormente, intervienen las nitrobacter convirtiendo el nitrito a nitrato, este último paso de la reacción sucede rápidamente debido a que ambas bacterias cohabitan y después de darse el primer paso, el segundo sucede en gran brevedad.

#### **1.4.4.2 Nitrito**

El nitrito ( $\text{NO}_2$ ) es un compuesto que se encuentra en la fase intermedia del proceso de nitrificación para transformar el amonio a nitrato por medio de la oxidación provocada por la actividad de las bacterias nitrificantes.

En los cultivos de *P. vannamei* en agua salada o salobre el nitrito no ocasiona grandes problemáticas, sin embargo, en sistemas de agua de baja salinidad su acumulación puede provocar altas mortalidades. Esto sucede porque en los ecosistemas de alta salinidad, las proteínas de absorción se dividen entre el nitrito y el cloruro, desplazando al compuesto nitrogenado. Mientras que, en agua de baja salinidad no sucede esto y el camarón absorbe este compuesto de forma directa por medio de sus branquias (Boyd, 2007).  
Produciendo:

- Músculos del esqueleto carentes de potasio

- Transformación de la hemocianina en meta-hemocianina por oxidación del átomo de cobre lo que provoca en la hemolinfa una tonalidad marrón (Vinatea, 2006).
- Hipoxia o cianosis.
- Deficiente transporte de oxígeno en la hemolinfa
- Organismos estresados y débiles
- Menor resistencia ante complicaciones
- Menor crecimiento.
- Tejidos atrofiados.

#### **1.4.4.2.1 Toxicidad del nitrito**

Se conoce que los valores a las 96 horas de CL50 para nitritos en organismos de agua dulce son: Crustáceos entre 10-30 ppm y peces es de 0.25 hasta 100 ppm, mientras que, en agua salada es de 10- 300 ppm y 100-1000 ppm respectivamente (Saez, 2014).

A pesar de que el grado de toxicidad del nitrito es menor al de amonio, este componente también puede acumularse en el sistema y volverse nocivo, pues como producto intermedio de la reacción bio-química ocasionada por la nitrificación puede alcanzar grandes concentraciones, este desbalance ocurre por la descompensación entre las bacterias nitrificantes /desnitrificantes y su capacidad de regeneración del sistema por no poder procesar las cantidades de nitrito que mayormente provienen de efluentes de sectores agrícolas, sobre-alimentación, exceso de materia orgánica en descomposición.

Además, causa deficiencia en la osmolaridad de la hemolinfa, ya que reduce los niveles de los iones que se encuentran en mayor proporción en la hemolinfa del camarón (Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>) ocasionando un desequilibrio osmótico (Frías & Páez, 2001)

#### **1.4.5 Bioensayos de toxicidad**

Son diseños experimentales que se realizan con el objetivo de evaluar la respuesta de un grupo de organismos ante una sustancia potencialmente tóxica durante un lapso de tiempo definido. Durante el proceso se debe registrar los cambios observados de todas las unidades experimentales para finalmente someter esos datos a pruebas estadísticas que permitan valorar la hipótesis inicial, además, es ideal complementarlo con análisis físico-químicos o

histopatológicos para obtener una visión general y realizar un análisis causa-efecto.

Los bioensayos deben realizarse en tiempos definidos, acorde al criterio del investigador, pero comúnmente se utiliza un lapso de 96 horas. Durante ese tiempo los organismos son expuestos a diferentes concentraciones de la sustancia tóxica para determinar los cambios o la mortalidad de los individuos. Para estas pruebas siempre se deben tener controles para asegurar que los cambios ocasionados en los organismos son producto de la sustancia a la que fueron sometidos y no por factores externos (Sánchez & Andrade, 2008).

Por lo general, los ensayos de toxicidad tienen como objetivo determinar la concentración que ocasiona efectos dañinos o nocivos para el organismo. Estos efectos pueden ser:

- Afectación en su ciclo de vida
- Desbalance en el crecimiento del organismo
- Cambios de los parámetros reproductivos.

Se debe tomar en cuenta que para realizar bioensayos:

- Se deben emplear organismos sanos.
- Debe existir una aclimatación previa.
- Fijar un grupo control que no sea expuesto al agente contaminante.
- Los eventos de estrés, así como, la temperatura, salinidad, alimentación, entre otros factores deben ser iguales para todas las unidades experimentales.

#### **1.4.5.1 Bioensayos de toxicidad agudos**

Cuantifica las concentraciones que son letales para una especie en particular. El valor que se calcula por lo general es la concentración letal media que quiere decir cuando el 50% del organismo ha fallecido en un tiempo determinado que va generalmente entre 48 a 96 horas. Esta clasificación se divide en 4 tipos:

- Tipo estático: No hay renovación continua de las diluciones que usarán en el ensayo.

- Sin renovación: Las especies se someten a una misma solución durante el período de duración del ensayo.
- Con renovación: Cuando intercambia cada 24 horas con una preparación fresca que tenga la misma concentración de la sustancia. Se lo realiza cuando la sustancia se deteriora o es absorbida por otros factores.
- De flujo continuo: Se realiza una renovación continua de la sustancia para mantener la misma concentración durante el ensayo (Abarca, 2014).

#### **1.4.5.2 Índices de toxicidad**

Es el resultado obtenido de los bioensayos, sirve para identificar el grado de toxicidad de determinado compuesto ante cierto organismo. Aunque existen varios parámetros para obtenerlos, en el estudio se evaluarán:

**Concentración letal media (CL50):** Muestra la concentración del compuesto que ocasiona la mortalidad del 50% de los organismos de la unidad experimental, misma que se debe obtener en un tiempo definido. Este valor se expresa en mg/L.

**Dosis letal media (DL50):** Se trata de la dosis que ocasiona la mortalidad del 50% de organismos en la unidad experimental. Este valor se expresa en mg/Kg, siendo los miligramos la cantidad de sustancia por cada Kg del animal (Sánchez & Andrade, 2008).

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

El presente proyecto se realizó en una camaronera ubicada en el cantón Durán, provincia del Guayas-Ecuador, cuya producción es semi intensiva en cuerpos de aguas de baja salinidad. El agua utilizada en los bioensayos presentó parámetros ambientales, temperatura (25,1°C), pH (8.5), oxígeno disuelto (7.90 ppm), salinidad (2ppt), presión (760mmHg) y saturación de oxígeno disuelto (95%). Mientras que los parámetros de calidad de agua se encuentran en calcio (55ppm), nitrato (0.5 ppm), amonio (0.1 ppm) y fosfato (0.56 ppm).

### 2.1 Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en 2 bioensayos con animales en diferentes estadios (adultos y post larva) sometidos a diferentes concentraciones de nitrito durante un periodo determinado (Figura # 1). Las concentraciones de nitrito a ensayar en los dos bioensayos se ajustaron a partir de alícuotas tomadas de una solución madre de nitrito de sodio (1000 ppm de NO<sub>2</sub>). Los cálculos necesarios para la preparación de las soluciones madres se encuentran en el Anexo 1.

#### 1.4.6 Bioensayo en Animales Adultos

##### 1.4.6.1 Aclimatación inicial

Cien animales provenientes de las piscinas de la camaronera con un peso de  $8 \pm 0.3$  gr fueron aclimatados en una tina de 500 L provistos de aireación durante una semana hasta la transferencia a su unidad experimental.

##### 1.4.6.2 Determinación del CL50 por nitrito

La unidad experimental estuvo compuesta por 12 gavetas de 35 L (Figura 1) conteniendo una jaula interna de plástico con abertura en la parte superior (finalidad de reducir la manipulación y estrés de los organismos) con aireación y flujo continuo de agua.

El diseño experimental estuvo compuesto de 4 tratamientos con 3 réplicas (n=3) cada uno. El tratamiento control (concentración de nitritos del agua del reservorio, TC) y 3 niveles de concentración de nitritos de 20, 40 y 60 ppm (T20, T40, T60, respectivamente; Figura 1).



*Figura 1: Diseño experimental de adultos a diferentes concentraciones. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar*

Ocho animales con un peso promedio de  $8 \pm 0.3$  gr fueron transferidos desde el tanque de aclimatación hacia su respectiva gaveta experimental. Después de 2h de aclimatación se adicionaron los respectivos volúmenes de solución de nitrito calculados a partir de la solución madre (Anexo 1).

#### **1.4.7 Bioensayo en post larvas**

##### **1.4.7.1 Aclimatación Inicial**

Quinientos animales provenientes de las piscinas de la camaronera con un peso promedio de  $0.60 \pm 0.45$  gr fueron aclimatados en una gaveta de 35 L provistos de aireación durante 4 días hasta la transferencia a su unidad experimental.

##### **1.4.7.2 Determinación del CL50 por Nitrito**

La unidad experimental estuvo compuesta por 12 envases de 2L con aireación (Figura 2).

El diseño experimental estuvo compuesto de 4 tratamientos con 3 réplicas ( $n=3$ ) cada uno. El tratamiento control (concentración de nitritos del agua de piscina, TC) y 3 niveles de concentración de nitritos de 20, 30 y 40 ppm (T20, T30, T40, respectivamente).

