

ESCUELA SUPERIOR
POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

“EFECTOS DEL FLAVOFOSFOLIPOL EN JUVENILES DE
Penaeus vannamei, INCORPORADO A TRAVES DE UNA
DIETA COMERCIAL”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de :

ACUICULTOR

Presentada por :

JUAN CARLOS VALLE MASSON

GUAYAQUIL - ECUADOR

1997

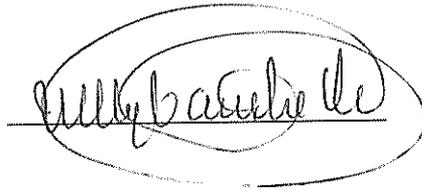
AGRADECIMIENTO

A DIOS principalmente porque sin la presencia y ayuda de el jamás hubiera realizado esta investigación; a mi enamorada Verónica Valle, a mis hermanos José Ruben y Edisón Patricio, a la Sra. María Giler de Valle, al Dr Frank Baylich, al Msc Allan Heres, al Msc Ewin Wilson, a la empresa Hoechst eteco dueña del producto Flavomycin, al Acuicultor Limber García Z, al Acuicultor David Serrano M, al Acuicultor Klever Silva y a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron en la realización de esta tesis de graduación.

De manera muy especial a la Dra Nelly Camba quien me brindó toda su paciencia y me apoyó técnica y moralmente para la realización de la misma.

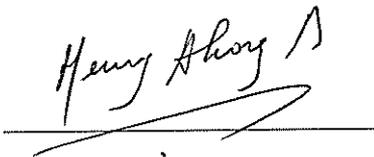
DEDICATORIA

A JESUCRISTO quien es mi Pastor, está a mi lado, guía mis caminos, y me ama; a mis Padres Eliecer y Mercedes; quienes en todo momento y principalmente en los más críticos supieron encauzarme por la senda correcta de la honestidad, humildad, respeto y trabajo a lo largo de toda mi corta existencia .

A handwritten signature in black ink, enclosed within a hand-drawn oval. The signature appears to read "Nelly Camba Campos".

Dra Nelly Camba Campos

**Presidente del Tribunal
Director de Tesis**

A handwritten signature in black ink, written above a horizontal line. The signature appears to read "Henry Alvarez Arellano".

Ac. Henry Alvarez Arellano

Miembro Tribunal

A handwritten signature in black ink, written above a horizontal line. The signature appears to read "Jerry Landivar Zambrano".

Msc. Jerry Landivar Zambrano

Miembro Tribunal

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”.

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



Juan Carlos Valle Masson

RESUMEN

Realice esta investigación para evaluar el efecto de un Promotor de Crecimiento, el Flavofosfolipol, en juveniles de Penaeus vannamei, incorporado en una dieta comercial con 35 % de proteína.

Esta investigación fue realizada en el laboratorio de larvas de camarón CRIDEC, situado en la zona de Punta Blanca, cercano a la ciudad de Manta, la misma que fue dividida en dos fases: la fisiológica, (de crecimiento y sobrevivencia), realizada desde el 26 de Febrero al 12 de Abril de 1994, y la microbiológica, (de estudios in Vitro), realizada desde el 26 de Febrero al 26 de Septiembre de 1994.

Nuestro diseño experimental constó de un control (0 PPM) con tres réplicas y de dos tratamientos: T1 (9.7 PPM), y T2 (22 PPM) con cuatro réplicas para cada tratamiento.

La alimentación fue proporcionada dos veces al día, el 40 % a las 08h00 y el 60% a las 16h00. Para medir el efecto del Flavofosfolipol evaluamos los resultados de sobrevivencia, peso promedio y conversión alimenticia, mediante ANOVAS y Pruebas de Rangos Múltiples al 95 % de confianza.

Observamos diferencias significativas entre los tratamientos y el control, en la sobrevivencia y la conversión alimenticia. La mejor sobrevivencia y la menor conversión

alimenticia correspondió al Tratamiento 2. No encontramos diferencias significativas para el peso promedio.

El costo medio más bajo lo obtuvimos en el Tratamiento 2.

Las especies bacterianas identificadas excelentemente fueron: Vibrio vulnificus, Vibrio sp., Vibrio alginolyticus y Aeromona sp.; y sus MIC para el Flavofosfolipol fueron: 4 ppm, 2ppm, 10ppm, 4ppm respectivamente.

INDICE GENERAL

	Pag.
RESUMEN.....	VI
INDICE GENERAL.....	VIII
INDICE DE FIGURAS.....	XII
INDICE DE TABLAS.....	XV
INDICE DE FOTOS	XXII
INTRODUCCION.....	22
I.- CARACTERISTICAS DEL FLAVOFOSFOLIPOL.....	25
1.1 .- Descripción del producto.....	25
1.1.1.- Origen.....	26
1.1.2.- Propiedades fisico-quimicas y formula estructural.....	26
1.1.3.- Mecanismos de acción y espectro de actividad antibacteriana.....	27
1.1.4.- Premezclas del Flavofosfolipol y miscibilidad.....	32
1.1.5.- Estabilidad.....	34
1.2.- Resistencia bacteriana.....	39
1.3.- Comportamiento en el ambiente.....	41

II.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO	42
2.1.- Descripción de las instalaciones.....	42
2.2.- Sistema del ensayo.....	43
2.2.1.- Materiales y equipos.....	43
2.2.2.- Diseño experimental.....	47
2.2.3.- Descripción del ensayo.....	49
2.2.4.- Medición de parámetros.....	53
III.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE <u>Vibrio sp</u> FRENTE AL FLAVO - FOSFOLIPOL.....	59
3.1.- Descripción del estudio microbiológico.....	59
3.1.1.- Introducción.....	59
3.1.2.- Descripción de las pruebas.....	60
3.2.- Concentración del agente antimicrobiano y preparación de las - diluciones.....	64
3.3.- Selección y preparación del medio.....	65
3.3.1.- Consideraciones generales.....	65
3.3.2.- Composición de los medios de cultivo.....	66
3.3.3.- Preparación del medio.....	67
3.4.- Identificación de <u>Vibrio sp</u>	70

3.4.1.- Selección y preparación de los medios de cultivo para el - aislamiento de <u>Vibrio sp.</u>	70
3.4.2.- Obtención de cepas.....	73
3.4.3.- Pruebas bioquímicas.....	75
3.4.3.1.- Introducción.....	75
3.4.3.2.- Fundamento.....	76
3.4.3.3.- Materiales.....	76
3.4.3.4.- Conformación del sistema API 20 E.....	77
3.4.3.5.- Preparación de la galería.....	78
3.4.3.6.- Preparación de la suspensión bacteriana.....	79
3.4.3.7.- Inoculación de la galería.....	80
3.4.3.8.- Lectura de la galería.....	81
3.4.3.9.- Esterilización.....	82
3.4.4.- Métodos de observación macroscópica y microscópica.....	83
3.4.5.- Interpretación de los resultados.....	88
3.5.- Preparación del Inoculo.....	93
3.6.- Inoculación del medio.....	94
3.7.- Incubación del medio.....	95
3.8.- Interpretación de los resultados.....	96

IV.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS.....	99
4.1.- Tablas de datos y resultados.....	99
4.2.- Gráficos.....	123
4.3.- Análisis económico.....	156
4.4.- Análisis estadístico.....	161
4.5.- Resultados.....	163
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	179
ANEXOS.....	183
ANEXO A.....	184
BIBLIOGRAFIA.....	217

INDICE DE FIGURAS

Pag

Figura # 1.- Esquema de la sala de experimentación; distribución de las - unidades experimentales.....	46
Figura # 2.- Esquema de la sala de microbiología e histopatología	63
Figura # 3.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta C-1.....	125
Figura # 4.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta C-3.....	126
Figura # 5.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta C-4.....	127
Figura # 6.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T1-1.....	128
Figura # 7.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T1-2.....	129
Figura # 8.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T1-3.....	130
Figura # 9.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T1-4.....	131
Figura # 10.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T2-1.....	132
Figura # 11.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T2-2.....	133
Figura # 12.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T2-3.....	134
Figura # 13.- Curva de sobrevivencia semanal; Gaveta T2-4.....	135
Figura # 14.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta C-1.....	136
Figura # 15.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta C-3.....	137
Figura # 16.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta C-4.....	138
Figura # 17.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T1-1.....	139

Figura # 18.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T1-2.....	140
Figura # 19.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T1-3.....	141
Figura # 20.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T1-4.....	142
Figura # 21.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T2-1.....	143
Figura # 22.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T2-2.....	144
Figura # 23.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T2-3.....	145
Figura # 24.- Curva de crecimiento semanal; Gaveta T2-4.....	146
Figura # 25.- Tasas de sobrevivencia por tratamiento en la culminación del- ensayo.....	147
Figura # 26.- Resultados de pesos promedios por tratamiento en la culminación- del ensayo.....	148
Figura # 27.- Resultados de biomasa por tratamiento en la culminación del - ensayo.....	149
Figura # 28.- Tasas de Conversión alimenticia por tratamiento en la culminación - del ensayo.....	150
Figura # 29.- Composición de los ingredientes de la dieta experimental.....	151
Figura # 30.- Composición nutricional de la dieta experimental.....	152
Figura # 31.- Curva de temperatura diaria.....	153
Figura # 32.- Curva de salinidad diaria.....	154
Figura # 33.- Curva de pH diario.....	155

Figura # 34.- Costo de producción e investigación de un juvenil por - tratamiento.....	160
Figura # 35.- Representación esquemática del método de siembra bacteriana.....	215
Figura # 36.- Representación esquemática de la Tinción de Gram.....	216

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla # I.- Influencia del Flavofosfolipol y bacitracina sobre la síntesis de la pared celular.....	29
Tabla # II.- Espectro de acción antibacteriano del Flavofosfolipol en microorganismos gram-positivos.....	30
Tabla # III.- Espectro de acción antibacteriano del Flavofosfolipol en microorganismos gram-negativos.....	31
Tabla # IV.- Estabilidad de la sustancia pura.....	35
Tabla # V.- Estabilidad en las premezclas.....	36
Tabla # VI.- Estabilidad bajo condiciones difíciles de peletización.....	38
Tabla # VII.- Diseño experimental	48
Tabla # VIII.- Protocolo del experimento.....	55
Tabla # IX.- Parámetros diarios de temperatura, salinidad y pH de la toma de agua del sistema experimental ;(primera parte).....	57
Tabla # X.- Ejemplo de categorización numérica de los fragmentos de la cinta API20E.....	90
Tabla # XI.- Tabla clásica de las propiedades bioquímicas de las cepas de los Vibrios utilizadas en el estudio in Vitro.....	92
Tabla # XII.- Tabla de resultados .-Primer día del ensayo.- Siembra de los	

	juveniles.....	101
Tabla # XIII.-	Tabla de resultados.- Primera semana del ensayo.....	102
Tabla XIV.-	Tabla de resultados.- Segunda semana del ensayo.....	103
Tabla XV.-	Tabla de resultados.- Tercera semana del ensayo.....	104
Tabla XVI.-	Tabla de resultados.- Cuarta semana del ensayo.....	105
Tabla XVII.-	Tabla de resultados.- Quinta semana del ensayo.....	106
Tabla XVIII.-	Tabla de resultados .-Sexta semana del ensayo.- Semana final.....	107
Tabla XIX.-	Tabla de resultados de parámetros nutricionales.- Semana final- del ensayo.....	108
Tabla XX.-	Composición porcentual de los ingredientes utilizados en la - preparación de la dieta del ensayo.....	109
Tabla XXI.-	Composición nutricional de la dieta utilizada en el ensayo.....	110
Tabla XXII.-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio vulnificus</u> , frente - al Flavofosfolipol a 24 horas de incubación.....	111
Tabla XXIII.-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio vulnificus</u> , frente - al Flavofosfolipol a 48 horas de incubación.....	112
Tabla XXIV.-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio sp</u> frente al - Flavofosfolipol a 24 horas de incubación.....	113
Tabla XXV .-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio sp</u> frente al - Flavofosfolipol a 48 horas de incubación.....	114

Tabla XXVI.-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio alginolyticus</u> - frente al Flavofosfolipol a 24 horas de incubación.....	115
Tabla XXVII.-	Concentración mínima inhibitoria del <u>Vibrio alginolyticus</u> - frente al Flavofosfolipol a 48 horas de incubación.....	116
Tabla XXVIII.-	Concentración mínima inhibitoria de <u>Aeromona sp</u> frente al - Flavofosfolipol a 24 horas de incubación.....	117
Tabla XXIX.-	Concentración mínima inhibitoria de <u>Aeromona sp</u> frente al - Flavofosfolipol a 48 horas de incubación.....	118
Tabla XXX.-	Perfil bioquímico del tipo de colonias verdes luminiscentes- (TCBSA).....	119
Tabla XXXI.-	Perfil bioquímico del tipo de colonias verdes no luminiscentes- (TCBSA).....	120
Tabla XXXII.-	Perfil bioquímico del tipo de colonias amarillas cremosas- (TCBSA).....	121
Tabla XXXIII.-	Perfil bioquímico del tipo de colonias amarillas planas- (TCBSA).....	122
Tabla XXXIV.-	Costos de investigación y producción de un juvenil por - tratamiento. (Control: 0PPM).....	157
Tabla XXXV.-	Costos de investigación y producción de un juvenil por- tratamiento. (Tratamiento 1: 9,7PPM).....	158

Tabla XXXVI.- Costos de investigación y producción de un juvenil por - tratamiento. (Tratamiento 2 : 22PPM).....	159
Tabla XXXVII.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la primera semana del ensayo.....	185
Tabla XXXVIII.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la segunda semana del ensayo.....	186
Tabla XXXIX.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la tercera semana del ensayo.....	187
Tabla XL.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la cuarta semana del ensayo.....	188
Tabla XLI.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la quinta semana del ensayo.....	189
Tabla XLII.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del Peso- promedio en la semana final del ensayo.....	190
Tabla XLIII.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número de- organismos sobrevivientes en la primera semana del ensayo.....	191
Tabla XLIV.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número de- organismos sobrevivientes en la segunda semana del ensayo.....	192
Tabla XLV.- ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número-	

	de organismos sobrevivientes en la tercera semana del ensayo.....	193
Tabla XLVI.-	ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número - de organismos sobrevivientes en la cuarta semana del ensayo.....	194
Tabla XLVII.-	ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número - de organismos sobrevivientes en la quinta semana del ensayo.....	195
Tabla XLVIII.-	ANOVA y Tabla de rango múltiple .- Evaluación del número - de organismos sobrevivientes en la semana final del ensayo.....	196
Tabla XLIX.-	ANOVA y Tabla de rango múltiple.- Evaluación de la - conversión alimenticia en la semana final del ensayo.....	197
Tabla L.-	Tabla de medias para la sobrevivencia final.....	198
Tabla LI.-	Tabla de medias para la conversión alimenticia.....	198
Tabla LII.-	Tabla de medias para el Peso promedio inicial.....	199
Tabla LIII.-	Tabla de medias para el Peso promedio final.....	199
Tabla LIV.-	Tabla de medias para la biomasa inicial.....	200
Tabla LV.-	Tabla de medias para la biomasa final.....	200
Tabla LVI.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las unidades experimentales ,en la primera semana del ensayo a 24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	201
Tabla LVII.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las- unidades experimentales ,en la segunda semana del ensayo a -	

	24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	202
Tabla LVIII.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la tercera semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	203
Tabla LIX.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la cuarta semana del ensayo a - a 24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	204
Tabla LX.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la quinta semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	205
Tabla LXI.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la sexta semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar Tcbs.....	206
Tabla LXII.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la primera semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	207
Tabla LXIII.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la segunda semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	208
Tabla LXIV.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las -	

	unidades experimentales en la tercera semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	209
Tabla LXV.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la cuarta semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	210
Tabla LXVI.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la quinta semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	211
Tabla LXVII.-	Contaje de colonias bacterianas del agua procedente de las - unidades experimentales en la sexta semana del ensayo a - 24 y 48 horas de cultivo en agar marino.....	212
Tabla LXVIII.-	Tabla de alimentación de Juveniles de José Villalón.....	213

INDICE DE FOTOS

	.Pag
Foto # 1.- Vista del sistema experimental.....	165
Foto # 2.- Vista de los juveniles en las unidades experimentales.....	166
Foto # 3.- Pesaje de la dieta.....	167
Foto # 4.- Extracción de muestras bacteriológicas integradas.....	168
Foto # 5.- Prueba de Susceptibilidad - Agar - Dilución.....	169
Foto # 6.- Preparación de las diluciones.....	170
Foto # 7.- Preparación del medio con el Flavofosfolipol.....	171
Foto # 8.- Características de las colonias - Obtención de cepas.....	172
Foto # 9.- Sistema API 20E.....	173
Foto # 10.- Tinción de Gram	174
Foto # 11.- Preparación del inculo.....	175
Foto # 12.- Inoculación de la cepa del MIC.....	176
Foto # 13.- Incubación de los platos del MIC.....	177
Foto # 14.- Lectura de los platos del MIC.....	178

INTRODUCCION

Los rendimientos y las tasas de sobrevivencia en la actividad camaronera han decrecido drásticamente en los últimos años, tornándose en índices muy bajos en comparación con aquellos de años atrás, si a esta situación, le sumamos la subida abrupta de los precios en los insumos de producción, en los costos operacionales en general y los problemas de contaminación biológica y química reinantes en la actualidad, llegamos a la triste conclusión de que es difícil producir camarones bajo estas condiciones. Esto se demuestra ampliamente en las drásticas pérdidas de las empresas, que las han llevado a disminuir sus producciones y sus rangos de aceptación de rendimientos y en algunos casos a cerrar la actividad.