Treinta post larvas fueron transferidos desde el tanque de aclimatación hacia su respectiva gaveta experimental. Después de 2h de aclimatación se adicionaron los respectivos volúmenes de solución de nitrito calculados

a partir de la solución madre (Anexo 1). Durante el bioensayo los animales fueron alimentados hasta saciarse.

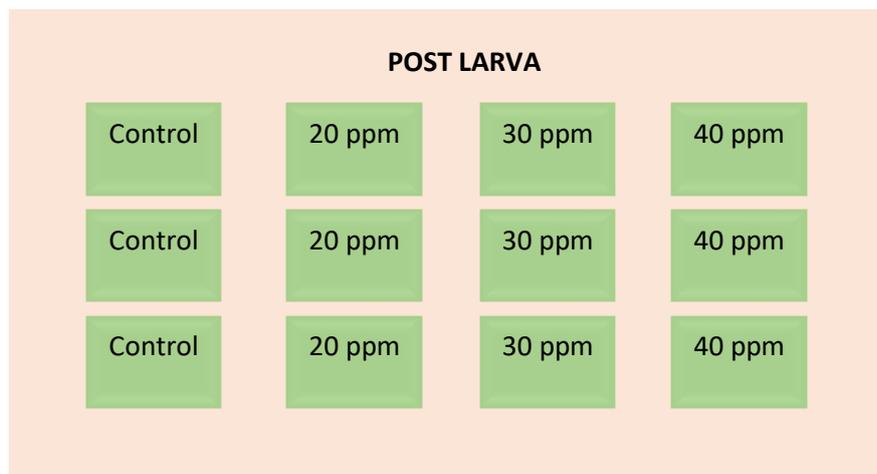


Figura 2: Diseño experimental de post larva a diferentes concentraciones. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar.

## 2.2 Monitoreo de calidad de Agua

Los parámetros ambientales temperatura (C), pH, oxígeno disuelto (ppm), salinidad (ppt), presión (mm Hg), saturación (%) fueron medidos tres veces al día (8:00 am, 14:00 pm y 20:00 pm) y posteriormente analizados en intervalos de 24 horas. Se realizó un monitoreo de la calidad de agua en cada unidad experimental en intervalos de 24 horas que comprendían factores como: Calcio (ppm), dureza total (ppm), nitrato (ppm), amonio (ppm), fósforo (ppm).

En el bioensayo con adultos y post larva, diariamente se realizó un recambio de agua para eliminar los sólidos en el fondo del acuario y posteriormente se efectuó un re-ajuste del nitrito para mantenerlo en el rango deseado para la experimentación

## 2.3 Registro de Mortalidad

Diariamente se revisó cada unidad experimental registrando la mortalidad cada 2 h durante 96h para adultos y 72 h para post- larvas.

## 2.4 Análisis histopatológicos

Al finalizar la experimentación en cada bioensayo se recogieron 3 organismos moribundos de cada tratamiento para realizarle un análisis histopatológico y determinar la presencia de alteraciones morfológicas en los tejidos de los animales expuestos a las diferentes concentraciones de nitrito ensayadas.

Para ello, se fijó a los camarones adultos con Davidson, aproximadamente 50 ml inyectándolos primero en el hepatopáncreas y posteriormente en el resto del cuerpo procurando que el organismo quede completamente rojo, luego se los colocó en una funda y se la llenó hasta que los animales queden completamente sumergidos con la misma solución y se rotuló las muestras, separando a los organismos por tratamientos para finalmente enviarlas a analizar. Para larvas solo se suspendió a los animales en la solución hasta su transporte hacia el laboratorio de análisis.

### **2.5 Análisis estadístico**

Los parámetros ambientales pH, temperatura, oxígeno disuelto, saturación de oxígeno disuelto, salinidad y los de calidad de agua calcio, dureza total, amonio, fosfato, nitrato utilizando el programa RStudio (versión 2020). Previo al análisis, los datos colectados fueron evaluados por medio de la prueba Shapiro Wilk para comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza mediante bartlett Test  $p\text{-value} > 0.05$ . Las variables que no cumplían estas pruebas, fueron transformadas con  $1/x$ ,  $\sqrt{x}$  y  $\log(x)$ . Para determinar si existía diferencia entre los tratamientos se empleó Anova. Para comprobar si existe por lo menos un par de tratamientos con diferencias significativas se aplicó la prueba Tukey por cada intervalo del tiempo. Por otro lado, si los supuestos de normalidad y homogeneidad no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad aplicando todas las transformadas, se aplicó Kruskal Wallis y pairwise test para encontrar las diferencias entre los tratamientos por cada intervalo de horas respectivamente.

La sobrevivencia se evaluó obteniendo el porcentaje del total de organismos vivos por cada tratamiento al final de las 96 h y 72 h para adultos y post larvas respectivamente. Las concentraciones letales (CL50) fueron obtenidas de los ejemplares muertos en termino de número. Las diferencias entre las mortalidades registradas en cada bioensayo fueron comparadas mediante ANOVA y pruebas de pariedad fueron realizadas cuando se observó diferencias en al menos uno de los tratamientos por concentración y por el tiempo

Mediante el programa Statgraphics se realizó los gráficos de cada parámetro ambiental, químico y la mortalidad versus el tiempo según los diferentes tratamientos, lo que refuerza al análisis estadístico ya que se puede plasmar en el gráfico el resultado del análisis sin necesidad de colocar cada una de las pruebas que se realizó.

Finalmente, se realizó un análisis multivariado en Primer- e Versión 7 para los parámetros ambientales y los químicos respectivamente, que incluyó análisis de componentes principales (PCA: Principal component analysis). A partir de una matriz de similitud basada en distancia euclidianas se representó la distribución de los tratamientos mediante escalamiento multidimensional no-métrico (Nonmetric multidimensional scaling, nMDS) seguido del análisis de similaridad (ANOSIM) de una vía para determinar las diferencias estadísticas con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  entre los tratamientos

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Adultos

#### 3.1.1 Concentración letal media (CL50) de nitrito en adultos

La CL50 mostró que en animales adultos la toxicidad aumenta a medida que se incrementa la concentración de nitrito a 60 ppm reduciéndose el tiempo a 72 h, mientras que la CL50 a 96 h se observaron a concentraciones de 20 y 40 ppm respectivamente.

#### 3.1.2 Evaluación de la mortalidad

La tasa de mortalidad acumulada global (Figura 3) mostró que las mortalidades en todos los tratamientos de nitritos fueron significativamente superior comparados al TC ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, entre los tratamientos de nitrito, el T60 (71%) reflejó mortalidades significativamente mayores comparado con el tratamiento T20 (54%,  $p < 0.05$ ) y no así con el T40 (58%,  $p > 0.05$ ). No se observó diferencias de mortalidades entre T20 y T40 ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de mortalidad en los grupos control fue de 0% a las 96h de exposición.

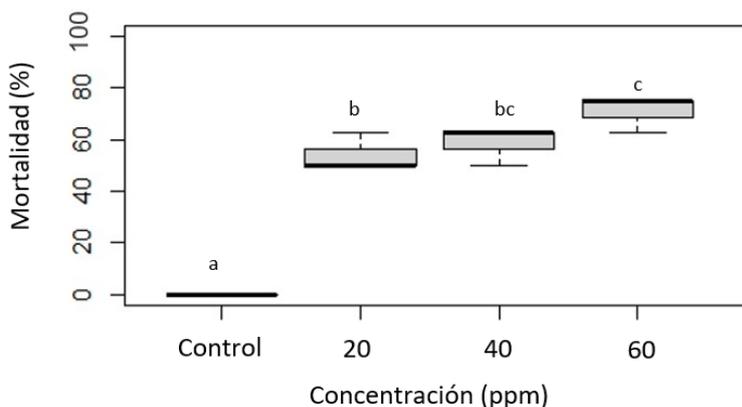


Figura 3: Mortalidad acumulada (%) de los diferentes tratamientos en adultos  
Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

La curva de mortalidad en el tiempo (Figura 4) reportó que la mortalidad observada en los tratamientos de nitrógeno fue significativamente superior a las 96h comparado con el tratamiento control ( $p < 0.05$ ). Ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas durante las 24 y 48 horas

( $p > 0.05$ ). Sin embargo, a partir de las 72 h se observaron aumentos significativos de mortalidades en los T40 y T60 comparados con TC con la tendencia a incrementarse significativamente en los tratamientos de nitrito a las 96 horas comparados con el control. Resulta interesante que no se observó diferencias de mortalidades entre los tratamientos con nitrito a las 72h, pero a las 96 h el T60 fue significativamente superior al T20 y TC pero no con el T40. No hubo mortalidades en el tratamiento control a lo largo del bioensayo.

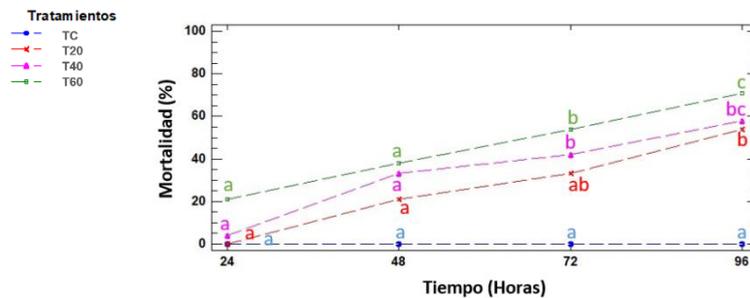


Figura 4: Mortalidad (%) vs Tiempo según los diferentes tratamientos. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.1.3 Determinación de las concentraciones seguras de nitrito

Para la determinación del nivel seguro de metabolitos tóxicos Boyd & Tucker (1998) han estimado un factor de 0.05 a 0.10 dependiente de la tolerancia del organismo hacia los compuestos nitrogenados. Debido a que las estimaciones se realizan en aguas de baja salinidad (2 ppt) en las que el animal se encuentra mayormente expuesto a este compuesto se utiliza el factor de aplicación 0.05 (Tabla 2). Se puede observar que existe una relación inversamente proporcional entre el tiempo de exposición y la concentración de nivel seguro de  $\text{NO}_2$ .

Tabla 2: Concentraciones seguras de nitrito (ppm) para adultos determinado a partir del LC50. Autores: Mickaela Escobar y Carolina Nieto

Tratamiento	Tiempo (h)	Concentraciones (ppm)	Nivel Seguro (ppm)
T60	72	58.33 ± 4.16	2.91
T40	96	37.00 ± 1.00	1.85
T20	96	19.67 ± 1.53	0.98

### 3.1.4 Evaluación de los parámetros de calidad de agua vs la mortalidad

En general los valores de calidad de agua se describen en la tabla 3 por cada tratamiento.

Tabla 3: Promedio de los parámetros evaluados en el bioensayo de camarones adultos con respecto a los diferentes tratamientos. Autoras: Mickaela Escobar y Carolina Nieto

Parámetro	TC	T20	T40	T60
Nitrito (ppm)	7.3 ± 4.2	16.9 ± 2.3	36.5 ± 4.8	56.5 ± 8.7
Calcio (ppm)	74.8 ± 10.3	73.6 ± 5.4	72.5 ± 3.6	72.3 ± 3.9
Dureza de calcio (ppm)	187.5 ± 25.8	183.3 ± 13.3	181.2 ± 8.8	181 ± 9.6
Dureza Total (ppm)	661.7 ± 149.8	603.3 ± 75.1	590.8 ± 78.5	594.2 ± 92.5
Amonio (ppm)	0.5 ± 0.4	1.4 ± 1.6	2.4 ± 2.1	1.4 ± 1.5
Amoníaco (ppm)	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2
Fosfato (ppm)	4.6 ± 1.9	4.4 ± 1.8	4 ± 1.8	4 ± 1.8
Fósforo (ppm)	1.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.6
Nitrato (ppm)	12.3 ± 7.7	24.8 ± 1.9	34.9 ± 5.3	40.1 ± 12.5
Oxígeno (ppm)	7.9 ± 0.2	8 ± 0.1	7.9 ± 0.1	8 ± 0.2
Temperatura (°C)	23.9 ± 0.3	23.9 ± 0.3	23.9 ± 0.3	24 ± 0.3
pH	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.4 ± 0.1	8.5 ± 0
OD (%)	93.8 ± 2.8	95.5 ± 3.2	93.9 ± 3.1	95.3 ± 3.2
Salinidad (ppt)	2.1 ± 0.1	3.4 ± 2.6	2.2 ± 0	2.2 ± 0.1
Mortalidad	0	4.33 ± 0.57	4.66 ± 0.57	5.66 ± 0.57

### 3.1.5 Parámetros ambientales: Oxígeno (ppm), temperatura (°C), salinidad (ppt) y pH en el tiempo.

A pesar, que hubo un incremento del oxígeno hacia las 48h del bioensayo con un decrecimiento hacia las 96 h en todos los tratamientos, estos cambios no fueron significativos. Inversamente la temperatura mostró sus valores más bajos a las 48 h con un incremento hacia las 96h sin embargo esto fue estadísticamente iguales ( $p\text{-value} > 0.05$ , Figura 5.a, b).

En el caso de la salinidad, los valores a las 24, 48 y 96 horas no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p\text{-value} > 0.05$ ), sin embargo, a las 72 horas las concentraciones de T20 ( $2.20 \pm 0.04$ ) y T60 ( $2.24 \pm 0.08$ ) muestran diferencias con el TC ( $2.10 \pm 0.11$ ; Figura 5.c).

Con relación al pH, a partir de las 48 horas se denotan diferencias significativas entre el TC ( $8.39 \pm 0.09$ ) y las concentraciones de T20 ( $8.51 \pm 0.05$ ) y T60 ( $8.51 \pm 0.05$ ) ppm respectivamente. Sin embargo, a las 72 horas se puede evidenciar que el TC ( $8.39 \pm 0.09$ ) también difiere de T40 ppm ( $8.44 \pm 0.06$ ; Figura 5.d).

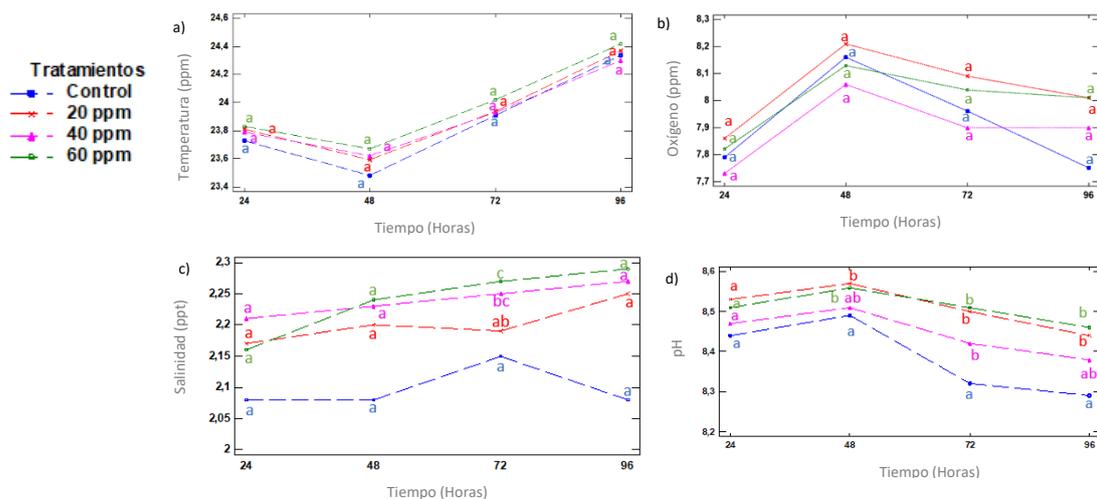


Figura 5: Análisis del comportamiento de los parámetros ambientales vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Temperatura, b) Oxígeno, c) Salinidad y d) pH. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.1.6 Parámetros Químicos: NH<sub>3</sub> (ppm); NO<sub>3</sub> (ppm); NO<sub>2</sub> (ppm); Fósforo (ppm) en el tiempo.

No se reportaron cambios significativos en los valores de calcio y dureza total entre tratamientos medidos en cada intervalo de 24 horas ( $p > 0.05$ ; Figura 6 a y b).

El tratamiento de T40 ( $2.43 \pm 2.22$ ) en NH<sub>3</sub> difiere del TC ( $0.55 \pm 0.42$ ) a partir de las 72 horas, mientras que, a las 96 horas todos los tratamientos empleados muestran diferencias significativas con el TC (Figura 6.c).

En el caso de nitrato, a pesar de que los tratamientos muestran mayor contenido comparado con el control, sus diferencias no son significativas a las 24h. Este comportamiento se mantiene hasta las 48 horas donde el TC muestra significativamente el valor más bajo ( $22.27 \pm 2.42$ ) comparado con T40 ( $34.88 \pm 5.48$ ) y T60 ( $40.1 \pm 13.06$ ) con una reducción significativa en todos los tratamientos con nitratos que siguen siendo significativamente superior al TC (Figura 6.d).

Los niveles de fósforo aumentan con respecto al tiempo sin embargo este incremento no es significativo a las 24, 48, 72 h para ninguno de los tratamientos con un cambio hacia las 96 h entre TC ( $1.51 \pm 0.66$ ) y T60 ( $1.30 \pm 0.61$ ; Figura 6.f) debido a la acumulación del alimento no consumido por parte de los camarones. Con respecto a ello, Claude Boyd (2016) indica:

“Las fuentes principales de fósforo son el alimento y los fertilizantes porque aunque existe una concentración natural de este compuesto en el medio, su concentración es muy baja”.

En el control no se adicionó ningún compuesto, sin embargo, los niveles de nitrito fueron cambiando con respecto al tiempo; resultando TC ( $13 \pm 1.00$ ) estadísticamente iguales a TC20 ( $19.57 \pm 1.53$ ) a las 96 horas. El análisis de este fenómeno es necesario porque no se reportaron organismos muertos en estos acuarios, sin embargo, permite conocer la dinámica del agua acorde al compuesto analizado y el impacto que podría generar en el medio al no ser controlado (Figura 6.e).