Además la aparición de nuevas enfermedades como: el Síndrome de Taura, las bacterias intracelulares y los problemas tóxicos de químicos disueltos en el agua, nos motiva a que se busquen nuevas metodologías de producción .

Por las razones expuestas, era necesario realizar esta investigación, cuyos objetivos tácitos fueran los de probar y reafirmar las bondades del Flavofosfolipol en la mejoría de las tasas de sobrevivencia, crecimiento, conversión alimenticia y sobretodo en el aspecto económico.

El Flavofosfolipol inhibe el crecimiento de bacterias negativas, actuando sobre la pared celular, en la biosíntesis de la Mureína, lo que produce una mayor eficiencia del metabolismo celular, traduciéndose en un gran ahorro energético y en una mayor absorción de los principios nutricionales. En el aspecto fisiológico se refleja esto netamente en un mejor crecimiento y sobrevivencia de los organismos .

Con todos los antecedentes expuestos, los objetivos de esta tesis se concretan en los siguientes:

- 1.- Determinar las bondades del Flavofosfolipol en la sobrevivencia, crecimiento y conversión alimenticia, cuando es suministrado a juveniles de Penaeus vannamei incorporado en una dieta con un porcentaje de proteína de 35 %, en las siguientes concentraciones : 0.0 ppm, 9.7 ppm y 22.0 ppm.
- 2.- Establecer el espectro de acción antibacteriano del Flavofosfolipol frente a : Vibrio vulnificus, Vibrio sp., Vibrio alginolyticus y Aeromona sp.

CAPITULO I

I.- CARACTERISTICAS DEL FLAVOFOSFOLIPOL.

I.1.- DESCRIPCION DEL PRODUCTO.

El Flavofosfolipol es un estimulante del crecimiento, cuyo nombre comercial es Flavomycin. Solo se utiliza como estimulante del rendimiento y no como sustancia terapéutica, porque tras su administración oral no se absorbe tisularmente hablando.

Para Flavomycin en distintos países, se utilizan distintas denominaciones:

Flavofosfolipol: Nombre común de la Organización Mundial de la Salud , así como la denominación establecida en el apéndice de las normas para aditivos de la comunidad Europea.

Bambermycins: Nombre común utilizado en los Estados Unidos de Norteamérica, refiriéndose a la cepa que lo produce; Streptomyces bamberguensis.

Bambermycin: Nombre común utilizado en la Gran Bretaña.

Flavocorm: Nombre común utilizado en Japón.

Moenomycin: Nombre científico que se refiere al lugar en donde se encontró una cepa utilizada en su producción: junto a las praderas del río Main, en Bamberg.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.1.1.- ORIGEN.

Flavomycin es un antibiótico fosfoglicolípido, que se forma a partir de un grupo de Estreptomicetos de color Gris verdoso:

-Streptomyces bamberguensis.

-Streptomyces ghanaensis.

-Streptomyces geysiriensis.

-Streptomyces ederensis.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.1.2.- PROPIEDADES FISICO QUIMICAS Y FORMULA ESTRUCTURAL

El Flavofosfolipol que es un ácido débil, con un contenido en fósforo de 1.96% en peso, produce sales amorfas e incoloras. Estas son solubles en agua y en alcoholes de bajo peso molecular, siendo por el contrario insolubles en otros disolventes.

El Flavofosfolipol consta de un complejo de cuatro componentes microbiológicamente activos, en una composición constante, muy parecidas químicamente y de actividad antimicrobiana comparable.

Su fórmula es : C₆₉ H₁₀₇ N₄ O₃₅ P, y su peso molecular es : 1582 g/mol.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

I.1.3.- MECANISMOS DE ACCION Y ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Incluso en su dosificación como sustancia nutritiva, el Flavofosfolipol posee una acción antibacteriana muy buena sobre numerosos gérmenes gram-positivos que se presentan comúnmente en el tracto digestivo. Flavomycin inhibe su multiplicación actuando sobre la biosíntesis de la mureína, sustancia que forma la estructura de la membrana celular. Las lesiones de la capa de mureína provocan la muerte celular.

La estructura de la mureína es la de una red tridimensional, a la que se unen moléculas de azúcares a través de puentes proteicos. Para la biosíntesis de la mureína son necesarias toda una serie de enzimas.

Una de ellas es la transglicosilasa, la cual reúne los elementos básicos integrales de las cadenas de azúcares, que posteriormente deben unirse unos con otros. El Flavofosfolipol inhibe este importante paso en la biosíntesis de la mureína.

Si se compara la estructura de los elementos básicos de la membrana celular con la del Flavofosfolipol, se observa que existe una analogía asombrosa. Se conoce que la transglicosilasa no puede distinguir ambas moléculas y utilizan también Flavofosfolipol para la formación de cadenas. De esta forma se interrumpe la síntesis de mureína .

Al Flavofosfolipol se lo considera como una de las sustancias inhibitorias más activas de dicha biosíntesis y por lo tanto es eficaz en dosis comparativamente muy pequeñas. Este hecho se pone en evidencia en una comparación con la bacitracina, que también se considera un antibiótico que actúa sobre la membrana celular, tal como se expone en la tabla # 1.

TABLA I

**INFLUENCIA DEL FLAVOFOSFOLIPOL Y BACITRACINA SOBRE LA
SINTESIS DE LA PARED CELULAR.**

PROMOTOR	MATERIA ACTIVA(ug/ml)	INHIBICION (%)
BACITRACINA	100	20
BACITRACINA	10	0
FLAVOFOSFOLIPOL	1	100
FLAVOFOSFOLIPOL	0.1	100
FLAVOFOSFOLIPOL	0.01	39

Un antibiótico con este modo de acción es ideal como aditivo del pienso, porque las células animales no tienen ninguna estructura similar que pueda representar un punto de fijación del mismo. De ahí la extraordinaria efectividad y tolerancia del Flavofosfolipol.

Espectro de acción antibacteriana.- El Flavofosfolipol actúa principalmente frente a bacterias gram-positivas, tal como lo sustentamos en la tabla # 2. Algunos gérmenes gram-negativos como Pasteurelas y Brucelas, se han mostrado también sensibles al Flavofosfolipol, tal como se lo expone en la tabla # 3.

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), nos ofrece una visión general del espectro y de la intensidad de acción del Flavofosfolipol.

TABLA II

**ESPECTRO DE ACCION ANTIBACTERIANO DEL FLAVOFOSFOLIPOL EN
MICROORGANISMOS GRAM-POSITIVOS.**

ESPECIE	CONCENTRACION(mcg)
<i>Staphylococcus aureus smith</i>	0.03
<i>Streptococcus sp</i>	0.001
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.03
<i>Streptococcus aronson</i>	0.001
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.125
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.3
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	2.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.04
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	0.001
<i>Bacillus anthracis</i>	0.001
<i>Bacillus cereus</i>	0.07
<i>Bacillus subtilis</i>	0.6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	128
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	128

TABLA III
ESPECTRO DE ACCION ANTIBACTERIANO DEL FLAVOFOSFOLIPOL EN
MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS.

ESPECIE	CONCENTRACION (mcg)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.5
<i>Alcaligenes faecalis</i>	39.1
<i>Brucella abortus</i>	1.2
<i>Brucella melitensis</i>	2.5
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	16
<i>Escherichia coli</i>	128
<i>Escherichia coli</i> TEM	128
<i>Salmonella pullorum</i>	7.8
<i>Salmonella enteritidis</i>	78.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	128
<i>Shigella flexneri</i>	31.5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	128
<i>Klebsiella cloacae</i>	128
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	5
<i>Proteus mirabilis</i>	128
<i>Proteus vulgaris</i>	31.5
<i>Pasteurella multocida</i>	0.125
<i>Neiseria meningitidis</i>	2.4
<i>Moxarella bovis</i>	0.125

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.1.4.- PREMEZCLAS DEL FLAVOFOSFOLIPOL Y MISCIBILIDAD.

Premezclas:

Flavomycin se presenta en premezclas del producto de fermentación seco y del excipiente en dos concentraciones:

Flavomycin 40 con un contenido de 40g de Flavomycin por kilo.

Flavomycin 80 con un contenido de 80 g del Flavomycin por kilo.

En ambas premezclas el excipiente es el carbonato de calcio de calidad uniforme, con bajo contenido de humedad. En estas premezclas se garantiza la distribución homogénea del Flavomycin y no hay peligro de que puedan separarse sus componentes.

Ambas premezclas son productos que pueden trasvasarse fácilmente, con poca producción de polvo, de color marrón grisáceo, y con el olor característico de los hongos.

Miscibilidad:

La distribución homogénea del Flavomycin en la premezcla viene garantizada también por el hecho de que, tanto el polvo seco del

producto de fermentación, como el carbonato de calcio, que se utiliza como excipiente, son partículas del mismo tamaño.

Flavomycin no se utiliza como sustancia pura, sino que se emplea únicamente como premezcla homogénea. Así por ejemplo para obtener una premezcla de 5 ppm, no se añaden 5 gramos de Flavomycin puro por 1 tonelada de pienso, sino que se añaden 125 gramos de Flavomycin 40 o 62.5 gramos de Flavomycin 80.

El tamaño medio de las partículas en ambas premezclas es de 0.2mm, con una densidad media de 0.7 grs/cc.

Una muestra de 100 gramos contiene aproximadamente:

5500 partículas de Flavomycin 40, con un coeficiente de variación de 1.3% o bien unas 3000 partículas de Flavomycin 80 con un coeficiente de variación de 1.8%.

Esta distribución óptima del Flavomycin en el pienso garantiza:

- Una ingestión continua.
- Seguridad en los resultados de los análisis.

La estructura media del tamaño de las partículas de ambas premezclas de Flavomycin permite una elaboración de pienso sin

producción de polvo. No cabe esperar que se produzcan problemas debido a la aparición de electricidad estática, ni pérdidas de sustancia en el proceso de mezcla por esta causa.

Para garantizar la calidad del producto, se efectúan continuamente análisis de criba, ensayos de mezcla y pruebas de ensayo de separación de los componentes. En la práctica las premezclas de Flavomycin se utilizan sin problemas.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.1.5.- ESTABILIDAD.

Flavomycin es extraordinariamente estable como sustancia pura, en las premezclas y en los diversos tipos de pienso compuesto, tal como lo exponemos en la tabla # 4.

TABLA IV**ESTABILIDAD DE LA SUSTANCIA PURA**

FLAVOMYCIN	DURACION DEL ALMACENAMIENTO	TEMPERATURA(°C)	FLAVOMYCIN(EN % DEL CONTENIDO INICIAL)
COMO SUSTANCIA	24 MESES	4	100
COMO SUSTANCIA	24 MESES	20	100
EN SOLUCIÓN ACUOSA	24 MESES	4	100
EN SOLUCIÓN ACUOSA	24 MESES	20	94

Tal como se desprende en la tabla # 4, los resultados muestran que incluso en solución no se produce ninguna pérdida de actividad de Flavomycin, ni siquiera cuando se guardan las muestras durante dos años a temperatura ambiente.

También se comprobó la estabilidad de almacenamiento del Flavomycin, en las premezclas preparadas para la venta durante varios años tal como lo demostramos en la tabla # 5.

TABLA V

ESTABILIDAD EN LAS PREMEZCLAS

DURACIÓN DEL ALMACENAMIENTO	TEMPERATURA(°C)	FLAVOMYCIN(EN % DEL CONTENIDO INICIAL)
2.5 AÑOS	4	100
2.5 AÑOS	20	92
2.5 AÑOS	37	93
6 MESES	50	93
24 HORAS	80	90
48 HORAS	80	80
24 HORAS	100	80

Incluso en temperaturas muy elevadas de 80 y 100 °C, durante 24 y 48 horas, solo provocan mínimas pérdidas.

En los ensayos de peletización de pienso se examinó la capacidad de resistencia del Flavofosfolipol bajo condiciones de temperaturas extremas, tal como lo demuestra la tabla # 6. La peletización se efectuó de forma discontinua, empleándose vapor. La confección durante el largo periodo de tiempo de 30 minutos, representaba una

prolongada sobrecarga de temperatura que no es normal en la práctica.

TABLA VI

ESTABILIDAD BAJO CONDICIONES DIFÍCILES DE PELETIZACIÓN

CONDICION	TEMPERATURA DE LA MUESTRA(°C)	HUMEDAD DE LA MUESTRA(%)	FLAVOMYCIN(EN % DEL CONTENIDO INICIAL)
ANTES DE LA ELABORACION	21	11.0	100
DESPUES DE LA ELABORACION	70	13.7	111
POSTERIOR AL PRENSADO	84	13.5	107
POSTERIOR AL ENFRIAMIENTO	28	12.1	95

Durante el proceso de elaboración de los pelets, el pienso compuesto está sometido a temperaturas variables, a veces muy elevadas. Los resultados se encuentran dentro del margen de tolerancia autorizado para el pienso, principalmente de crustáceos. Después de elaborado el pienso, para compensar la mínima pérdida del producto por efecto de la temperatura, se le provee de un baño y homogenizado final.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.2.- RESISTENCIA BACTERIANA.

Al emplear los antibióticos en nutrición animal debe tenerse en cuenta que en los animales es extraordinariamente elevado el porcentaje de bacterias resistentes a la penicilina, estreptomicina, tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol. En estos casos se trata sobretodo de resistencias extracromosómicas, denominadas también resistencias episomales, infecciosas o transmisibles. Además una gran cantidad de cepas bacterianas han desarrollado una resistencia múltiple frente a estos antibióticos.

Las formas de resistencia de origen cromosómico tienen poca importancia, porque se propagan con menor rapidez.

El desarrollo de resistencias se produce tanto en bacterias gramnegativas como en la grampositivas. El Flavofosfolipol actúa preferentemente frente a los gérmenes grampositivos, mientras que los gramnegativos poseen una resistencia natural frente a estas sustancias, debido a la estructura de su membrana celular. Sin embargo su sensibilidad frente al Flavofosfolipol aumenta cuando son portadores de una resistencia extracromosómica.

En la práctica todavía no se ha podido observar ningún caso de formación de resistencia frente al Flavofosfolipol. Incluso en gérmenes

multirresistentes, no pudo comprobarse en ningún caso la existencia de una resistencia cruzada con Flavomycin.

Existe en la categoría de las bacterias una forma específica de Resistencia llamada extracromosómica.

La resistencia antibiótica extracromosómica es causada por plásmidos portadores del factor de resistencia.

En ensayos efectuados in Vitro se comprobó que las bacterias gramnegativas que originariamente eran resistentes de forma natural al Flavofosfolipol, se volvieron sensibles a esta sustancia por haber adquirido factores R. Su sensibilidad se incrementa tanto por la presencia de factores R, hasta el punto que el Flavofosfolipol, incluso en las concentraciones empleadas en nutrición puede inhibir la multiplicación de los gérmenes. La transferencia de la resistencia extracromosómica se produce en las bacterias mediante contacto e intercambio de plásmidos R a través del llamado pelo sexual .

Los plásmidos que pueden ser portadores de propiedades de resistencia y patogenicidad, se encuentran libres en el citoplasma de la célula bacteriana y se multiplican en poco tiempo, independiente del cromosoma. El pelo sexual es una formación tubular con una estructura morfológica parecida a la de la membrana de la célula bacteriana. El intercambio de plásmidos R

no solo se produce entre gérmenes de la misma especie, sino también entre todas las Enterobacterias.

A través de su acción sobre la membrana celular, el Flavofosfolipol impide la formación del pelo sexual, evitando así la infección de la bacteria sensible. Las informaciones patogénicas y de resistencias acumuladas en los plásmidos se pierden. Esta extraordinaria propiedad del Flavofosfolipol de inhibir la propagación de resistencias extracromosómicas, pudo ser confirmada también en varios ensayos in Vivo.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

1.3.- COMPORTAMIENTO EN EL AMBIENTE.

El Flavofosfolipol se excreta completamente a través de los excrementos como molécula intacta, microbiológicamente activa. Mientras que la vida media en los excrementos es de 21 días, en las mezclas de excrementos con la tierra del suelo queda totalmente inactivo en el mismo período de tiempo.

La rápida degradación del Flavofosfolipol en el suelo es debida a la microflora que allí existe.

Las plantas no absorben Flavomycin por lo que su crecimiento no resulta perjudicado ni siquiera por altas concentraciones del producto.

(Referencia tomada del manual internacional de la Hoechst, 1994).

CAPITULO II

II.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO.

2.1.- DESCRIPCION DE LAS INSTALACIONES.

Los ensayos de esta tesis fueron realizados en el laboratorio de producción de larvas de camarón CRIDEC, mismo que pertenece al grupo Empresarial de la Empacadora Nacional y está situado geográficamente en la zona de Punta Blanca, Cantón de Montecristi; a poca distancia de la ciudad de Manta, en la Provincia de Manabí.

El ensayo se lo realizó en una sala, en donde años atrás funcionó la estación de maduración, misma que fue acondicionada previo a una exhaustiva desinfección.

La desinfección inicial la realizamos con una solución de cloro a una concentración de 1000 ppm, misma que fue dispersada por toda la sala, utilizando una bomba de fumigación de mochila.

La sala de experimentación poseía una línea de agua de mar directa, proveniente de la bomba de succión principal, mientras que la línea de aireación provenía de

un compresor de la sala de algas. También contamos con la facilidad de una línea de agua dulce que procedía del exterior de la sala de ensayos.

2.2.- SISTEMA DEL ENSAYO.

2.2.1.- MATERIALES Y EQUIPOS.

Para la realización de este ensayo utilizamos 12 gavetas de plástico, color celeste, (que posteriormente se convirtieron en 11 por fallas mecánicas de aireación), de fabricación Pyca, modelo robusta cerrada, con una capacidad total de 45 litros. La parte superior de las gavetas fue cubierta con un plástico transparente, para evitar el escape de los organismos.

Las gavetas fueron colocadas en un medio de soporte, que es una estructura rectangular, de madera, de 15 metros de largo y de 0.5 metros de altura sobre el nivel del piso. Esta estructura facilitó en gran parte los recambios de agua, ya que se los realizaba por sifoneo (Foto # 1).

Para el almacenamiento del agua contamos con un reservorio de plástico, de 2 toneladas de capacidad, de color negro, que fue ubicado

sobre unos soportes de material de eternit; de esta manera el nivel del reservorio estuvo a 2 metros por encima del nivel de las gavetas.

El agua llegaba a cada una de las gavetas fácilmente por medio de gravedad, para esto utilizamos una manguera de plástico transparente, de 4 centímetros de diámetro, la que estuvo sumergida en una de sus puntas, dentro del reservorio, mientras que la otra punta permanecía elevada sobre el nivel del reservorio, cuando no se realizaban las renovaciones de agua.

La renovación de agua en cada una de las gavetas se realizaba por medio de una manguera de plástico, de 1.5 centímetros de diámetro, transparente, utilizando el principio del sifón.

La aireación de las gavetas se la realizó por medio de 1 piedra difusora, de tamaño mediano, que estaban conectadas directamente por medio de líneas a la tubería madre, asegurándonos niveles de oxígeno constantes.

El sistema de gavetas estuvo cubierta con un plástico largo de color negro, y se lo colocaba al terminar la jornada de trabajo.

Planificamos la colocación del plástico para proporcionar un sistema de fotoperíodo de 9 horas de luz y 15 horas de oscuridad.

Las horas luz fueron desde las 7H00 hasta las 16H00. La esquematización de la sala de ensayos la presentamos en la figura # 1.

ESQUEMA DE LA SALA DE EXPERIMENTACION

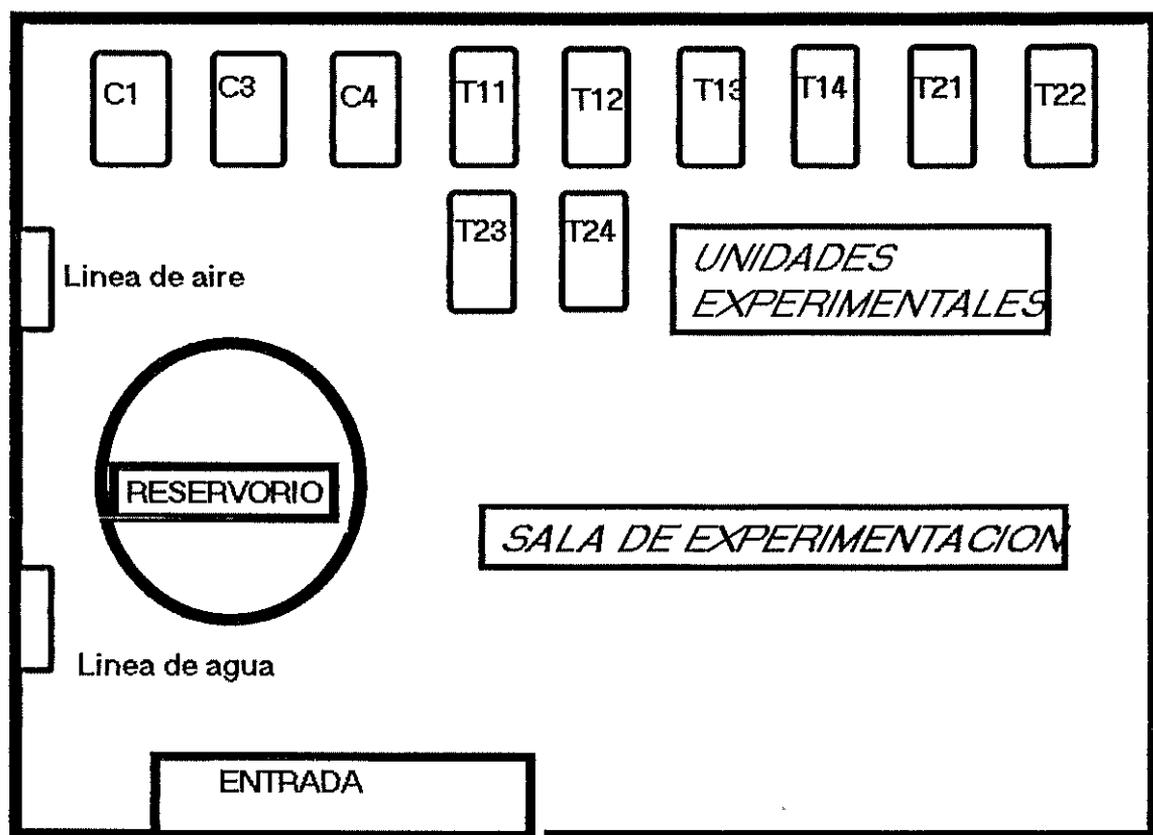
DISTRIBUCION DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

FIGURA # 1

2.2.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Nuestro diseño experimental fue propuesto con dos tratamientos, (T1 y T2) y un control, (C); con 4 réplicas para el tratamiento y el control , tal como lo demuestra la tabla # 7.

Los tratamientos estuvieron basados en la concentración del Flavomycin en el alimento, mientras que en el control el Flavomycin estaba ausente.

El tratamiento 1 tenía una concentración de 9.7 ppm y el tratamiento 2 una concentración de 22 ppm.

En el transcurso del ensayo nos vimos obligados a variar nuestro diseño experimental, lo cual es permisible estadísticamente hablando (Alfonso Castro Valarezo, 1989); por falla de obstrucción en la línea de aire, (tal como explicamos anteriormente) en la gaveta C-2, por lo que obviamente solo consideramos 3 réplicas para el control. Los tratamientos permanecieron con 4 replicas, tal como lo mostramos en la tabla # 8.

Todas las gavetas estuvieron ubicadas en una misma sala, ensayadas de manera simultánea y los organismos experimentales procedieron de un mismo Stock.

TABLA VII
DISEÑO EXPERIMENTAL

TRATAMIENTO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3	REPLICA 4
CONTROL (0PPM)	C 1	X	C 3	C 4
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	T1 1	T1 2	T1 3	T1 4
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	T2 1	T2 2	T2 3	T2 4

X: Equivale a ausente.

2.2.3.- DESCRIPCION DEL ENSAYO.

El ensayo de la fase fisiológica tuvo una duración de 46 días, incluyendo los 4 días de aclimatación, desde el 26 de Febrero al 12 de Abril de 1994.

Receptamos 1000 organismos, todos provenientes de un mismo stock.

Estos organismos antes de aceptarlos estuvieron en un tanque de cemento de 5 toneladas, mismo que estuvo situado en la parte externa de un laboratorio de larvas de camarón (LARDECAN), ubicado muy próximo a CRIDEC.

Antes de la recepción de los especímenes en nuestras instalaciones, se les practicó una revisión microscópica exhaustiva, en montaje húmedo, principalmente de Baculovirus penaei, hongos y protozoarios que atacan comúnmente a los camarones en este estadio.

Al realizar la comprobación microscópica, concluimos que los organismos estaban aptos para empezar el ensayo, sin ningún tipo de problemas que pueda afectar el éxito del mismo o de la producción del laboratorio CRIDEC.

Los colocamos dentro de un tanque de 2 toneladas,(lleno hasta 1.8 tn) de color negro, similar al que utilizamos como reservorio, con agua de mar desinfectada por clorinación, y los mantuvimos por un tiempo de 4 días en un proceso de aclimatación y observación (cuarentena), alimentándose con una dieta con 35 % de proteína y con una renovación de agua diaria del 50 %. La composición porcentual de los ingredientes de la dieta ensayada la presentamos en la tabla # 23 y en la figura # 29, así como también la composición nutricional de la dieta la presentamos en la tabla # 24 y en la figura # 30.

Posteriormente procedimos a cosechar los juveniles, para esto disminuimos el nivel del agua hasta quedar en un 15% de nivel operativo, y con la ayuda de un marco de cosecha de larvas de camarón se los capturó.

Luego de cosechados los organismos fueron distribuidos en dos gavetas, modelos Pyca, robusta cerrada, color rojo, de 45 litros de capacidad total, llenas hasta 40 litros de volumen operativo, en donde se los homogeneizó por agitación mecánica con la mano, para ser sembrados aleatoriamente en las gavetas, en una cantidad de 50 organismos por gaveta; las gavetas experimentales fueron llenadas también hasta un

nivel de 40 litros de capacidad, siendo este el volumen operativo. Así de esta manera obtuvimos una densidad de siembra 1.25 juveniles/litro(Foto # 2).

El proceso de homogeneización se repetía previo a cada siembra. Justo en el momento en que a los especímenes iban a ser sembrados, se los pesaba rápidamente a fin de no causar stress considerable, con la ayuda de una balanza electrónica digital de marca Ohaus GT210, para de esta manera obtener la información del peso promedio, el mismo que fue de 0.729 gramos y de la biomasa total promedio siendo esta de 36.491gramos. Los juveniles no utilizados fueron devueltos al mar.

El tipo de agua que se utilizó en el ensayo fue agua de mar, decantada y filtrada por medio de un bolso 2 micras.

A las gavetas correspondientes al control las denominamos: C-1, C-3, C-4, a las pertenecientes al tratamiento 1 :T1-1, T1-2, T1-3, T1-4 y a las del tratamiento 2 :T2-1, T2-2 , T2-3, T2-4.

La renovación de agua que realizamos fue diaria, en los cuatro días iniciales de aclimatación fue del 50 %, en la primera semana de inicio

del ensayo fue del orden del 60 %, para finalmente renovar el 70 % hasta la culminación del mismo.

La alimentación de los organismos la calculamos en base al dato de la biomasa total semanal, para esto utilizamos la tabla de alimentación diseñada para juveniles, por José Villalón, presentadas en las tablas # 71 y # 72 , correspondientes a los anexos A; y se la realizó en dos frecuencias, la primera a las 08H00, luego del recambio de agua, y la segunda a la 16H00. La relación de la frecuencia de alimentación que utilizamos en cuanto al horario fue del 40% en la mañana y del 60% en la tarde (Foto # 3).

Alimentamos 6 días en la semana, el día que no lo hicimos correspondía a la obtención de parámetros de crecimiento y sobrevivencia; pero si renovamos agua.

Realizamos un proceso de desinfección con cloro en el suelo, a una concentración de 700 ppm, con argentyne en concentración de 40 ppm y alcohol para los materiales de trabajo, según como lo explicamos en el protocolo del experimento; en los cuatro días iniciales de aclimatación

se desinfectó consecutivamente, para posteriormente hacerlo pasando un día.

El protocolo del experimento constituye un resumen de la metodología aplicada y lo demostramos en las tablas # 9 y # 10.

2.2.4.- MEDICION DE PARAMETROS.

Semanalmente recopilamos la información de crecimiento y sobrevivencia; para lograr esto, teníamos que bajar el nivel de las gavetas hasta un 30% del nivel operativo y cosechar a los organismos lo más rápido posible, con la ayuda de un marco cosechador de larvas de camarón, para evitar stress; e inmediatamente los pesábamos con la misma balanza Ohaus GT210, antes de ser devueltos a las gavetas se los contaba, formando una cama de agua con el marco cosechador.

Se tomó lectura diaria en la toma de agua de: temperatura, salinidad y pH, con un termómetro común de mercurio, un refractómetro acuafauna y un peachímetro de bolsillo, tal como lo demostramos en las tablas # 11 y # 12. Las fluctuaciones diarias de la temperatura, salinidad y pH en

todo el ensayo correspondiente a la fase fisiológica, las presentamos en las figuras # 32, # 33 , y # 34 respectivamente.

Los seguimientos microbiológicos del control como de los tratamientos fueron realizados semanalmente, durante el transcurso del ensayo; para este propósito tuvimos que realizar el conteo de las UFC/ML en dos tipos diferentes de agares: TCBS y Marino, a 24 y 48 horas de incubación a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Sembramos 3 platos por cada tipo de agar, que correspondían a tres réplicas, para cada una de las concentraciones, incluyendo los controles.

La metodología de extracción de muestras obedeció a la forma de muestras integradas (Manual de la BBL. 1971); para lo cual utilizamos 11 vasos de vidrios de 30 ml, con tapa, completamente estériles, mismos que sumergíamos después de haber agitado completamente la columna de agua y así extraíamos 10 ml de agua de cada una de las gavetas, para posteriormente integrarlos para cada concentración y obtener la muestra, la misma que fue inoculada en los agares (Foto # 4).Los resultados de este seguimiento microbiológico lo presentamos en las tablas # 59,# 60,# 61, # 62, # 63, # 64, # 65, # 66, # 67, # 68, # 69, y # 70, correspondientes a los Anexos A.