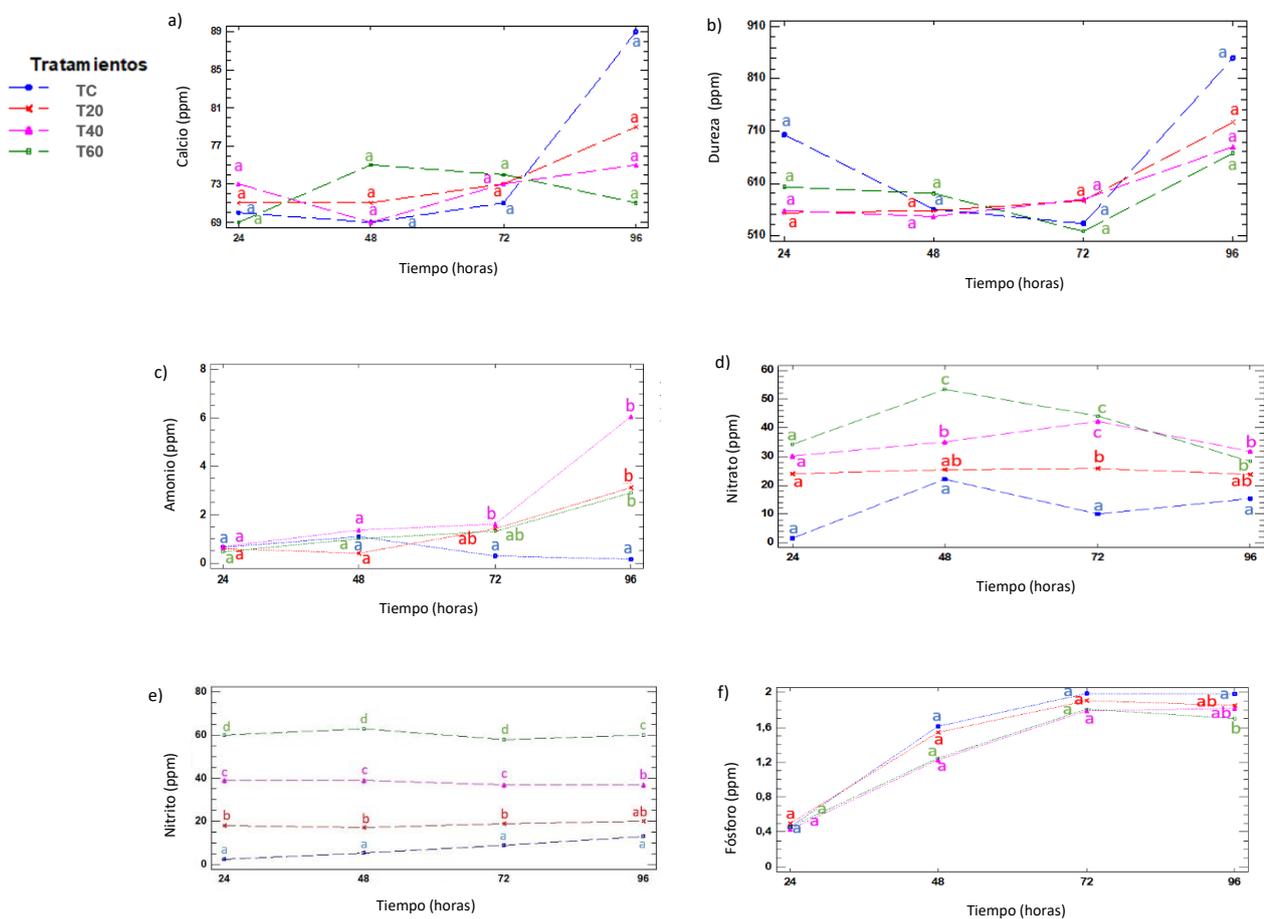


Figura 6: Análisis del comportamiento de los parámetros químico vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Calcio, b) Dureza, c) Amonio, d) Nitrato, e) Nitrito, f) Fósforo. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.1.7 Análisis multivariado

La matriz de correlación multivariada (Figura 7) mostró que la mortalidad observada en los diferentes tratamientos se correlacionaba mayormente con las variables de compuestos nitrogenados tales como Nitrito (0.54), Amonio y amoniaco (0,53), nitrato (0,56), y los parámetros ambientales como temperatura (0,51), OD (0,49).

Correlation (-1 to 1)

	Variables																
	Nitrito	Calcio	Dureza de cal	Dureza Total	Amonio	Amoniaco	Fosfato	Fósforo	Nitrato	Oxigeno	Temperatura	Ph	%OD	SPC	Salinidad	Mortalidad	
Nitrito																	
Calcio	-0,047542																
Dureza de calcio	-0,045505	0,99512															
Dureza Total	-0,17278	0,47006	0,47944														
Amonio	0,11766	0,10464	0,10111	0,22002													
Amoniaco	0,12502	0,11326	0,11194	0,22435	0,98691												
Fosfato	-0,11727	0,36437	0,3508	0,16801	0,30668	0,27015											
Fósforo	-0,11683	0,36343	0,34978	0,1667	0,30753	0,27091	0,99999										
Nitrato	0,79371	-0,018429	-0,024631	-0,26234	0,19347	0,18809	0,068109	0,068802									
Oxigeno	0,035074	-0,28063	-0,28379	-0,37184	-0,066174	-0,051744	0,33796	0,33941	0,23514								
Temperatura	0,098268	0,52121	0,51837	0,49717	0,47514	0,45713	0,41875	0,41842	-0,027856	-0,32215							
Ph	0,34571	-0,47205	-0,47499	-0,40798	-0,20525	-0,14778	-0,37783	-0,37654	0,43917	0,53741	-0,54639						
%OD	0,071714	0,01794	0,012472	-0,11979	0,19083	0,18352	0,70006	0,70102	0,25299	0,85607	0,090282	0,16787					
SPC	0,37625	-0,4656	-0,46807	-0,26449	0,28982	0,29273	-0,092472	-0,091416	0,34325	0,11566	-0,028863	0,28517	0,089528				
Salinidad	-0,10919	0,017472	-0,047648	-0,11406	0,026856	0,0237	0,20715	0,20844	-0,0012575	0,18265	-0,0088675	0,15593	0,17696	0,078241			
Mortalidad	0,54199	0,088597	0,081924	0,075171	0,53459	0,53137	0,38642	0,38676	0,56503	0,28122	0,51441	0,1607	0,49424	0,42535	0,12907		

Figura 7: Matriz de correlación entre variables ambientales y las mortalidades observadas. Autora: Francisca Burgos

El PCA (Figura 8) demostró que las variables ambientales y químicas de los tratamientos evaluados mostraban una significativa separación influenciada mayormente por el tratamiento en el tiempo. ANOSIM corroboró que la variable Tratamiento-Tiempo presentó el mayor efecto en la distribución espacial de los tratamientos evaluados (R:0,715;  $p < 0,05$ ) seguido del tiempo (R:0.526 y  $P < 0,05$ ) y un menor efecto el tratamiento solo (R:0.201 y  $p < 0,05$ ). Al comparar el factor Tratamientos-Tiempo solo T20-96 fue significativamente diferente del tratamiento T60-96.

Los eigenvalues presentes en el PCA indican que el pH, O2, SPC, Nitrito eran las variables que mayor definición y contribución a la variación observada entre los dos componentes.

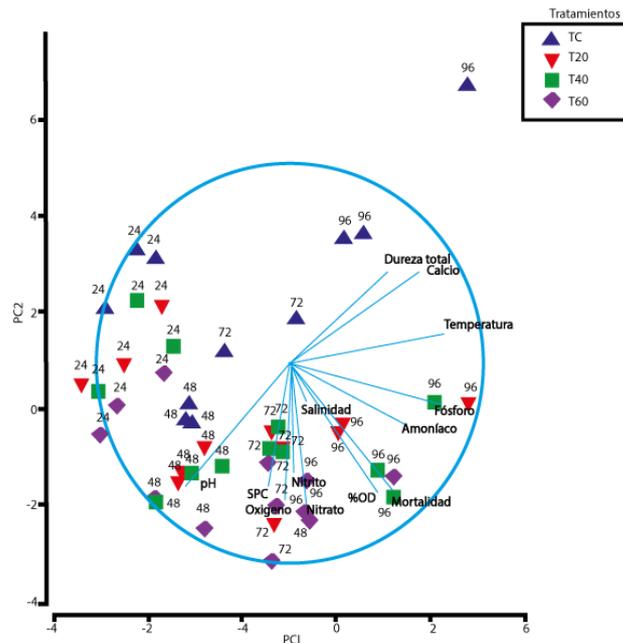


Figura 8: PCA de parámetros ambientales y químicos observados por tratamientos en el tiempo. Los eigenvalues indican las variables que mayor influencia en la distribución de las observaciones provenientes de los tratamientos. Autora: Ph.D. Francisca Burgos

### 3.2 Post larvas

#### 3.2.1 Concentración letal media (CL50) de nitrito en post- larvas

El CL50 mostro que en post larvas la toxicidad aumenta a medida que se incrementa la concentración de nitrito, entre 30-40 ppm reduciéndose el tiempo a 48 h, mientras que la CL50 a 72 se observa a concentraciones de 20 ppm.