TABLA VIII
PROTOCOLO DEL EXPERIMENTO

DIA	VOLUMEN Litros	%RECAM- BIO	EDTA GRS/M3	CIORO- DESINFEC- CION	ARGEN- TYNE + ALCOHOL	ALIMEN- TACION	MUESTREO POBLACIO- NAL
1	1800	50	-	+	+	+	-
2	1800	50	-	+	+	+	-
3	1800	50	-	+	+	+	-
4	1800	50	-	+	+	+	+
5*	40	60	10	+	+	+	-
6	40	60	-	-	-	+	-
7	40	60	-	+	+	+	-
8	40	60	-	-	-	+	-
9	40	60	10	+	+	+	-
10	40	60	-	-	-	+	-
11	40	60	-	+	+	-	+
12	40	70	-	-	-	+	-
13	40	70	10	+	+	+	-
14	40	70	-	-	-	+	-
15	40	70	-	+	+	+	-
16	40	70	-	-	-	+	-
17	40	70	10	+	+	+	-
18	40	70	-	-	-	-	+
19	40	70	-	+	+	+	-
20	40	70	-	-	-	+	-
21	40	70	10	+	+	+	-
22	40	70	-	-	-	+	-
23	40	70	-	+	+	+	-

*Denota el día inicial de la Evaluación después del proceso de aclimatación.

DIA	VOLUMEN Litros	%RECAM- BIO	EDTA GRS/M3	CIORO- DESINFEC- CION	ARGEN- TYNE + ALCOHOL	ALIMEN- TACION	MUESTREO POBLACIO- NAL
24	40	70	-	-	-	+	-
25	40	70	10	+	+	-	+
26	40	70	-	-	-	+	-
27	40	70	-	+	+	+	-
28	40	70	-	-	-	+	-
29	40	70	10	+	+	+	-
30	40	70	-	-	-	+	-
31	40	70	-	+	+	+	-
32	40	70	-	-	-	-	+
33	40	70	10	+	+	+	-
34	40	70	-	-	-	+	-
35	40	70	-	+	+	+	-
36	40	70	-	-	-	+	-
37	40	70	10	+	+	+	-
38	40	70	-	-	-	+	-
39	40	70	-	+	+	-	+
40	40	70	-	-	-	+	-
41	40	70	10	+	+	+	-
42	40	70	-	-	-	+	-
43	40	70	-	+	+	+	-
44	40	70	-	-	-	+	-
45	40	70	10	+	+	+	-
46	40	70	-	-	-	-	+

TABLA IX
PARAMETROS DIARIOS DE TEMPERATURA ,SALINIDAD y pH DE LA
TOMA DE AGUA DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.

DIA	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (PPT)	pH
1	26	33	8.3
2	26.5	34	7.9
3	25	34	8.0
4	26	34	7.5
5	26	34	7.8
6	26	34	7.7
7	26.5	33	7.0
8	26.5	34	8.3
9	26	34	7.9
10	26	34	8.2
11	25	35	8.0
12	25	34	7.8
13	25	34	8.4
14	26	34	8.3
15	25	34	7.9
16	26	34	7.4
17	26	34	7.3
18	26	34	7.4
19	24	34	8.8
20	25	34	7.0
21	25	34	7.5
22	26	34	8.1
23	26	34	8.5
24	26	30	7.1

DIA	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (PPT)	pH
25	26.5	34	7.6
26	27	34	8.1
27	26.5	34	8.0
28	26	33	7.9
29	24	34	7.4
30	27	33	7.3
31	27	34	8.2
32	26	32	8.5
33	24	33	8.7
34	25	34	7.3
35	25.5	34	8.2
36	26	35	6.5
37	26.5	35	8.4
38	26.5	35	7.8
39	26	35	7.5
40	26	35	7.9
41	25	35	8.0
42	25.5	34	8.0
43	25.5	35	7.7
44	26	35	8.3
45	25	35	8.2
46	25	35	8.4

CAPITULO III

III.-PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE Vibrio spp FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL.

3.1.- DESCRIPCION DEL ESTUDIO MICROBIOLOGICO.

3.1.1.- INTRODUCCION.

Para poder explicar científicamente el efecto del Flavofosfolipol en el crecimiento y sobrevivencia de los camarones Penaeidos, debemos entender primeramente su poder microbiológico, la forma como actúa eliminando a cierto tipo de bacterias patogénicas que interfieren en la celeridad y el éxito de los procesos metabólicos.

Por esta razón resultaba imprescindible la realización de estudios in Vitro, con especies de bacterias marinas, que causan problemas patológicos importantes en los cultivos de los camarones Penaeidos.

En este capítulo desarrollaremos netamente la fase microbiológica.

3.1.2.- DESCRIPCION DE LAS PRUEBAS.

La fase microbiológica se la desarrolló desde el 26 de Febrero hasta el 26 de Septiembre de 1994 en el departamento de patología, ubicado en el edificio principal, planta alta, del laboratorio CRIDEC.

Para la realización de estos estudios contamos con una excelente instalación microbiológica e histopatológica, completa, dotada de una amplia gama de equipos y materiales. La esquematización de esta sala corresponde a la figura # 2.

El tipo de prueba que seleccionamos para el estudio in Vitro fue el Método de Susceptibilidad Agar Dilución (Foto # 5), por las siguientes consideraciones importantes (Jones ,R.N.1983).

-Es una prueba aceptada por la FDA.

-De lectura y aplicación directa.

-Práctico y económico .

-El 50% de los laboratorios pertenecientes al Colegio de Patólogos Norteamericanos lo utilizan.

-Replicable y semiautomatizado.

La definición del test corresponde a la de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC):

La concentración de un agente antimicrobiano, que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano, en un período de cultivo de 48 horas (D.V.Lightner 1992).

La prueba ofrece algunas ventajas, así como pequeñas desventajas (D.V Lightner and L.L Mohny, 1992):

Ventajas: Es flexible en términos de concentración y del medio utilizado, prueba actualizada y manejable que puede monitorear el deterioro microbiológico, en un período de tiempo, además puede evaluar un número considerable de microorganismos en un mismo lapso de tiempo.

Desventajas: Requiere una apreciable cantidad de tiempo y el rango de la concentración puede variar con el tipo de droga, microorganismo, pH y salinidad.

Anteriormente mencionamos la realización de contajes bacterianos en la fase de crecimiento y sobrevivencia. Necesitábamos conocer la cantidad de bacterias marinas, la clase y cantidad de Vibrios de real importancia, que estuvieran presentes en el agua utilizada en el ensayo.

Para contestar estas interrogantes, una vez a la semana realizamos siembras por triplicado, de los tratatamientos y de los controles, en Agar TCBS y Agar Marino. Las lecturas se realizaban a 24 y 48 horas de incubación a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Efectuamos 4 pruebas de MIC, para las cuatro cepas de bacterias.

Probamos para cada cepa 17 concentraciones del Flavofosfolipol: 100 - 50 - 20 - 10 - 9.009 - 8 - 7.002 - 6.002 - 5 - 4 - 3.003 - 2 - 1 - 0.5 - 0.2 - 0.1 - 0.05 (ppm).

La cantidad de réplicas para cada concentración fue de 4, es decir que se inocularon un total de 72 cajas petri, incluyendo las controles.

El tipo de medio utilizado fue el Agar Mueller Hinton al 2.5% de NaCl, marca Difco.

La descripción detallada del proceso completo del MIC corresponde al desarrollo de este capítulo.

ESQUEMA DE LA SALA DE MICROBIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA

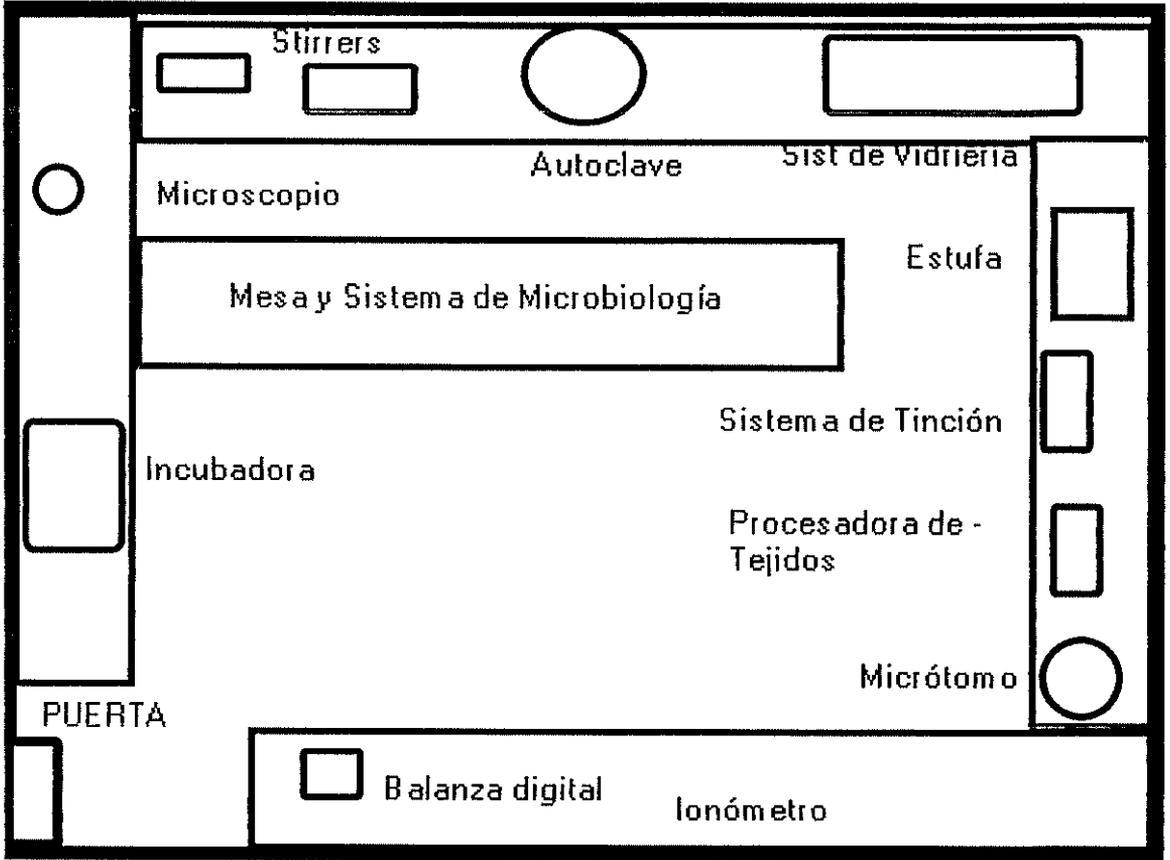


FIGURA # 2

3.2.- CONCENTRACION DEL AGENTE ANTIMICROBIANO Y PREPARACION DE LAS DILUCIONES.

Una concentración tope del agente antimicrobiano de 128 ug/ml es aceptable para la mayoría de las especies bacterianas, especialmente para las Enterobacterias (Villanova,P.A, 1983). Sin embargo existen excepciones a esta condición, como es el caso de cierto tipo de drogas como las carbencillinas y ciertas cefalosporinas, que necesitan ser probadas en una concentración tope de 256 ug/ml (Villanova ,P.A, 1983).

Como conclusión decimos que la concentración tope depende principalmente del tipo de droga y de la cepa de bacteria a evaluar. La concentración tope utilizada en este estudio fue de 100 ug/ml.

En la preparación de las diluciones utilizamos como solvente agua destilada, desmineralizada y esterilizada. El Flavofosfolipol se disuelve muy bien en agua destilada en concentraciones de 1000-10000 ug/ml (D.V Lightner and L.L Mohny,1992).

En las diluciones se llegaba a la concentración final, utilizando una relación de dilución de 1:10 con el Agar (Foto # 6).

3.3.- SELECCION Y PREPARACION DEL MEDIO.

3.3.1.- CONSIDERACIONES GENERALES.

Para la preparación de los medios de cultivo fue necesario tomar en cuenta ciertas consideraciones muy importantes, como el hecho de evitar el sobrecalentamiento en un solo lugar del recipiente en el que se está preparando el medio, así como también evitar la formación de grumos, la mezcla debe ser homogénea; para evitar esto, un procedimiento en la preparación de medios es añadir a la cantidad de polvo del medio la mitad del volumen de agua, agitar constantemente y luego añadir la otra mitad del volumen restante.

No se debe exceder la cantidad de tiempo y presión recomendada en la preparación del medio, de similar manera al terminar el proceso de autoclavado se debe extraer inmediatamente el medio estéril, ya que la alta temperatura conservada por el autoclave puede producir sedimentación.

3.3.2.- COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Agua.- Permite que se efectúen reacciones químicas, dando lugar a que los procesos celulares osmóticos se realicen rápidamente.

Peptonas.- Son fuentes de nitrógeno rápidamente disponible.

Cloruro de Sodio.- Permite el rápido crecimiento de bacterias marinas, por ofrecer el efecto de isotonicidad. La ausencia de sales conduce a un fenómeno hipotónico.

Agentes Solidificantes.- Se utilizan para endurecer los medios de cultivo, como por ejemplo el agar, la gelatina, la yema de huevo.

Agentes Selectivos.- Son sustancias químicas introducidas para inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos, así como también para favorecer el rápido crecimiento de otros, por ejemplo: Sales biliares, antibióticos.

Buffers.- Son sustancias químicas que neutralizan los cambios de pH en un sistema. Son imprescindibles para mantener un pH constante en el cultivo bacteriano (Paúl Rohde, B.A, 1971).

3.3.3.- PREPARACION DEL MEDIO.

Se seleccionó para la realización del MIC el medio de cultivo Mueller Hinton al 2.5% de NaCL, porque no contiene minerales ni carbohidratos que pueden alterar la interpretación de los resultados, y por ser un medio que facilita el crecimiento rápido de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas (Brenner, V.C ; and J.C. Sherris, 1972).

Es el medio mas adecuado para las pruebas de sensibilidad de microorganismos, ya que no produce ningún efecto antagonista con los antibióticos, porque carece en su composición bioquímica del ácido paraaminobenzoico (PABA) o sus análogos, que es el principal promotor de la producción de estos antagonistas (Bauer,Kirby,Sherris and Turck, 1972).

El Comité de la Organización Mundial de la Salud para la estandarización de pruebas de susceptibilidad ha aceptado el medio de Mueller Hinton para la determinación de susceptibilidad de microorganismos, debido a sus posibilidades de reproducción y adaptación.

La fórmula del medio de cultivo en gramos por litro de agua destilada es la siguiente:

<i>Infusión de carne de res</i>	300
<i>Peptona acidificase</i>	17.5
<i>Almidón</i>	17.0

Preparación :

Para la preparación se suspende 40 gramos del medio mas 25 gramos de NaCl QP, en un litro de agua destilada y desionizada, llevamos a calentamiento y mezclamos bien; cuando la solución este en punto de ebullición la llevamos a un proceso de autoclavado, para esto el agar fundido ya fue distribuido en fiolas en alícuotas exactas, suficientes para diluir la concentración intermedia y llevarla hasta una concentración final.

Utilizamos 2 ml de la solución de la concentración de la droga y 18 ml de agar, para de esta manera obtener una dilución final de 1:10. Los 20 ml de solución final se los distribuye en las cajas petri de 15 x100 mm.

El proceso de autoclavado se lo realiza a 121°C (15 lbs de presión) por 20 minutos. El agar autoclavado se lo coloca en un baño de María a 50°C.

La mesa para la preparación de las cajas petri debe ser muy bien desinfectada con alcohol. Las cajas petri necesariamente se colocan junto al mechero de bunsen. La fiola con el agar debe estar en 50 °C, porque temperaturas superiores provocarían la condensación del agua, similarmente temperaturas menores ocasionarían la solidificación del medio.

En la preparación de las cajas petri, colocamos 2 ml de la solución con la concentración intermedia e inmediatamente flameamos el borde de la fiola y extraemos 18ml de agar con la ayuda de una pipeta estéril, posteriormente retornamos la pipeta a la fiola. Giramos rápidamente la caja petri en dirección de las manecillas de reloj y en sentido contrario, con el objeto que se homogenize el medio líquido y obtener la solución de la concentración final (Foto # 7).