#### 3.2.2 Evaluación de la mortalidad

La tasa de mortalidad acumulada global (Figura 9) presentó que las mortalidades en todos los tratamientos de nitritos fueron significativamente superior comparados al TC ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, entre los tratamientos de nitrito, el T40 (95%) presentó mortalidades significativamente mayores comparado con el tratamiento T20 (61%,  $p < 0.05$ ) y no así con el T30 (79%,  $p > 0.05$ ). No se observó diferencias de mortalidades entre T20 y T30 ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de mortalidad en los grupos control fue de 0% a las 72h de exposición.

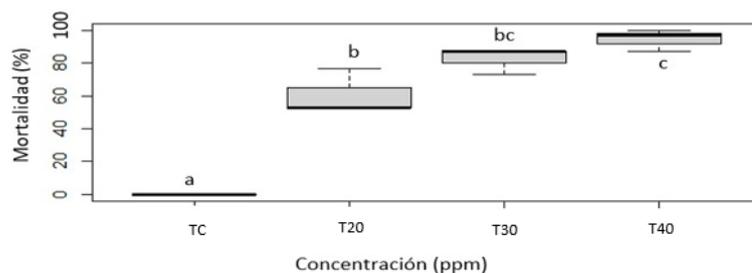


Figura 9: Mortalidad acumulada (%) de los diferentes tratamientos en post larva. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar.

La curva de mortalidad en el tiempo (Figura 10) reportó que la mortalidad observada en los tratamientos de nitrógeno fue significativamente superior a las 72h comparado con el tratamiento control ( $p < 0.05$ ). A las 24h el tratamiento T20 no presentó diferencias ni con el TC ni con T30 o T40 ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, a partir de las 48 horas se observaron aumentos significativos de mortalidad en los tratamientos T40 y T20 comparados con TC pero no entre los tratamientos de nitrito y esta tendencia se mantuvo hasta la 72h de ensayo.

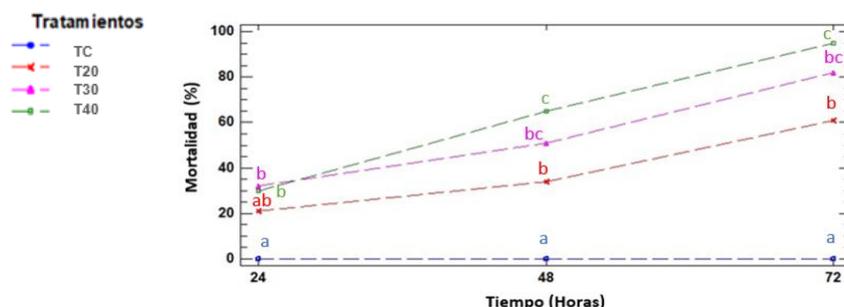


Figura 10: Mortalidad (%) vs tiempo según los diferentes tratamientos. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.2.3 Determinación de las concentraciones seguros de nitrito

Para la determinación del nivel seguro de metabolitos tóxicos Boyd & Tucker (1998) han estimado un factor de 0.05 a 0.10 dependiente de la tolerancia del organismo hacia los compuestos nitrogenados. Debido a que las estimaciones se realizan en aguas de baja salinidad (2 ppt) en las que el animal se encuentra mayormente expuesto a este compuesto se utiliza el factor de aplicación 0.05 (Tabla 4). Se puede observar que existe una relación inversamente proporcional entre el tiempo de exposición y la concentración de nivel seguro de NO<sub>2</sub>.

Tabla 4: Concentraciones seguras de nitrito (ppm) para post larvas determinado a partir del LC50. Autores: Mickaela Escobar y Carolina Nieto

Tratamiento	Tiempo (h)	Concentraciones (ppm)	Nivel Seguro (ppm)
T40	48	37.33 ± 3.06	1.87
T30	48	32.00 ± 3.46	1.60
T20	72	19.33 ± 4.73	0.97

### 3.2.4 Evaluación de los parámetros de calidad de agua vs la mortalidad

En general los valores de calidad de agua se describen en la tabla 5 por cada tratamiento.

Tabla 5: Promedio de los parámetros evaluados en el bioensayo de post larvas con respecto a los tratamientos empleados. Autoras: Mickaela Escobar y Carolina Nieto

Parámetro	TC	T20	T30	T40
Nitrito (ppm)	5.11 ± 3.14	18.44 ± 6.89	30.00 ± 2.96	35.56 ± 4.67
Calcio (ppm)	69.44 ± 17.16	57.69 ± 1.81	60.18 ± 6.26	63.20 ± 8.04
Dureza de calcio (ppm)	173.33 ± 42.52	144.22 ± 4.52	150.44 ± 15.65	159.33 ± 18.33
Dureza Total (ppm)	517.78 ± 53.10	524.44 ± 33.95	545.56 ± 35.39	533.33 ± 44.16
Amonio (ppm)	2.10 ± 2.16	3.08 ± 3.00	2.30 ± 2.24	1.90 ± 1.87
Amoniaco (ppm)	0.27 ± 0.26	0.52 ± 0.48	0.39 ± 0.36	0.31 ± 0.31
Fosfato (ppm)	1.18 ± 1.18	1.93 ± 1.17	1.66 ± 1.01	1.99 ± 1.25
Fósforo (ppm)	0.65 ± 0.33	0.63 ± 0.38	0.54 ± 0.33	0.64 ± 0.341
Nitrato (ppm)	3.06 ± 1.45	14.88 ± 5.04	26.20 ± 8.54	36.73 ± 9.41
Oxígeno (ppm)	7.02 ± 0.3	6.89 ± 0.33	6.94 ± 0.43	7.07 ± 0.40
Temperatura (°C)	25.58 ± 0.5	25.56 ± 0.53	25.62 ± 0.41	25.65 ± 0.50
pH	8.41 ± 0.08	8.51 ± 0.05	8.56 ± 0.03	8.51 ± 0.10
OD (%)	86.02 ± 3.36	84.46 ± 3.66	86.49 ± 2.74	87.04 ± 4.44
Salinidad (ppt)	2.06 ± 0.04	2.10 ± 0.04	2.09 ± 0.04	2.04 ± 0.08
Mortalidad	0 ± 0	18.33 ± 4.04	24.66 ± 2.30	28.33 ± 2.08

### 3.2.5 Parámetros ambientales: Oxígeno (ppm), temperatura (°C), salinidad (ppt) y pH en el tiempo.

A pesar de que hubo un incremento del oxígeno hacia las 72h del bioensayo en todos los tratamientos, estos cambios no fueron significativos. Inversamente la temperatura mostro sus valores más bajos a las 48h con un incremento hacia las 72h sin embargo esto no fue estadísticamente iguales ( $p>0.05$ , Figura 11. a y b)

En el caso de la salinidad los valores a las 24, 48 y 96 h no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ), 24 h ( $2.11\pm 0.04$  ppt), 48h ( $2.08\pm 0.04$  ppt) y 72h ( $2.07\pm 0.05$ ; Figura 11.c).

Con relación al pH, a partir de las 48 h el TC ( $8.36 \pm 0.08$ ) disminuyo significativamente con T30 ( $8.54 \pm 0.04$ ) y T40 ( $8.53 \pm 0.03$ ) respectivamente ( $p<0.05$ ). Sin embargo, a las 72h no hubo cambios significativos en el pH en ninguno de los tratamientos ( $p>0.05$ ; Figura 11.d).

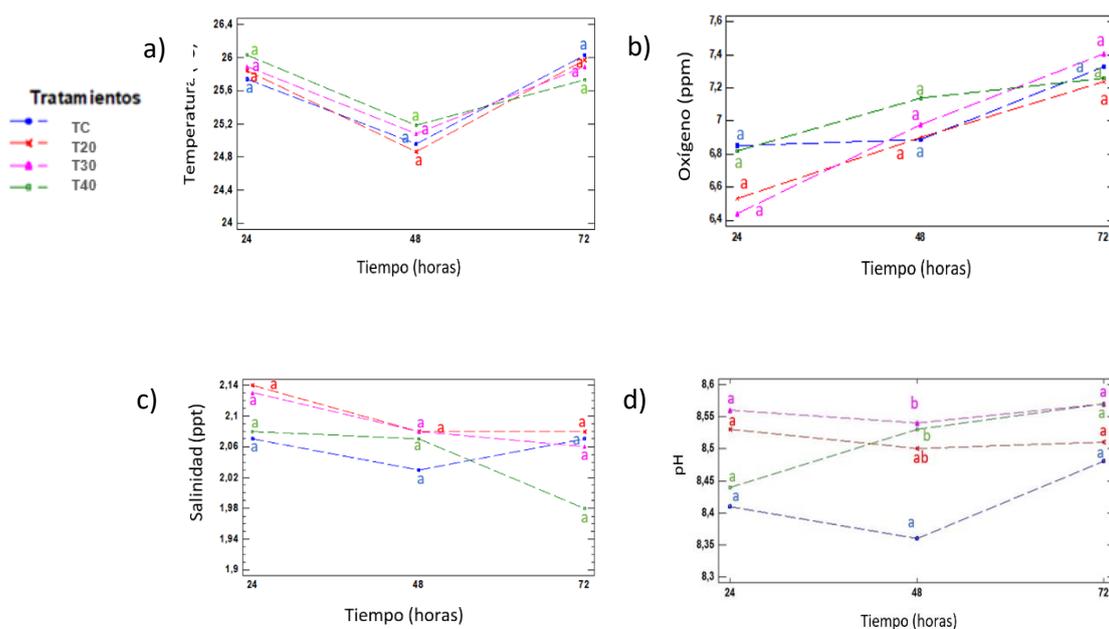


Figura 11: Análisis del comportamiento de los parámetros ambientales vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Temperatura, b) Oxígeno, c) Salinidad y d) pH. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.2.6 Parámetros químicos: NH<sub>3</sub> (ppm); NO<sub>3</sub> (ppm); NO<sub>2</sub> (ppm); Fósforo (ppm) en el tiempo.