3.4.- IDENTIFICACION DE Vibrio spp.

3.4.1.-SELECCION Y PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE Vibrio spp.

Se escogieron para el aislamiento y conteo de las 4 especies de bacterias utilizadas en este estudio in Vitro los medios de cultivos TCBS y Agar Marino, el Agar Tripticase Soya se lo seleccionó con el objeto de purificación previo a la realización de las pruebas bioquímicas.

En la Figura # 35 podemos observar la representación esquemática típica de un proceso de siembra bacteriana.

AGAR TCBS

El agar de Tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa fue descrito por Kobayashi, para usarlo en el aislamiento selectivo de Vibrio spp.

La formula en gramos por litro de agua destilada y desionizada es la siguiente:

<i>Extracto de levadura</i>	5
<i>Peptona Polipeptona</i>	10
<i>Citrato de sodio</i>	10
<i>Tiosulfato de sodio</i>	10

<i>Bilis de buey</i>	5
<i>Colato sódico</i>	3
<i>Sacarosa</i>	20
<i>Cloruro de sodio</i>	10
<i>Citrato de hierro</i>	1
<i>Azul de timol</i>	0.04
<i>Azul de Bromotimol</i>	0.04
<i>Agar (Desecado)</i>	14

Preparación:

Realizamos una suspensión con 86 gramos del medio, más 25 gramos de NaCl QP en un litro de agua destilada y desionizada. Calentamos y agitamos constantemente hasta que la solución llegue al punto de ebullición. Retiramos el agar fundido y lo repartimos en las cajas petri.

AGAR MARINO

Es un medio utilizado para el crecimiento de bacterias marinas.

Fórmula en gramos por litro en agua destilada y desionizada:

<i>Polypeptona</i>	10.0
<i>Lemco</i>	3.0

<i>Extracto de yema</i>	3.0
<i>Cloruro de sodio</i>	8.0
<i>Cloruro de potasio</i>	10.0
<i>Sulfato de magnesio</i>	3.0
<i>Cloruro de calcio</i>	1.5
<i>Agar (Desecado)</i>	12.0

Preparación:

Suspendemos 55.1 grs de Agar marino, más 9.0 grs de bacto agar y más 25 gramos de NaCl QP en un litro de agua destilada y desionizada. Calentamos y agitamos constantemente hasta llegar al punto de ebullición.

Luego distribuimos la solución en las fiolas y las llevamos al autoclave.

El proceso de autoclavado se lo realiza por 20 minutos a 121°C y a 15 lbs de presión.

AGAR DE TRYPTICASE SOYA

Este agar es sencillamente un medio de cultivo con peptona que se utiliza eficazmente en procedimientos de purificación de colonias bacterianas.

La formula en gramos por litro de agua destilada es:

<i>Peptona trypticase</i>	5
<i>Agar (Desecado)</i>	20

Preparación :

Realizamos una suspensión de 25 gramos del medio, más 25 gramos de NaCl QP en un litro de agua destilada y desionizada. Calentamos y agitamos constantemente hasta llegar al punto de ebullición. Luego distribuimos la solución en las fiolas y las llevamos al autoclave. El proceso de autoclavado se lo realiza por 20 minutos a 121°C y a 15 lbs de presión.

3.4.2.- OBTENCION DE CEPAS.

Se inocularon 8 cajas petri con agar TCBS y 8 cajas petri con Agar Marino, con agua marina procedente del reservorio del sistema del ensayo, se las incubó a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, posteriormente procedimos a la selección.

La selección de colonias obedeció estrictamente al criterio de la capacidad de ciertas Vibrionáceas de producir bioluminiscencia, el color, tamaño y morfología básica de las mismas (Foto # 8), (T.J. Donovan and A.L.Furnis, 1978).

Los tipos de colonias seleccionadas en el agar TCBS fueron:

- Verdes luminiscentes.
- Verdes no luminiscentes.
- Amarillas cremosas convexas.
- Amarillas planas.

El primer tipo de colonia seleccionada fue la Verde luminiscente, y lo realizamos en un cuarto totalmente oscuro; sobre un mesa se colocaron las 16 cajas petri de los agares mencionados, esperamos 5 minutos para que la visión se adapte a la oscuridad, e inmediatamente procedimos a encontrar colonias bioluminiscentes, mismas que fueron encerradas dentro de un círculo con un marcador, sobre la placa petri .

Luego de esto realizamos la transferencia o resiembra de la colonia mejor definida, a 2 cajas de Agar TCBS, 2 cajas de Agar Marino y 2 cajas de Agar Trypticase soya.

En las cajas con TCBS observamos la pureza de la colonia, su morfología básica, tamaño y bioluminiscencia; en el Agar Marino evaluamos principalmente el tipo de crecimiento y distribución de las colonias, mientras que el Agar de Trypticase Soya lo utilizamos como un medio de purificación.

La manera como realizamos la transferencia, fue de lo más sencillo; la colonia seleccionada fue picada con un asa de platino esterilizada y

enfriada, e inmediatamente la introducimos en un tubo de ensayo con 5 ml de una solución de NaCl al 1%, agitamos constantemente hasta fragmentar completamente la colonia y crear una suspensión homogeneizada. De esta suspensión bacteriana realizamos la resiembra, para esto, introducimos el asa una sola vez en la suspensión y la sembramos por el método de estrías.

Los procedimientos de selección y resiembra de todos los tipos de colonias citadas en nuestro estudio fueron similares, con la diferencia de que en los tres tipos de colonias no luminiscentes no necesitamos la presencia de un cuarto oscuro para observación de bioluminiscencia.

3.4.3.- PRUEBAS BIOQUIMICAS.

3.4.3.1.- INTRODUCCION .

Realizamos los procesos de identificaciones bioquímicas por medio del sistema API 20 E, por ser un método versátil, y de gran confiabilidad en los resultados (Foto # 9).

El sistema API 20 E es ampliamente utilizado en trabajos científicos con una gran confiabilidad (D.V Lightner and L.L Mohny, 1992).

El sistema API 20E sirve para la identificación del grupo de las Enterobacteriaceae y otros microorganismos gram-negativos, mediante 23 diferentes pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, incluidas todas en una cinta, llamándose al conjunto, batería de pruebas bioquímicas API 20E.

3.4.3.2.- FUNDAMENTO.

El fundamento del método se basa en cambios enzimáticos, de la capacidad de utilizar o degradar nutrientes específicos, por efecto del metabolismo bacteriano. Estos cambios se reflejan principalmente en la variaciones de color y formación de burbujas, y se dan posteriormente al finalizar el período de incubación .

3.4.3.3.- MATERIALES.

Para emplear este sistema de identificación, es necesario contar con ciertos materiales básicos:

- Medio de suspensión :solución salina al 1%.
- Aceite mineral.
- Micropipetas de Pasteur.

-Medio API OF .Prueba que sirve para determinar el metabolismo fermentativo y oxidativo de la glucosa.

Además, la presencia de ciertos equipos de laboratorio se constituye en indispensable para la ejecución de la prueba:

-Incubadora.

-Nevera (para almacenar las tiras del API 20E).

-Mechero Bunsen.

-Asa de platino.

-Rotulador.

3.4.3.4.- CONFORMACION DEL API 20E.

Básicamente se constituye de una tira compuesta por 20 cápsulas que permite realizar 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, siendo estas:

ONPG: Ortonitrofenolgalactosido.

ADH: Arginina.

LDC: Lisina.

ODC: Ornitina.

CIT: Citrato sódico.

H₂S: Tiosulfato sódico.

URE: Urea.

TDA: Triptófano.

IND: Indol

VP: Piruvato sódico.

GEL: Gelatina de Kohn.

GLU: Glucosa.

MAN: Manitol.

INO: Inositol.

SOR: Sorbitol.

RHA: Ramnosa.

SAC: Sacarosa.

MEL: Melibiosa.

AMY: Amígdalina.

ARA: Arabinosa.

OX: Sobre papel filtro.

NO3: Producción de NO₂.(En la cápsula de GLU)

NO₂: Reducción a N₂.(En la cápsula de GLU)

MOB: Motilidad.

3.4.3.5.- PREPARACION DE LA GALERIA.

Preparamos una tira API 20E con su correspondiente tapa, y le adicionamos a la base de la tira aproximadamente 5 ml de agua destilada estéril, de esta manera proporcionamos una atmósfera húmeda.

Marcamos con una referencia el tipo de colonia, procedencia de la colonia y la fecha de iniciación de la prueba.

Colocamos la tira en la incubadora por espacio de 20 minutos, de manera que adquiriera la temperatura de la cámara.

Al mismo tiempo que realizamos estos pasos fue necesario adelantarnos con la prueba de oxidasa, para esto; extraíamos con el asa estéril una muestra de la suspensión bacteriana, la colocamos sobre una cinta de la prueba oxidasa, e inmediatamente esperamos de 1 a 2 minutos hasta que se manifieste la reacción, si el papel se torna púrpura, diremos que la prueba fue positiva.

3.4.3.6.- PREPARACION DE LA SUSPENSION BACTERIANA.

Seleccionamos una colonia, la mejor formada, morfológicamente hablando, y la picamos con el asa de platino esterilizada y enfriada, llevándola a un tubo de ensayo

que contiene 5 ml de una solución de cloruro de sodio al 1%, misma que fue preparada con agua destilada estéril y desionizada.

Procedemos a realizar una agitación fuerte a fin de que la colonia se fragmente y obtener de esta manera una suspensión homogénea.

3.4.3.7.- INOCULACION DE LA GALERIA.

Antes de explicar el procedimiento es necesario aclarar que cada prueba bioquímica esta incluida dentro de una cápsula, misma que esta conformada de 2 partes : el tubo y la cúpula.

Llenamos el tubo y la cúpula de las pruebas: CIT, VP, GEL, con la suspensión bacteriana, esto lo realizamos con la ayuda de una pipeta de pasteur estéril.

Llenamos los tubos, pero no la cúpulas de las demás pruebas.

Llenamos la cúpula de las pruebas :ADH, LDC, ODC, URE, H2H con aceite mineral, de esta manera bloqueamos la cápsula, proporcionando condiciones de anaerobiosis.

Cerramos la tira y la llevamos a incubación a $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ por espacio de 24 horas, tiempo en el que obtenemos la primera lectura.

3.4.3.8.- LECTURA DE LA GALERIA.

Anotamos en la hoja de resultados las reacciones espontáneas .

Si la Glucosa es positiva y/o 3 o más pruebas son positivas, entonces efectuamos la aplicación de los reactivos para aquellas pruebas que lo requieren:

*Prueba de VP: Añadimos 1 gota del reactivo VP1 y VP2, esperamos 10 minutos y realizamos la lectura.

*Prueba de TDA: Añadimos una gota de reactivo de TDA, esperamos 1 minuto y realizamos la lectura.

*Prueba de IND: Añadimos una gota de reactivo James, la reacción es inmediata y realizamos la lectura o en su defecto, añadimos una gota de reactivo IND, esperamos dos minutos y tomamos la lectura.

*Prueba de NO₂: Añadimos dos gotas de reactivo NIT 1 y NIT 2 en el tubo de GLU, esperamos 3 minutos y obtenemos la lectura. Un color rojo indica una reacción positiva. Una reacción negativa puede deberse a la reducción de Nitratos a N₂ (acompañada muchas veces de la formación de burbujas); debemos añadir 2 a 3 mg de reactivo de Zn . Si después de 5 minutos el tubo permanece amarillo indica una reacción positiva, si la reacción da color rosa o rojo la reacción es negativa.

Si la glucosa es negativa y el número de pruebas positivas es inferior o igual a 2 no añadimos reactivo.

*MOB: Básicamente consiste en evaluar la motilidad de la cepa, en fresco, para esto utilizamos como medio una solución fisiológica al 1% de NaCl. Realizamos una suspensión bacteriana tocando una colonia e inoculándola en 5 ml del medio. Agitamos bien hasta fragmentar la colonia, de tal manera que la suspensión quede lo más homogéneamente posible. Colocamos una gota de la suspensión y en el microscopio observamos la motilidad de la cepa.

3.4.3.9.- ESTERILIZACION.

Después de haber realizado la lectura de la tira API 20E es necesario esterilizarla, así como también el material empleado, mediante autoclavado, incineración o inmersión en una solución germicida efectiva.

3.4.4.- METODOS DE OBSERVACION MACROSCOPICA Y MICROSCOPICA.

Observaciones macroscópicas:

Las realizamos directamente sobre las cajas petri y observamos básicamente la morfología de las colonias y el crecimiento bacteriano. Principalmente diferenciamos ciertas características de las colonias, (T.J. Donovan and A.L .Furnis, 1978), mismas que son:

-Forma: Pueden ser redondas, planas, irregulares, extendidas .

-Tamaño: El tamaño de las colonias se las mide en mm.

-Elevación: Las colonias pueden presentar una elevación convexa, aplanada, umbonada, etc.

-Aspecto: Las colonias presentan aspecto pastoso, mucoso, con bordes claros o tonos azulados.

-Color: Las colonias en medios de cultivos no específicos muestran coloraciones blancas o cremas, además de presentar ciertas características ópticas como : iridiscencia , opalescencia, luminiscencia, etc.

-Producción de pigmentos: Las colonias producen pigmentos de color amarillo, naranja, rojo, violeta, negro, etc.

Observaciones microscópicas:

Las realizamos mediante la técnica de tinción de Gram, misma que nos permitió confirmar de que las 4 cepas utilizadas en nuestro estudio in Vitro, correspondían a microorganismos gram-negativos (Foto # 10), (Paúl Rohde, B.A ; Manual de la BBL, 1971).

Reactivos para la Tinción de Gram:

Son cuatro tipos diferentes de reactivos con funciones específicas:

1.-Cristal Violeta.

Lo aplicamos una vez que se ha fijado la muestra con calor, su composición química es la siguiente:

- Cristal violeta.....20grs
- Alcohol Etílico al 95%.....100ml

Solución de Oxalato:

- Oxalato de Amonio..... 1gr
- Agua destilada.....100ml

Se mezcla la solución del Oxalato con la de Cristal y obtenenos de esta manera la solución de teñido.

2.-Ioduro de Gram:

Interviene como sustancia mordiente, permitiendo la combinación del colorante y el sustrato.

Se prepara como sigue:

- Cristales de Iodo..... 1gr.
- Yoduro de Potasio.....2gr.

La disolvemos en 5 ml de agua destilada y desionizada y luego le añadimos:

-Agua destilada.....240ml.

-Bicarbonato de Sodio.....60ml.

3.-Decolorante:

Remueve el Cristal violeta cuando se tratan de bacterias gram-negativas. El reactivo decolorante se trata de Alcohol al 95% o también una mezcla de 1:1 de Propanona y Alcohol al 95%.

4.-Safranina:

Tiñe a la células bacterianas decoloradas del Cristal violeta, es decir que tiñe a las células gram-negativas y se prepara de la siguiente manera:

-Safranina.....2.5gr.

-Alcohol Etílico al 95%.....100ml.

Luego realizamos una dilución de 1:10 de la solución de Safranina con agua destilada y desionizada.

Método de la Tinción de Gram:

- 1.-El frotis fijado con calor lo teñimos durante un minuto con Cristal violeta .
- 2.-Lavar con agua corriente.
- 3.-Cubrir con solución Yodada de Gram y dejamos en reposo durante un minuto.
- 4.-Lavamos con agua corriente y secamos suavemente con papel filtro.
- 5.-Decolorar durante 30 segundos aplicando la solución decolorante en la superficie del frotis.
- 6.-Contrateñimos con Safranina durante 30 segundos.
- 7.-Lavar, secar y examinar.

Con el lente de inmersión procedimos a realizar la observación microscópica y confirmar la clasificación de Gram.

En la Figura # 36 podemos esquematizar todo el proceso de la tinción de Gram.

3.4.5.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Primeramente realizamos las lecturas de cada una de las reacciones bioquímicas, para posteriormente obtener la información final , que nos permitió identificar la especie bacteriana de interés.