No se reportaron cambios significativos en los valores de dureza total y calcio entre tratamientos medidos en cada intervalo de 24 horas ( $p>0.05$ , Figura 12. a y b)

En el caso del amonio y fósforo se observó un incremento en todos los tratamientos hacia el final del ensayo sin que se evidencie significancia (Figura 12. c y f). En contraste, el nitrato presentó una tendencia a la reducción, siendo significativamente superior a lo largo del estudio en todos

los tratamientos de nitrógeno comparado con el TC ( $p > 0.05$ ). A partir de las 24h, el TC, T40 y T30 reportaron concentraciones significativamente más altas que T20 en el mismo tiempo. No obstante, todos los tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí para las 48h disminuyendo la brecha de diferencias observadas hacia las 72h donde TC, T40 y T30 mostraron cambios significativos comparados con T20 (Figura 12.d,  $p > 0.05$ )

Las concentraciones de nitrito en el control variaron con el transcurso del tiempo en las post larvas, es decir, muestran diferencias significativas ( $p\text{-value} > 0,05$ ) entre el inicio de la experimentación con respecto a las 48 horas ( $8,00 \pm 3,00$  ppm) y 72 horas ( $5,00 \pm 1,00$  ppm) respectivamente. A las 72 h disminuye el nitrito en TC presentando similitudes con el control a las 24 h ( $2,33 \pm 2,31$  ppm), este fenómeno se debe al proceso de nitrificación (Figura 12.e).

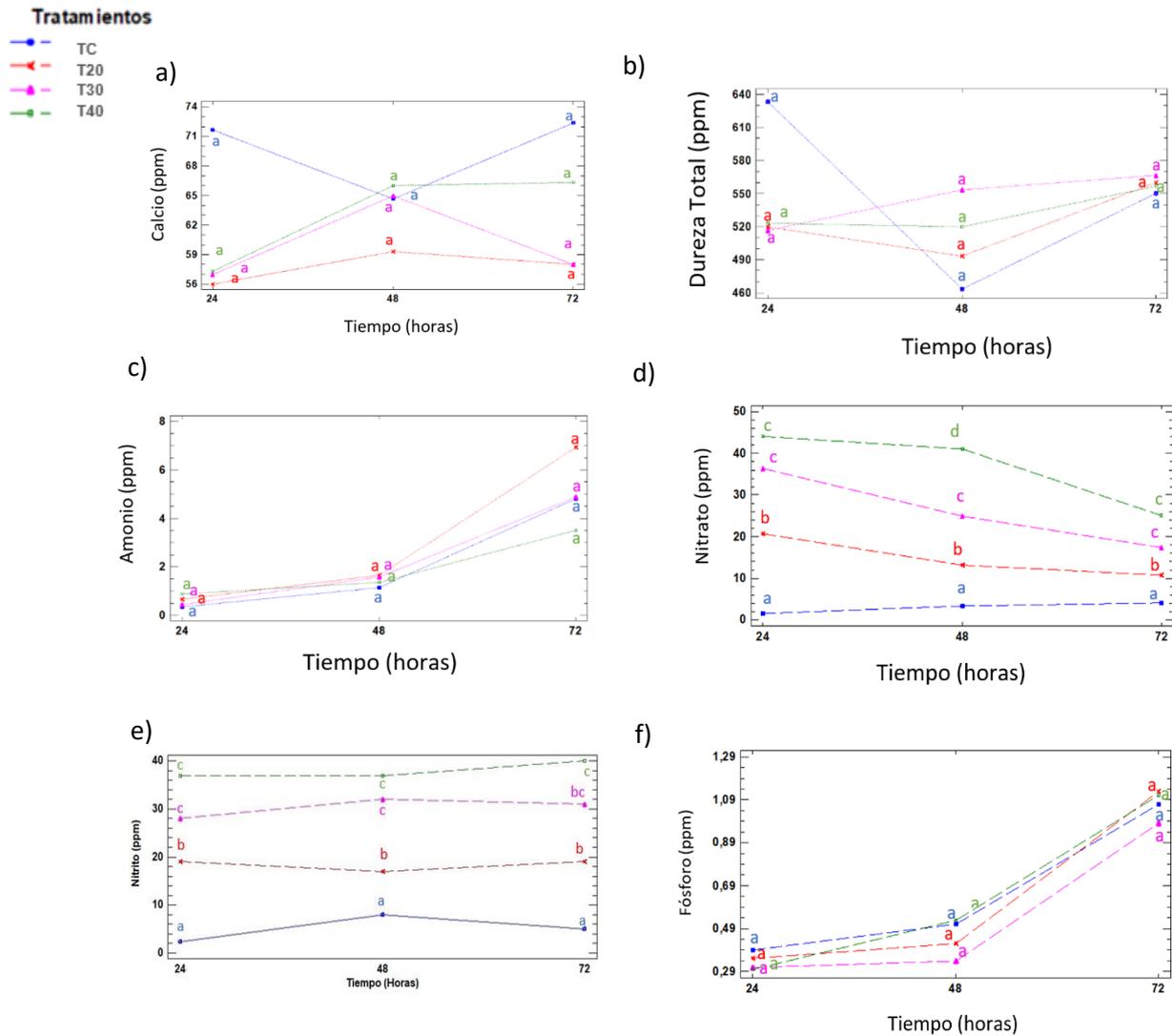


Figura 12: Análisis del comportamiento de los parámetros químico vs. Tiempo según los diferentes tratamientos: a) Calcio, b) Dureza, c) Amonio, d) Nitrato, e) Nitrito, f) Fósforo. Autoras: Carolina Nieto y Mickaela Escobar

### 3.2.7 Análisis multivariado

El PCA (Figura 13) demostró que las variables ambientales y químicas de los tratamientos eran significativamente influenciados mayormente por el tratamiento en el tiempo. ANOSIM corroboró que la variable Tratamiento-tiempo mostro el mayor efecto en la distribución espacial de los tratamientos evaluados ( $R:0,624$ ;  $p<0,05$ ) seguido del tiempo ( $R:0.51$  y  $P<0.05$ ) y un menor efecto el tratamiento solo ( $R:0.181$  y  $p<0.05$ ). Al comparar el factor tratamientos-tiempo el TC-24 fue significativamente diferente del TC-48; el T30-48 fue significativamente diferente T40-48 y el T40-24 fue significativamente diferente del T40-48.

Los eigenvalores presentes en el PCA indican que el Nitrito, Nitrato, temperatura eran las variables que mayor definición y contribución a la variación observada entre los dos componentes.

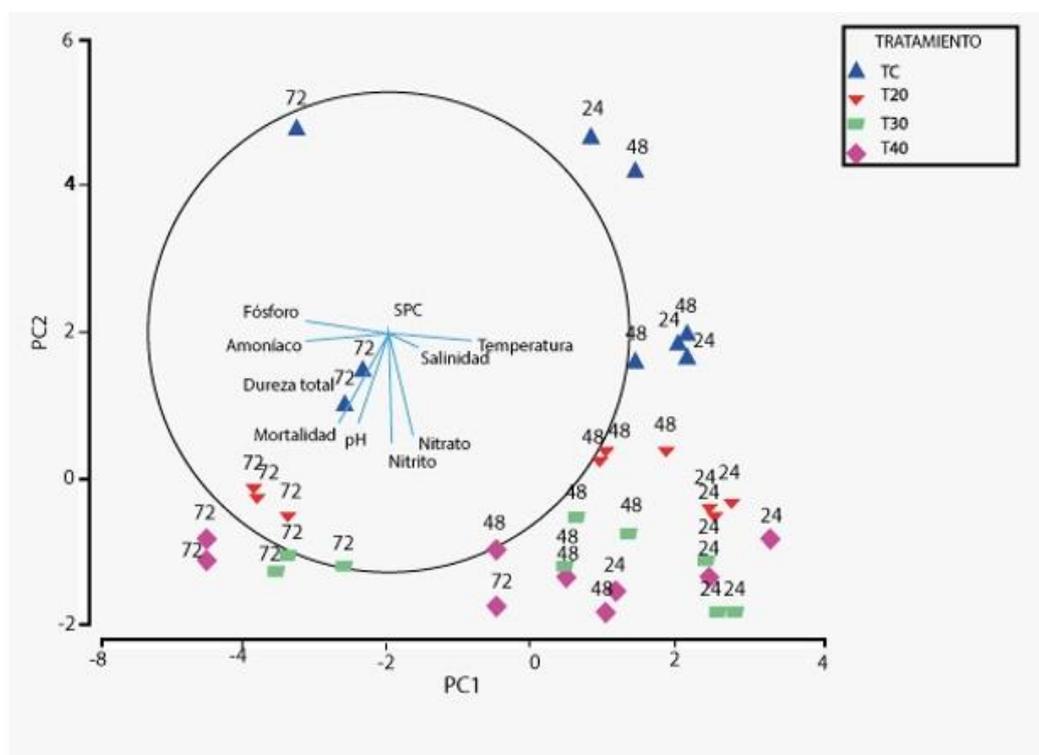


Figura 13: PCA de parámetros ambientales y químicos observados por tratamientos en el tiempo. Los eigenvalores indican las variables que mayor influencia en la distribución de las observaciones provenientes de los tratamientos. Autora: PhD. Francisca Burgos.

### 3.3 Histopatología

Los resultados histopatológicos mostraron que los animales del tratamiento control no mostraron signos clínicos de alteraciones en los órganos analizados causado por virus, bacterias u hongos para los dos bioensayos. No obstante, para los animales adultos que fueron expuestos a concentraciones de nitritos entre 20 y 60 ppm mostraron presencia de bacterias gram negativas en un nivel entre 3 (moderados) para las exposiciones a 20ppm, y nivel 4 (abundantes) para los que fueron expuestos a 40 y 60 ppm respectivamente.

Histológicamente, los hepatopáncreas de los animales expuestos a las diferentes concentraciones de nitrito presentaron nódulos, granulomas,

infiltración de hemocitos y masa de bacterias en el lumen de los túbulos que variaban en abundancia a medida que las dosis de exposición se incrementaba (Figura 14. a, b y c). Estas lesiones documentadas podrían asociarse a un Síndrome de Necrosis Aguda de Hepatopáncreas, sin embargo, se debe confirmar con técnicas moleculares la identidad de las bacterias observadas. En cuanto a las post larvas que fueron expuestas a concentraciones de 20, 30 y 40 ppm presentaron inflamación anormal de hemocitos en las lamelas branquiales con proceso de disolución parcial de los epitelios a un grado de aseveración de 4 en todos los organismos analizados (Figura 15 a, b, c).

Adicionalmente, ninguno de los animales en los dos bioensayos tratados con nitrito ni los controles presentaron signos clínicos asociados a WSSV (Virus de la mancha Blanca), YHV (virus de la cabeza amarilla), IHNNV (Virus de la Infección Necrótica, Hipodérmica y Hematopoyética), TSV (Virus del Síndrome de Taura); ni las patologías: Hepatopancreatitis Necrotizante (NHP), ni Mionecrosis infecciosa (MI).

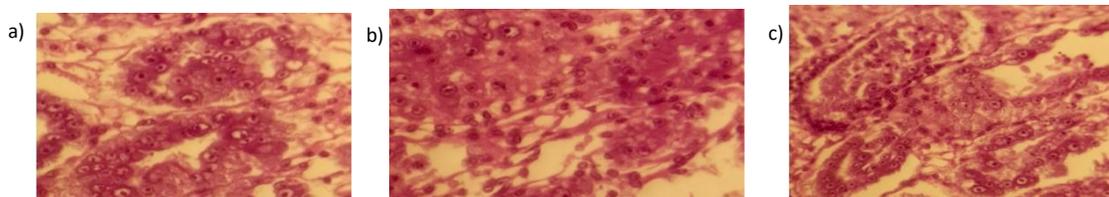


Figura 14: Resultados histopatológicos del Hepatopáncreas de animales adultos. a) T20, b) T40, c) T60.

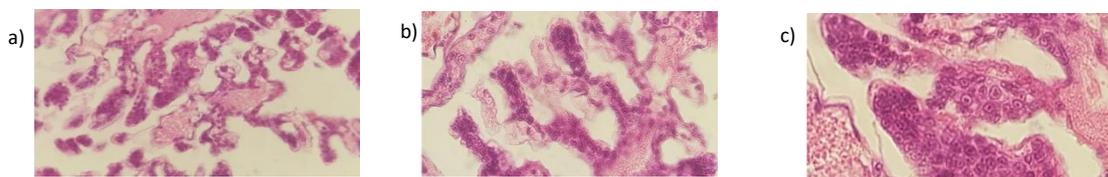


Figura 15: Resultados histopatológicos de las lamelas branquiales de post larva. a) T20, b) T30, c) T40.

### 3.4 Discusión

En el presente proyecto se demostró que con una salinidad de 2 ppt en post larvas (pl41) el LC50 en T30 y T40 se alcanzó a las 48 horas y T20 a las 72 horas. Mientras que en la investigación presentada por Gladys Valencia et.al. (2020) evaluando post larvas (pl20) a una salinidad de 1 ppt se obtuvo el LC50 a las 24 horas del tratamiento de 30 ppm. Se puede observar que, aunque por la diferencia de salinidades debería existir mayor afectación en el ensayo de 2 ppt, sin embargo, otro factor incidente es el estadio de la larva cuya resistencia es mayor en pl41. Con respecto a los otros parámetros y su relación a diferentes concentraciones de nitrito, se encontró referencia únicamente del calcio y la dureza; demostrando también que no existen diferencias significativas entre tratamientos. En cuánto a los adultos ( $8 \pm 0,32$ ) g el LC50 se alcanzó a las 72 horas con T60, mientras que a las 96 horas fue de T20 y T40 esto se puede cotejar con el estudio de Ramírez Rochín et al (2017) que con una concentración de 20 ppm y peso de 4 gramos su LC50 se alcanzó a las 24 horas.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- La CL50-96 de toxicidad a nitritos en adultos se ubica entre 20-40 ppm; mientras que la respuesta de las post larvas al exponerlas a la misma concentración implica que aceleran su mortalidad por toxicidad al incrementar la concentración de nitritos de CL50-72 cuando es expuesto a 20 ppm a CL50-48 cuando son expuestas a 40ppm. De manera similar sucede cuando se expone a los adultos a concentraciones de 60 ppm ubicando la CL50-72h.
- El porcentaje de mortalidad acumulada total más alto observado entre todos los tratamientos en adultos a las 96 h fue del 70% en animales expuestos a 60 ppm. Mientras que en las post larvas la tasa más alta observada entre todos los tratamientos fue de 94.4% a las 72 h a una exposición de 40ppm. En ningún caso los tratamientos control en adultos y en post larvas presentaron mortalidades durante los ensayos.
- Las tasas estimadas de seguridad se ubican entre 0.98 – 1.85 ppm en adultos ( $8 \pm 0,32$ ) g y en post larvas (pl41) a 0.97 ppm. Estos valores fueron considerados debido al mayor tiempo de exposición que resistieron los animales dentro del bioensayo, 96 y 72 horas respectivamente.
- En ambos estadios el tiempo ejerce un efecto significativo sobre la modulación de los parámetros ambientales y de calidad de agua en cada tratamiento. Las mortalidades están correlacionadas fuertemente con la concentración de fuentes nitrogenadas como amonio, nitritos y nitratos, siendo particularmente la correlación con el nitrito de 0,56 y 0.679 para adultos y post larvas respectivamente. Los cambios en los parámetros ambientales y de calidad de agua observado en el tiempo demostró que los parámetros de pH, O<sub>2</sub> y nitrato en el caso de los adultos eran los que mayormente contribuían con la distribución de los tratamientos, mientras que en las post larvas fueron el N02, NO3 y la temperatura
- El nitrito al aumentar su disponibilidad en el cultivo provocó cambios morfológicos en camarones adultos caracterizados por daños en el hepatopáncreas y afecciones en las lamelas branquiales de las post larvas.
- En caso de los adultos, la severidad aumentó a mayores concentraciones, mientras que en post larva a partir de T20 presentaron el máximo grado de afección con una frecuencia presente en todos los organismos analizados.

#### **4.2 Recomendaciones**

- Las concentraciones encontradas en nuestro proyecto son valores referenciales porque la toxicidad por nitrito puede variar por pH, temperatura, salinidad y tamaño del organismo.
- Se deberían realizar más bioensayos de los factores que aumentan la toxicidad por nitrito como la salinidad, pH, temperatura, edad del organismo, entre otros para establecer una tabla referencial donde se plasme los resultados con la finalidad de obtener más información.
- El sector acuícola debe prestar especial atención en el alcance de los metabolitos tóxicos sobre todo en los compuestos nitrogenados ya que le permitiría al camarón expresar su potencial genético.