La lectura se la realiza por los cambios de coloración que se dan y en ciertos casos por la formación de burbujas y acumulación de sólidos, como ya mencionamos anteriormente; clasificándose a dichas coloraciones como positivas y negativas.

Los colores para positivo y negativo varían de acuerdo al tipo de reacción bioquímica que se manifieste, y pueden ser: incoloro, amarillo, rojo o naranja, verde , difusión de pigmento negro, depósito de pigmento negro y verde azulado.

Citaremos para cada prueba bioquímica los tipos de coloración que se dan para negativo y positivo.

ONPG: Negativo(Incoloro); Positivo(Amarillo).

ADH: Negativo(Amarillo) ; Positivo(Rojo/Naranja).

LDC: Negativo(Amarillo) ; Positivo(Naranja).

ODC: Negativo(Amarillo); Positivo(Rojo/Naranja).

CIT: Negativo(Verde pálido/Amarillo); Positivo(Azul verde/Azul).

H2S: Negativo(Incoloro/Grisáceo); Positivo(Depósito negro).

URE: Negativo(Amarillo); Positivo(Rojo/Naranja).

TDA: Negativo(Amarillo); Positivo(Marrón rojizo).

IND: Negativo(Amarillo); Positivo(Rosado/Rojo).

VP: Negativo(Incoloro); Positivo(Rosado/Rojo).

GEL: Negativo(No hay difusión de pigmento negro); Positivo(Difusión de pigmento negro).

GLU: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

MAN: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

INO: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

SOR: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

RHA: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

SAC: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo). La utilización del carbohidrato resulta en la formación de ácidos, y por consiguiente una caída de pH, lo que da por resultado un cambio de coloración de azul a amarillo.

MEL: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

AMY: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

ARA: Negativo(Azul/Azul verdoso); Positivo(Amarillo).

Reducción de Nitratos.- GLU: Los Nitritos forman una red compleja con el ácido Sulfanílico y con el ácido N-N-Dimethylalpha-Naphthylamine. En caso de que se produzca una reacción negativa la

adición de Zn nos confirma la presencia de formas de Nitratos no reducidos, por la reducción de Nitritos y se produce una coloración Rosado/Naranja. Si no se da el cambio de coloración por la adición de Zn, esto nos indica la reducción completa de Nitratos a Gas N₂ o a una forma de Amina Anaerogénica.

Una vez realizada la lectura de cada una de las pruebas bioquímicas comprendidas en la tira del sistema API 20E, explicaremos la manera correcta de ordenar la información para la identificación de la especie bacteriana de importancia.

Las 21 pruebas están separadas en grupos de 3 y tienen un valor de 1-2-4 consecutivamente. De cada grupo obtenemos un número que es el resultante de la sumatoria de tan solamente la reacciones positivas, así lo demostramos en la tabla # 13.

TABLA X

EJEMPLO DE CATEGORIZACION NUMERICA DE UNO DE LOS FRAGMENTOS DE LA CINTA API 20 E

ONPG	ADH	LDC
1	2	4
+	-	+

La lectura nos indica que el número resultante para este grupo es 5.

Al finalizar la lectura de la tira completa obtendremos un número final de 7 dígitos, que puede ser de 8 a 9 dígitos al realizarse 3 a 6 pruebas adicionales, cuando se considere que la información adicional es completamente necesaria. Esto suele suceder principalmente cuando las reacciones bioquímicas de dos especies bacterianas son muy parecidas, entonces necesitamos las pruebas adicionales para diferenciar e identificar a que especie corresponde.

Para nuestro estudio de identificación de las 4 cepas bacterianas realizamos 23 pruebas bioquímicas y una de motilidad, es decir obtenemos un número final de 8 dígitos.

Este número final lo comparamos en el API 20E Index, que es un libro en donde están ordenados los códigos de 108 diferentes especies bacterianas. El sistema API 20E categoriza al proceso de identificación en la presentación del resultado final como: excelente, muy buena, buena y mala identificación.

De esta manera podemos saber si la especie en estudio está contaminada, fue mal procesada o simplemente el sistema no la identifica; como también conocer si todo el proceso de preparación de la cepa fue un éxito.

Es importante señalar que el sistema Index 20E, fue un instrumento importante, adicional, porque para mayor confiabilidad utilizamos la combinación del sistema con la comparación de las tablas clásicas bioquímicas pertenecientes al grupo de los Vibrios; tal como lo denota la tabla # 14 (T.J. Donovan and A.L .Furnis, 1978).

TABLA XI

TABLA CLASICA DE LAS PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS VIBRIONACEAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO IN VITRO.

ESPECIE	ADH	LDH	ODC	OX	GAS	ARA	INO	SUC	VP	ONPG	0/129
<u>V.vulnificus.</u>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	S
<u>V. sp</u>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	S
<u>V.alginolyticus</u>	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	S
<u>A.sp</u>	+	-	-	+	V	V	-	+	V	+	R

/= No se conoce.

= Positivo.

= Negativo.

/129;R, Resistente ; S,Susceptible.

3.5.- PREPARACION DEL INOCULO.

Es indispensable mencionar de que el orden de: preparación del inóculo, inoculación del medio, incubación del medio, hasta la lectura e interpretación de los resultados del MIC, con respecto a las 4 especies bacterianas fue el siguiente:

- 1) Vibrio vulnificus.
- 2) Vibrio sp.
- 3) Vibrio alginolyticus.
- 4) Aeromona sp.

Tomamos de 2 a más cepas, las que fuesen necesarias, del Agar Trypticase soya al 2.5% NaCl y la inoculamos en 5 ml de Caldo de Trypticase Soya al 2.5% NaCl, agitamos constantemente hasta obtener una suspensión homogénea y disgregar totalmente las colonias. Luego de esto ajustamos la turbidez de esta suspensión a la estándar, de 0.5 McFarland; para esto utilizamos el mismo medio de Caldo de Trypticase Soya al 2.5% NaCl, la cantidad que sea necesaria hasta equiparar la turbidez visualmente.

Para preparar 0.5 McFarland utilizamos el mismo medio en que se inocularon las cepas , y se lo realiza introduciendo un isopo de madera hasta 1 cm en leche de magnesia, suspendemos este material en 5 ml de Caldo de Trypticase

Soya al 2.5%, lo agitamos bien, y el medio estándar está preparado. Esto es aproximadamente igual a 10 microlitros de leche de Magnesia en 5 ml de solvente (Ericsson , H.M;and J.C.Sherris, 1971).

A partir de esto realizamos una dilución 1:10, para esto tomamos 0.5 ml de la suspensión calibrada a 0.5 McFarland y 4.5 ml del medio de Caldo de Trypticase Soya al 2.5% NaCl, dándonos una concentración final de 10×10^7 UFC/ML (Foto # 11).

Preparado el inóculo tan solo lo podemos utilizar por un tiempo de 30 minutos, debido a que la población bacteriana de la suspensión puede crecer drásticamente afectando el tamaño del mismo.

3.6.- INOCULACION DEL MEDIO.

Primeramente tuvimos que desinfectar la mesa en donde íbamos a llevar a cabo la inoculación de las cajas. Posteriormente fue necesario calentar las cajas conteniendo el medio, en la incubadora a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ por espacio de 10 minutos, para luego colocarlas en la mesa desinfectada .

Se inocularon la superficie de las cajas con una asa calibrada de 0.001ml, este volumen fue esparcido con un isopo estéril de 5 mm de diámetro homogéneamente. Para que el inóculo se distribuya por todo el área de la

superficie del agar fue necesario realizarlo en 3 direcciones, primero en forma de cruz, y por último de manera diagonal.

Empezamos la inoculación con aquellas cajas de mas baja concentración; las controles fueron inoculadas al final; se las destinó para evaluar la viabilidad y pureza de las cepas en estudio (Foto # 12).

Aplicando esta metodología obtuvimos una concentración final de 10×10^4 UFC/ML (D.V Lightner and L.L Mohny, 1992).

3.7.- INCUBACION DEL MEDIO.

Las cajas inoculadas fueron mantenidos en reposo por 15 minutos hasta que el inóculo sea completamente absorbido y luego las incubamos a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas (Foto # 13). A las 24 horas se realizó la primera lectura y a 48 horas se practicó la segunda lectura. La incubación se la realizó en condiciones de atmósfera normal.

3.8.- INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL MIC.

Con un ejemplo explicaremos la manera como se deben interpretar los resultados, después de la observación de la tabla de MIC # 26.

El MIC para el Vibrio vulnificus a 24 horas de incubación con las condiciones señaladas es de 4 ug/ml, en la concentración de 3.003ug/ml observamos una condición de crecimiento leve, es decir que se denota el crecimiento aislado de pocas UFC. Bajo la concentración de 3.003 ug/ml observamos abundante crecimiento de UFC, similar en todas las concentraciones siguientes hasta la menor que es de 0.05 ug/ml, es decir que no se observa diferencia de crecimiento bacteriano en las concentraciones bajo 3.003 ug/ml. En y sobre la concentración de 4 ug/ml, no se presentó en ninguna caja crecimiento bacteriano.

De similar manera a 24 horas de incubación pudimos observar en las cajas controles un buen crecimiento bacteriano, además no se presentó ningún rasgo de contaminación bacteriana.

A 48 horas de incubación el MIC para el Vibrio vulnificus sigue siendo el mismo de 4ug/ml , bajo las mismas condiciones de incubación y se repiten los mismos resultados que a las 24 horas de incubación.

En las cajas controles a 48 horas de incubación, el crecimiento bacteriano fue abundante y no se presentó ninguna manifestación de contaminación.

De esta manera pudimos concluir categóricamente que el MIC del Flavofosfolípol para el Vibrio vulnificus fue de 4ppm (Foto # 14).

Para una correcta interpretación y aplicación de los resultados del MIC debemos comprender que esto depende del conocimiento de tres importantes factores (Ericsson ,H.M ;and J.C .Sherris .1971); y del concepto de Susceptibilidad, y Resistencia (Villanova 1982. National Committee for Clinical Laboratory Standars).

Los factores mencionados son:

- La relación existente entre el MIC del agente antimicrobiano y la concentración del agente antimicrobiano en los fluidos sanguíneos. Este concepto es bueno, pero un modelo in Vivo de esta situación es incompleto, porque los niveles del agente antimicrobiano en los fluidos son impredecibles, especialmente para los camarones, porque las proteínas se combinan en gran manera con las drogas o por los mecanismos de defensa propios de los crustáceos que liberan sustancias que interfieren con el mecanismo de acción de las drogas en diversos grados.
- El segundo factor se refiere a la relación de susceptibilidad de la colonia de prueba y otros miembros de la misma especie, es decir variedades de cepas que son mutantes de resistencia. El MIC se lo determina principalmente para la cepa que está causando el problema y es la que ocurre con mayor intensidad dentro de los medios de cultivo, pero existen variedades en la especie a la cual el agente antimicrobiano no le afecta.
- El tercer factor se refiere a la experiencia del patólogo en tratar la infección .

Una ideal interpretación de los resultados del MIC resulta en la correlación de estos tres factores.

Como manifestamos anteriormente es también importante para una correcta interpretación del MIC el conocimiento de los conceptos de Susceptibilidad y Resistencia.

Susceptibilidad: Implica que la infección debido a la cepa de prueba puede ser satisfactoriamente tratada con los agentes antimicrobianos y la dosis recomendada para el tipo de infección.

Resistencia: Implica las cepas que no pueden ser completamente inhibidas, in Vitro, con la dosis terapéutica usualmente recomendada.

Por todo lo manifestado, las autoridades en Patología, como Donald Lighthner, recomiendan para tratamiento de infecciones en Laboratorios o Granjas camaroneras, al resultado del MIC multiplicarlo por 2, 5 o 10 veces de su concentración y así aseguramos que la concentración sea suficientemente efectiva en los fluidos hemolinfáticos del camarón (D.V Lighthner and L. L Mohny, 1992).

CAPITULO IV

IV.- ANALISIS DE LOS RESULTADOS

4.1.- TABLAS DE DATOS Y RESULTADOS

En primer lugar distribuimos las tablas de los resultados semanales de los muestreos de sobrevivencia y biomasa total y del peso promedio para cada una de las unidades experimentales. En total fueron 7 tablas, siendo estas la : # 15, #16, # 17, # 18, # 19, # 20 y # 21.

Como segundo punto distribuimos una tabla de parámetros nutricionales de la semana de finalización del ensayo, en la que medimos: ganancia de peso total, consumo de alimento, ganancia de peso promedio y conversión alimenticia, para cada una de las unidades experimentales, tal como lo denotamos en la tabla # 22.

Como tercer punto se dispuso una tabla de la composición porcentual de cada uno de los ingredientes utilizados en la preparación de 1 Kg de la dieta y las cantidades de Flavofosfolipol 40G utilizadas para incorporarse a la dieta del tratamiento 1 y del tratamiento 2; como lo argumentamos en la tabla # 23.

A continuación como cuarto punto se dispuso una tabla de la composición nutricional de los ingredientes de la dieta, en donde se detallan los valores de los principios nutricionales, tal como lo argumentamos en la tabla # 24.

Como quinto punto dispusimos los resultados de la concentración mínima inhibitoria de las cuatro cepas bacterianas a 24 y a 48 horas de incubación, tal como lo argumentamos en las tablas # 25, # 26, #27, # 28, # 29, #30, # 31 y #32.

Como último punto presentamos los resultados de identificación bioquímica de las cepas, tal como lo argumentamos en las tablas # 33, # 34, # 35, # 36.

TABLA XII
TABLA DE RESULTADOS
PRIMER DIA DEL ENSAYO:SIEMBRA DE LOS JUVENILES

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	50	32.22	0.645
CONTROL-3	50	38.84	0.776
CONTROL-4	50	38.30	0.766
TRATAMIENTO1-1	50	37.85	0.757
TRATAMIENTO1-2	50	36.65	0.733
TRATAMIENTO1-3	50	31.00	0.620
TRATAMIENTO1-4	50	40.25	0.805
TRATAMIENTO2-1	50	43.05	0.861
TRATAMIENTO2-2	50	32.45	0.645
TRATAMIENTO2-3	50	32.70	0.654
TRATAMIENTO2-4	50	38.10	0.762

TABLA XIII
TABLA DE RESULTADOS
PRIMERA SEMANA DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	48	41.88	0.872
CONTROL-3	48	50.39	1.049
CONTROL-4	47	49.36	1.050
TRATAMIENTO1-1	49	52.69	1.075
TRATAMIENTO1-2	48	53.15	1.107
TRATAMIENTO1-3	48	44.40	0.925
TRATAMIENTO1-4	49	57.55	1.174
TRATAMIENTO2-1	48	60.51	1.260
TRATAMIENTO2-2	50	46.70	0.934
TRATAMIENTO2-3	49	47.87	0.976
TRATAMIENTO2-4	49	53.68	1.095

TABLA XIV
TABLA DE RESULTADOS
SEGUNDA SEMANA DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	46	52.41	1.139
CONTROL-3	45	60.99	1.355
CONTROL-4	46	60.44	1.313
TRATAMIENTO1-1	47	69.15	1.471
TRATAMIENTO1-2	48	68.74	1.432
TRATAMIENTO1-3	47	58.69	1.248
TRATAMIENTO1-4	47	68.07	1.448
TRATAMIENTO2-1	47	80.31	1.708
TRATAMIENTO2-2	49	63.02	1.286
TRATAMIENTO2-3	47	63.97	1.361
TRATAMIENTO2-4	49	72.26	1.474

TABLA XV
TABLA DE RESULTADOS
TERCERA SEMANA DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	43	62.96	1.464
CONTROL-3	41	72.08	1.758
CONTROL-4	38	73.39	1.931
TRATAMIENTO1-1	46	86.85	1.888
TRATAMIENTO1-2	46	86.37	1.877
TRATAMIENTO1-3	44	72.23	1.687
TRATAMIENTO1-4	45	84.43	1.876
TRATAMIENTO2-1	45	100.03	2.222
TRATAMIENTO2-2	48	82.24	1.713
TRATAMIENTO2-3	46	82.40	1.791
TRATAMIENTO2-4	47	91.35	1.943

TABLA XVI
TABLA DE RESULTADOS
CUARTA SEMANA DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	37	73.48	1.985
CONTROL-3	35	82.57	2.359
CONTROL-4	33	84.74	2.567
TRATAMIENTO1-1	44	104.71	2.379
TRATAMIENTO1-2	43	104.32	2.426
TRATAMIENTO1-3	44	87.86	1.996
TRATAMIENTO1-4	40	101.10	2.527
TRATAMIENTO2-1	44	116.70	2.652
TRATAMIENTO2-2	47	100.15	2.130
TRATAMIENTO2-3	46	101.49	2.206
TRATAMIENTO2-4	44	110.67	2.515

TABLA XVII
TABLA DE RESULTADOS
QUINTA SEMANA DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)
CONTROL-1	27	84.19	3.118
CONTROL-3	29	93.54	3.225
CONTROL-4	24	95.66	3.985
TRATAMIENTO1-1	36	122.38	3.399
TRATAMIENTO1-2	42	121.58	2.894
TRATAMIENTO1-3	43	106.37	2.473
TRATAMIENTO1-4	37	119.28	3.223
TRATAMIENTO2-1	41	138.58	3.380
TRATAMIENTO2-2	43	119.79	2.785
TRATAMIENTO2-3	41	122.20	2.980
TRATAMIENTO2-4	41	131.27	3.201

TABLA XVIII
TABLA DE RESULTADOS
SEMANA DE FINALIZACION DEL ENSAYO

TRATAMIENTO (REPLICAS)	# ORGANISMOS	PESO TOTAL (GRS)	PESO PROMEDIO (GRS)	SOBREVIVENCIA %
CONTROL-1	24	94.37	3.932	48
CONTROL-3	26	103.61	3.985	52
CONTROL-4	22	104.48	4.749	44
TRATAMIENTO 1-1	33	138.94	4.210	66
TRATAMIENTO 1-2	39	139.17	3.568	78
TRATAMIENTO 1-3	37	122.97	3.323	74
TRATAMIENTO 1-4	36	135.36	3.760	72
TRATAMIENTO 2-1	39	160.75	4.121	78
TRATAMIENTO 2-2	40	139.05	3.476	80
TRATAMIENTO 2-3	38	141.58	3.725	76
TRATAMIENTO 2-4	39	153.04	3.924	78

TABLA XIX
TABLA DE RESULTADOS DE PARAMETROS NUTRICIONALES
SEMANA FINAL DEL ENSAYO.

TRATAMIENTO	CONSUMO DE ALIMENTO(grs)	GANANCIA DE PESO(grs)	GANANCIA DE PESO PROMEDIO(grs)	CONVERSION ALIMENTICIA C.A.
CONTROL-1	102.85	62.11.	3.28	1.65
CONTROL-3	118.49	64.81	3.20	1.82
CONTROL-4	119.25	66.17	3.98	1.80
TRATAMIENTO 1-1	139.16	101.08	3.45	1.37
TRATAMIENTO 1-2	138.31	102.5	2.83	1.34
TRATAMIENTO 1-3	118.09	91.95	2.70	1.28
TRATAMIENTO 1-4	138.97	95.11	2.95	1.46
TRATAMIENTO 2-1	158.57	117.66	3.26	1.34
TRATAMIENTO 2-2	129.81	106.79	2.83	1.21
TRATAMIENTO 2-3	131.71	108.85	3.07	1.21
TRATAMIENTO 2-4	145.76	114.93	3.16	1.26

TABLA XX
COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS INGREDIENTES UTILIZADOS EN
LA PREPARACION DE LA DIETA DEL ENSAYO.

PREPARACIÓN DE 1 KG DE DIETA.

INGREDIENTE	PORCENTAJE (%)	CANTIDAD (Grs)
PASTA DE SOYA	6.0	60
HARINA DE SORGO	0.0	0.0
HARINA DE PESCADO	42.5	425
HARINA DE TRIGO	25.0	250
HARINA DE CAMARON	1.02	10.2
LEVADURA DE CERVEZA	2.0	20
POLVILLO DE ARROZ	15.2	152.0
ACEITE DE PESCADO	1.5	15.0
LANGOBIN	3.7	37.0
EXCIPIENTE	0.96	9.60
BHT	0.02	0.20
PREMIX DE CAMARONES	0.1	1.0
HARINA DE JAIBA	2.0	20.0
TOTAL	100	1000

Dieta Control = 0 grs de Flavomycin

Dieta Tratamiento 1 (9.7 PPM) = 375 mg de Flavomycin 40/Kg.

Dieta Tratamiento 2 (22 PPM) = 875 mg de Flavomycin 40/Kg.

TABLA XXI

COMPOSICION NUTRICIONAL DE LA DIETA UTILIZADA EN EL ENSAYO.

ENERGIA METABOLICA	2924.8870 Cal
HUMEDAD	8.5472 %
GRASA	8.0201 %
FIBRA	2.0867 %
CENIZAS	15.4690 %
CALCIO	2.9247 %
FOSFORO DISPONIBLE	1.5669 %
FOSFORO TOTAL	1.7156 %
PROTEINA CRUDA	34.9676 %
ARGININA	2.1540 %
LISINA	2.5511 %
METIONINA	0.9342 %
METIONINA Y CISTEINA	1.3350 %
TRIPTOFANO	0.3850 %
GLICINA	1.6558 %
HISTIDINA	2.4766 %
YODO	1.0000 %
SELENIO	0.661 %
CLORURO DE SODIO	1.4169 %
OTROS	10.1326 %

TABLA XXII

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio vulnificus FRENTE AL
FLAVOFOSFOLIPOL A 24 HORAS DE INCUBACIÓN.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO #1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x1	x1	x1	x1
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condiciones: 24 horas de incubación a 29 ± 1 °C

x: Crecimiento

x1: Crecimiento leve

ng: No hay crecimiento

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl

Tipo: Colonias verdes luminiscentes

Mic a 24 horas: 4ug/ml.

TABLA XXIII
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio vulnificus FRENTE
AL FLAVOFOSFOLIPOLA 48 HORAS DE INCUBACION

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x1	x1	x1	x1
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condiciones: 48 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias verdes luminiscentes.

Mic a 48 horas: 4ug/ml.

TABLA XXIV

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio sp FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL A 24 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO #1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	ng	ng	ng	ng
3.003	ng	ng	ng	ng
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condiciones: 24 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias verdes.

Mic a 24 horas: 2ug/ml.

TABLA XXV

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio sp FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL A 48 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	ng	ng	ng	ng
3.003	ng	ng	ng	ng
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condición: 48 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias verdes.

Mic a 48 horas: 2ug/ml.

TABLA XXVI

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio alginolyticus FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL A 24 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x	x	x	x
4	x	x	x	x
5	x	x	x	x
6.002	x	x	x	x
7.002	x	x	x	x
8	x	x	x	x
9.009	x1	x1	x1	x1
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condición: 24 horas de incubación a 29 ± 1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias amarillas cremosas.

Mic a 24 horas: 10ug/ml

TABLA XXVII

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL Vibrio alginolyticus FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL A 48 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x	x	x	x
4	x	x	x	x
5	x	x	x	x
6.002	x	x	x	x
7.002	x	x	x	x
8	x	x	x	x
9.009	x1	x1	x1	x1
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condición: 48 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias amarillas cremosas.

Mic a 48 horas: 10ug/ml.

TABLA XXVIII

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE Aeromona sp FRENTE AL FLAVOFOSFOLIPOL A 24 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x1	x1	x1	x1
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condición: 24 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de Cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias amarillas planas.

Mic a 24 horas : 4ug/ml.

TABLA XXIX
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DE Aeromona sp FRENTE AL
FLAVOFOSFOLIPOL A 48 HORAS DE INCUBACION.

CONCENTRACION (UG/ML)	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3	PLATO#4
0.05	x	x	x	x
0.1	x	x	x	x
0.2	x	x	x	x
0.5	x	x	x	x
1	x	x	x	x
2	x	x	x	x
3.003	x1	x1	x1	x1
4	ng	ng	ng	ng
5	ng	ng	ng	ng
6.002	ng	ng	ng	ng
7.002	ng	ng	ng	ng
8	ng	ng	ng	ng
9.009	ng	ng	ng	ng
10	ng	ng	ng	ng
20	ng	ng	ng	ng
50	ng	ng	ng	ng
100	ng	ng	ng	ng
Control	x	x	x	x

Condición: 48 horas de incubación a 29±1 °C.

x: Crecimiento.

x1: Crecimiento leve.

ng: No hay crecimiento.

Medio de cultivo: Mueller Hinton al 2.5% NaCl.

Tipo: Colonias amarillas planas.

Mic a 48 horas: 4ug/ml

TABLA XXX

PERFIL BIOQUIMICO DEL TIPO DE COLONIAS VERDES LUMINISCENTES(TCBSA).

TEST	SUBSTRATOS	REACCION	RESULTADOS
ONPG	ORTONITROFENOL- GALACTOSIDO	B-GALACTOSIDASA	+
ADI1	ARGININA	ARGININA-DEHIDROLASA	-
LDC	LISINA	LISINA-DECARBOXILASA	+
ODC	ORNITINA	ORNITINA-DECARBOXILASA	+
CIT	CITRATO SODICO	UTILIZACION DEL CITRATO	+
H2S	TIOSULFATO SODICO	PRODUCCION DE H2S	-
URE	UREA	UREASA	-
TDA	TRIPTOFANO	TRIPTOFANO DESAMINASA	-
IND	TRIPTOFANO	PRODUCCION DE INDOL	+
VP	PIRUVATO SODICO	PRODUCCION DE ACETOINA	-
GEL	GELATINA DE KOHN	GELATINASA	+
GLU	GLUCOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MAN	MANITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	+
INO	INOSITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SOR	SORBITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
RHA	RAMNOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SAC	SACAROSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
MEL	MELIBIOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
AMY	AMIGDALINA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
ARA	ARABINOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
OXI	SOBRE PAPEL FILTRO	CITOCROMO-OXIDASA	+
NO2	NITRITO	PRODUCCION DE NO2	+
GAS	GAS	PRODUCCION DE GAS	-

Identificación: Vibrio vulnificus.

Comentario: Identificación Excelente.

TABLA XXXI

PERFIL BIOQUIMICO DEL TIPO DE COLONIAS VERDES NO LUMINISCENTES(TCBSA).

TEST	SUBSTRATOS	REACCION	RESULTADOS
ONPG	ORTONITROFENOL- GALACTOSIDO	B-GALACTOSIDASA	-
ADH	ARGININA	ARGININA-DEHIDROLASA	-
LDC	LISINA	LISINA-DECARBOXILASA	+
ODC	ORNITINA	ORNITINA-DECARBOXILASA	+
CIT	CITRATO SODICO	UTILIZACION DEL CITRATO	+
H ₂ S	TIOSULFATO SODICO	PRODUCCION DE H ₂ S	-
URE	UREA	UREASA	-
TDA	TRIPTOFANO	TRIPTOFANO DESAMINASA	+
IND	TRIPTOFANO	PRODUCCION DE INDOL	+
VP	PIRUVATO SODICO	PRODUCCION DE ACETOINA	-
GEL	GELATINA DE KOHN	GELATINASA	+
GLU	GLUCOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MAN	MANITOL	FERMETACION/ OXIDACION	-
INO	INOSITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SOR	SORBITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
RHA	RAMNOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SAC	SACAROSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
MEL	MELIBIOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
AMY	AMIGDALINA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
ARA	ARABINOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
OXI	SOBRE PAPEL FILTRO	CITOCROMO-OXIDASA	+
NO ₂	NITRITO	PRODUCCION DE NO ₂	+
GAS	GAS	PRODUCCION DE GAS	-

Identificación: *Vibrio sp.*

Comentario: Identificación Excelente.

TABLA XXXII

PERFIL BIOQUIMICO DEL TIPO DE COLONIAS AMARILLAS CREMOSAS(TCBSA).

TEST	SUBSTRATOS	REACCION	RESULTADOS
ONPG	ORTONITROFENOL- GALACTOSIDO	B-GALACTOSIDASA	-
ADH	ARGININA	ARGININA-DEHIDROLASA	-
LDC	LISINA	LISINA-DECARBOXILASA	+
ODC	ORNITINA	ORNITINA-DECARBOXILASA	+
CTT	CITRATO SODICO	UTILIZACION DEL CITRATO	+
H ₂ S	TIOSULFATO SODICO	PRODUCCION DE H ₂ S	-
URE	UREA	UREASA	-
TDA	TRIPTOFANO	TRIPTOFANO DESAMINASA	+
IND	TRIPTOFANO	PRODUCCION DE INDOL	+
VP	PIRUVATO SODICO	PRODUCCION DE ACETOINA	-
GEL	GELATINA DE KOHN	GELATINASA	+
GLU	GLUCOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MAN	MANITOL	FERMETACION/ OXIDACION	+
INO	INOSITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SOR	SORBITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
RHA	RAMNOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SAC	SACAROSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MEL	MELIBIOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
AMY	AMIGDALINA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
ARA	ARABINOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
OXI	SOBRE PAPEL FILTRO	CITOCROMO-OXIDASA	+
NO ₂	NITRITO	PRODUCCION DE NO ₂	+
GAS	GAS	PRODUCCION DE GAS	-

Identificación: Vibrio alginolyticus

Comentario: Identificación Excelente.

TABLA XXXIII

PERFIL BIOQUIMICO DEL TIPO DE COLONIAS AMARILLAS PLANAS(TCBSA).

TEST	SUBSTRATOS	REACCION	RESULTADOS
ONPG	ORTONITROFENOL- GALACTOSIDO	B-GALACTOSIDASA	+
ADI1	ARGININA	ARGININA-DEHIDROLASA	-
LDC	LISINA	LISINA-DECARBOXILASA	-
ODC	ORNITINA	ORNITINA-DECARBOXILASA	-
CTT	CITRATO SODICO	UTILIZACION DEL CITRATO	+
H2S	TIOSULFATO SODICO	PRODUCCION DE H2S	-
URE	UREA	UREASA	-
TDA	TRIPTOFANO	TRIPTOFANO DESAMINASA	+
IND	TRIPTOFANO	PRODUCCION DE INDOL	-
VP	PIRUVATO SODICO	PRODUCCION DE ACETOINA	-
GEL	GELATINA DE KOHN	GELATINASA	-
GLU	GLUCOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MAN	MANITOL	FERMETACION/ OXIDACION	+
INO	INOSITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SOR	SORBITOL	FERMENTACION/ OXIDACION	-
RHA	RAMNOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
SAC	SACAROSA	FERMENTACION/ OXIDACION	+
MEL	MELIBIOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
AMY	AMIGDALINA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
ARA	ARABINOSA	FERMENTACION/ OXIDACION	-
OXI	SOBRE PAPEL FILTRO	CITOCROMO-OXIDASA	+
NO2	NITRITO	PRODUCCION DE NO2	+
GAS	GAS	PRODUCCION DE GAS	-

Identificación: Aeromona sp. Test O/129= + Comentario: Identificación Excelente.

4.2.- GRAFICOS.-

Explicaremos a continuación la manera como distribuimos todas las figuras correspondientes a esta tesis.

En primer lugar distribuimos la esquematización que representa la sala de ensayos en donde se evaluó el crecimiento y sobrevivencia; y la esquematización que corresponde a la sala de microbiología e histopatología, en donde se desarrollaron los estudios in Vitro, presentándolas como figura # 1 y figura # 2 respectivamente.

A continuación expusimos la representación gráfica de la Sobrevivencia, semanal, correspondientes a las figuras: # 3, # 4, # 5, # 6, # 7, # 8, # 9, # 10, # 11, # 12 y # 13.

Después de esto, similarmente expusimos la representación gráfica del crecimiento semanal, argumentadas en las figuras : # 14, # 15, # 16, # 17, # 18, # 19, # 20, # 21, # 22, # 23 y # 24.

Siguiendo la temática presentamos los gráficos de los resultados finales (en la culminación del ensayo), correspondientes a: sobrevivencia, pesos promedios,

biomasa, conversión alimenticia; argumentados en las figuras : # 25, # 26, # 27 y # 28.