## Anexos

### Anexo 1: Preparación de concentraciones

#### Para adultos

- 1) Se realizaron los cálculos matemáticos para determinar los gramos de nitrito de sodio que se necesitan para obtener una solución madre en concentración de 10.000 ppm para realizar el bioensayo en camarones adultos y de 1000 ppm para las post – larvas (Capítulo 2)
- 2) Luego de tener los cálculos, se colocó una caja Petri de vidrio en la balanza, se encendió y se comenzó a verter la sustancia de nitrito de sodio hasta alcanzar los 15 y 1.5 gramos.
- 3) Teniendo el peso de 15 y 1.5 gramos se ubicó las dos cajas Petri en la estufa por 2 horas a una temperatura de 110° para que la sustancia se seque.
- 4) Se llenó dos balones aforado de 1000 litros con agua destilada y se vertió la solución de nitrito de sodio de 15 y 1.5 gramos en cada uno.
- 5) Se preservó la solución con un mililitro de cloroformo y se la guardo en refrigeración
- 6) Para verificar la concentración, se realizó una disolución de 0.5 ml de la solución madre en 250 ml de agua destilada, que nos debería dar como resultado 20 ppm, luego de dicha disolución se tomó 10 ml y se lo colocó en un tubo de ensayo con el reactivo de nitrito para poderlo medir en el espectrofotómetro.
- 7) Una vez verificada la concentración, se procedió a realizar las concentraciones de 20, 40 y 60 ppm para los adultos y 10, 20 y 30 ppm para post - larva con la siguiente formula

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

C1= Es la concentración de la solución madre

V1= volumen que se debe extraer para alcanzar la solución deseada

C2= concentración deseada

V2= volumen que se va a realizar el experimento

Para adultos

Concentración de 20 ppm

$$10000 \text{ ppm} * v1 = 20 \text{ ppm} * 35550 \text{ mililitros}$$
$$v1 = \frac{20 * 35550}{10000} = 71.1 \text{ ml}$$

Concentración de 40 ppm

$$10000 \text{ ppm} * v1 = 40 \text{ ppm} * 35550 \text{ mililitros}$$
$$v1 = \frac{40 * 35550}{10000} = 142.2 \text{ ml}$$

Concentración de 60 ppm

$$10000 \text{ ppm} * v1 = 60 \text{ ppm} * 35550 \text{ mililitros}$$
$$v1 = \frac{60 * 35550}{10000} = 213.3 \text{ ml}$$

## Para post larvas

Concentración de 10 ppm

$$1000 \text{ ppm} * v1 = 10 \text{ ppm} * 1000 \text{ mililitros}$$

$$v1 = \frac{10 * 1000}{1000} = 10 \text{ ml}$$

Concentración de 20 ppm

$$1000 \text{ ppm} * v1 = 20 \text{ ppm} * 500 \text{ mililitros}$$

$$v1 = \frac{20 * 1000}{1000} = 20 \text{ ml}$$

Concentración de 30 ppm

$$1000 \text{ ppm} * v1 = 30 \text{ ppm} * 500 \text{ mililitros}$$

$$v1 = \frac{30 * 1000}{1000} = 30 \text{ ml}$$

- En caso de disminución del nitrito:

Se analizó con el volumen a colocar con la fórmula:  $C_1V_1 = C_2V_2$

Siendo,

- $C_1$ : Concentración de la solución madre.
- $V_1$ : Valor a encontrar, cantidad de la solución madre que se debe colocar para reajustarla a la concentración requerida.
- $C_2$ : Concentración a extraer de la solución madre para completar la concentración requerida en la experimentación (20, 40 y 60 ppm).
- $V_2$ : Volumen de la unidad experimental (35.55 L)

Por ejemplo:

Si la unidad experimental en el análisis de nitrito marcó 15 ppm para el tratamiento con 20 ppm en un volumen de 35,55 litros; se debe completar 5 ppm de la concentración madre con 10.000 ppm, sin embargo, se desconoce el volumen a extraer, por ende;

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(5 \text{ ppm}) (35.550 \text{ mL})}{10.000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 17,78 \text{ mL}$$

Finalmente, obtuvimos el valor de 17,78 mL que es el valor que debe colocarse a esa unidad experimental, este proceso se repite para cada gaveta.

## Anexo 2: Fotografías de la experimentación



Figura 16: Fotografías de la experimentación para determinar el LC50 de nitrito en post larvas y adultos de *Penaeus vannamei*.

## Bibliografía

- Abarca, E. (2014). *Determinación de la toxicidad aguda CL50, con plomo en juveniles de camarón y alevines de tilapia roja*.  
[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1988/7/CD672\\_TESIS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1988/7/CD672_TESIS.pdf)
- Acuacultura, C. N. de. (2021). Exportaciones de camarón ecuatoriano. Estadísticas. *Aquacultura*, 61.
- Balod, S. (2021). La industria camaronera ecuatoriana y sus oportunidades de mercado. *Aquacultura*, 8, 9, 64,. <https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion139>
- Boyd, C. (2007). Nitrification an important process in aquaculture « Global Aquaculture Advocate. *Global Aquaculture Advocate*, May 2007, 5.  
<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/nitrification-an-important-process-in-aquaculture/>
- Boyd, C. (2016). Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón. *Aquaculteres*, 16(2), 76. <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1529/1/170Ing.pdf%0Ahttp://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/edublog/cprofestenerifesur/2015/12/03/la-taxonomia-de-bloom-una-herramienta-imprescindible-para-ensenar-y-aprender/%0Ahttp://dspace.ucuenca.edu.ec/bi>
- Boyd, C. (2018). Revisando el desequilibrio iónico en el cultivo de camarón a baja salinidad. *Global Aquaculture Advocate*, 4.  
<https://www.aquaculturealliance.org/advocate/revisando-el-desequilibrio-ionico-en-el-cultivo-de-camaron-a-baja-salinidad/>
- Boyd, C., & Tucker, C. (1998). *Pond Aquaculture Water Quality*.
- Crespi, V., & New, M. (2009). Penaeidae. *Food and Agriculture Organization*, 14.  
[http://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es\\_w hitelegshrimp.htm](http://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_w hitelegshrimp.htm)
- Frías, M., & Páez, F. (2001). Toxicidad de los compuestos del nitrógeno en camarones. *Camaronicultura y Medio Ambiente*, 253–276.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/are.13069>
- Gross, A., Shai, A., & Dina, Z. (2004). Acute and Chronic Effects of Nitrite on White Shrimp,. *The World Aquaculture Society*, 35(3), 7.
- Huang, M., Xie, J., Yu, Q., Xu, C., Zhou, L., Qin, J. G., Chen, L., & Li, E. (2020). Toxic effect of chronic nitrite exposure on growth and health in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 529(May), 735664.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735664>
- Kir, M., & Kumlu, M. (2006). Acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* postlarvae in relation to salinity. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2), 231–235.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00033.x>
- Martins, F., & Cupertino, E. (2019). Determinación de niveles seguros de amoníaco y nitrito para el cultivo de langostinos. *Global Aquaculture Advocate*, 0(February 2017).
- Navia, V., & Gallardo, E. (2018). *Análisis comparativo de la producción camaronera en agua dulce y salada en el cantón Jama*.  
[http://repositorio.uees.edu.ec/bitstream/123456789/2890/1/NAVIA CHIA VERONICA](http://repositorio.uees.edu.ec/bitstream/123456789/2890/1/NAVIA%20CHIA%20VERONICA)

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN CAMARONERA EN AGUA DULCE Y SALADA EN EL CANTÓN JAMA.pdf

- Piedrahita, Y. (2018). La industria de cultivo de camarón en Ecuador. *Global Aquaculture Alliance*, 9. <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/la-industria-de-cultivo-de-camaron-en-ecuador-parte-2/>
- Ramírez Rochín, J., Frías Espericueta, M. G., Fierro Sañudo, J. F., Alarcón Silvas, S. G., Fregoso López, M. G., & Páez Osuna, F. (2017). Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. *Aquaculture Research*, 48(5), 2337–2343. <https://doi.org/10.1111/are.13069>
- Rivera, R. (2011). Amoníaco en estanques de producción. *Ecuacuimica*.
- Saez, A. (2014). Toxicidad nitrítica afectada por la susceptibilidad de las pescies, condiciones ambientales. *Congreso de Acuicultura*. <https://congresodeacuicultura.es/toxicidad-nitritica-afectada-por-la-susceptibilidad-de-las-especies-condiciones-ambientales/>
- Saldias, C., & Sonnenholzner, S. (2002). Balance de nitrógeno y fósforo en estanques de producción de camarón en ecuador. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 17–19.
- Sánchez, L., & Andrade, A. (2008). *Determinación de la concentración letal media del cianuro, por medio de bioensayos sobre alevinos de Trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)* [Universidad de La Salle]. [http://www.mamacoca.org/docs\\_de\\_base/Fumigas/Barrros\\_y\\_Gamez\\_Concentracion\\_glifosato\\_UdeLaSalle\\_dic2008.pdf](http://www.mamacoca.org/docs_de_base/Fumigas/Barrros_y_Gamez_Concentracion_glifosato_UdeLaSalle_dic2008.pdf)
- Valencia Castañeda, G., Frías Espericueta, M. G., Vanegas Pérez, R. C., Pérez Ramírez, J. A., Chávez Sánchez, M. C., & Páez Osuna, F. (2018). Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae in low-salinity water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(2), 229–234. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2355-z>
- Valencia, G., Frías, M., Vanegas, R., Chávez, M., & Páez, F. (2020). Physiological changes in the hemolymph of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* to sublethal nitrite and nitrate stress in low-salinity waters. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80(August). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103472>
- Vinatea, L. (2006). *Principios químicos de calidad de agua en acuicultura*. <https://es.scribd.com/doc/89752257/Calidad-de-Agua-para-piscicultura-2-edici-n-1>