Posteriormente presentamos los gráficos correspondientes a la dieta ensayada, su composición de los ingredientes y su composición nutricional, tal como lo exponemos en las figuras # 29 y # 30 respectivamente.

Luego de esto presentamos las fluctuaciones diarias de temperatura, salinidad y pH, en las figuras # 31, # 32 y # 33 respectivamente.

Después de esto, presentamos el gráfico en donde señalamos el costo de producción e investigación de un juvenil para cada tratamiento (Costo Medio), tal como lo argumentamos en la figura # 34.

Por ultimo presentamos la obtención de colonias y la tinción de gram en las figuras # 35 y 36 respectivamente.

UNIDAD EXPERIMENTAL:

GAVETA C-1

CURVA DE SOBREVIVENCIA

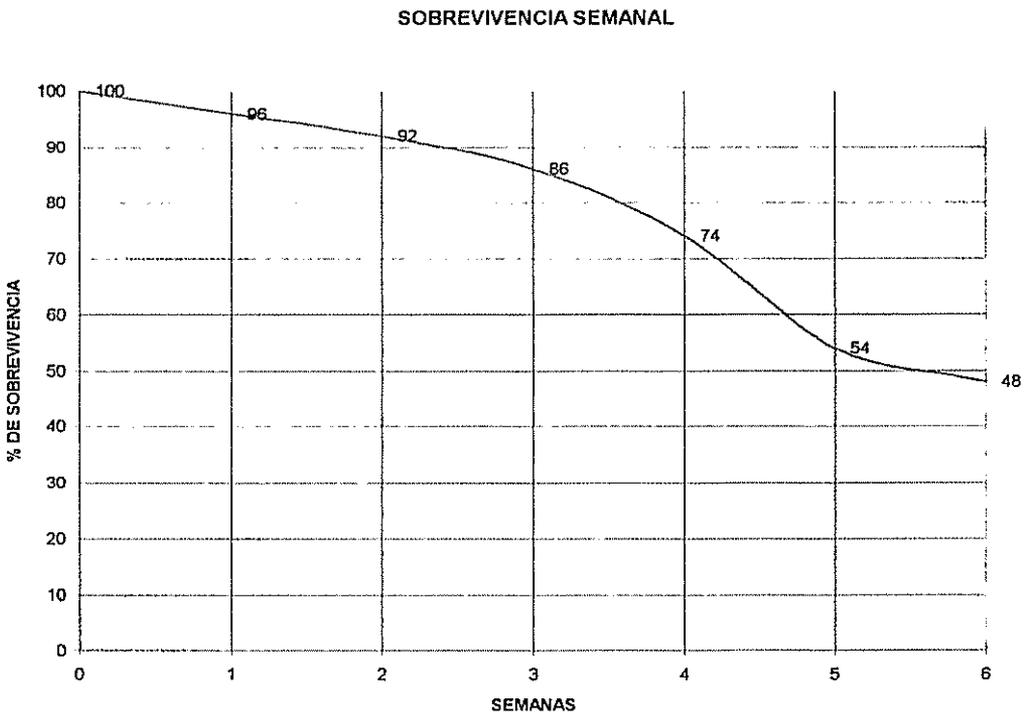


GRAFICO # 3

UNIDAD EXPERIMENTAL:

GAVETA C-3

CURVA DE SOBREVIVENCIA

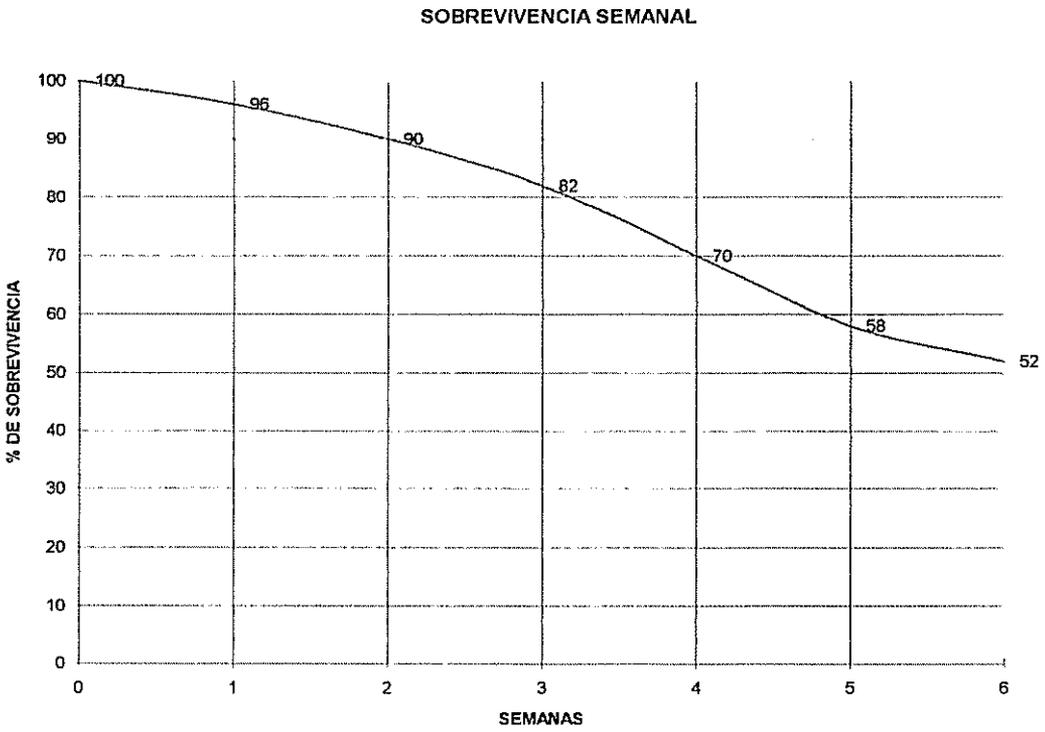


GRAFICO # 4

UNIDAD EXPERIMENTAL:

GAVETA C-4

CURVA DE SOBREVIVENCIA

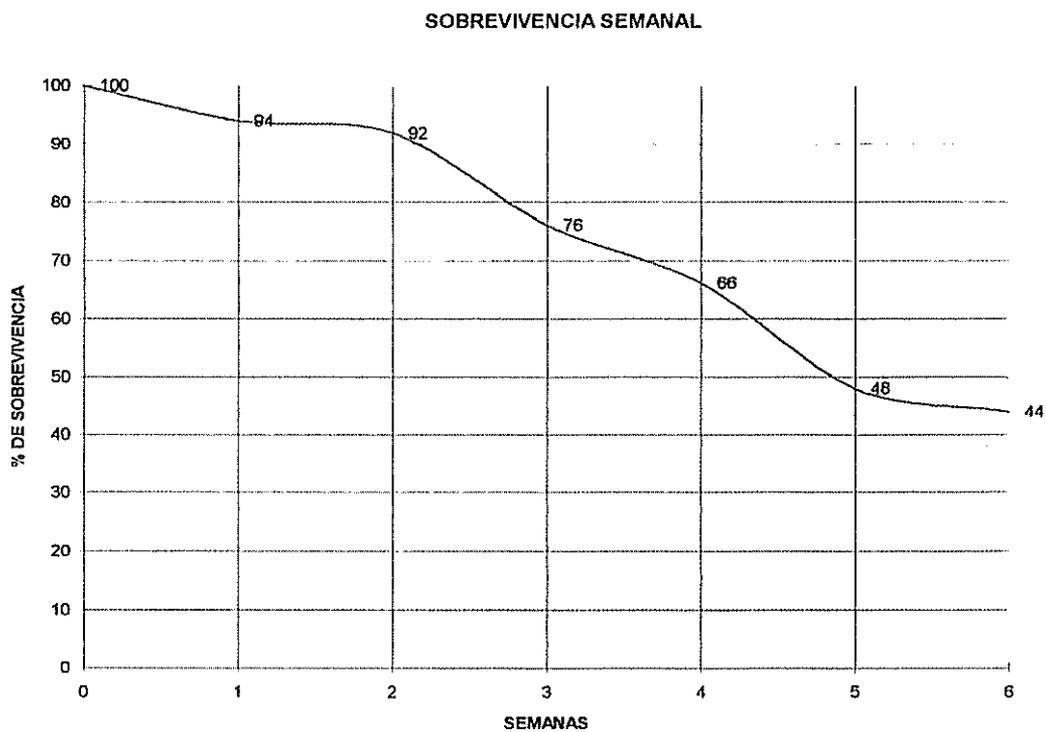
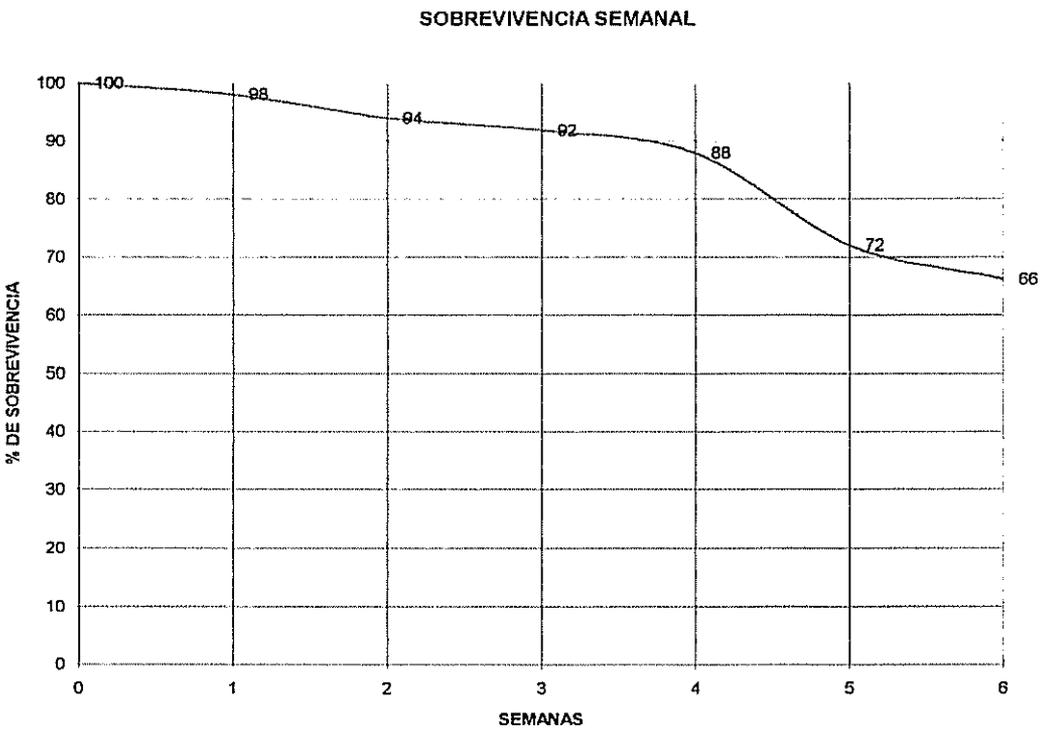


GRAFICO # 5

UNIDAD EXPERIMENTAL:**GAVETA T1-1*****CURVA DE SOBREVIVENCIA*****GRAFICO # 6**

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T1-2

CURVA DE SOBREVIVENCIA

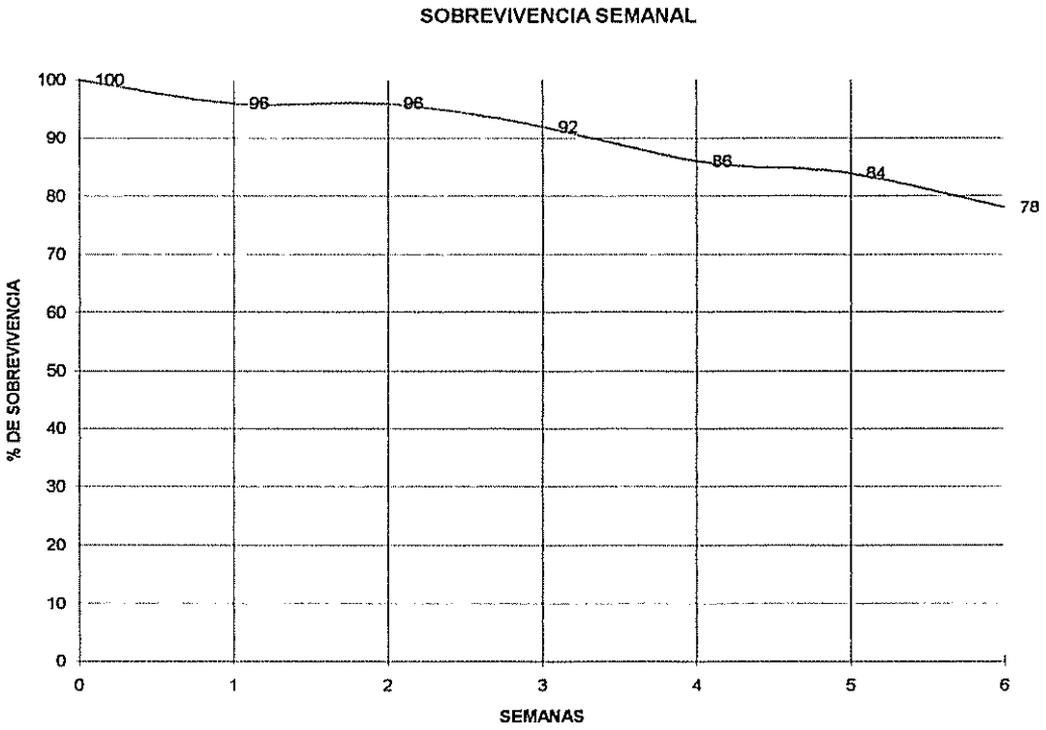
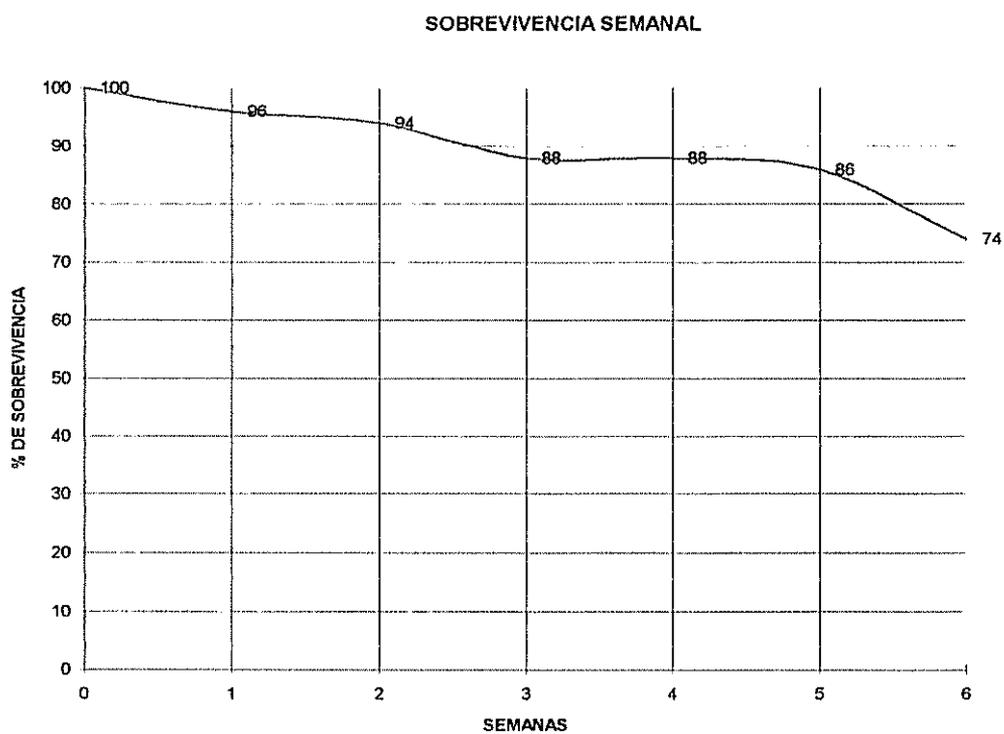
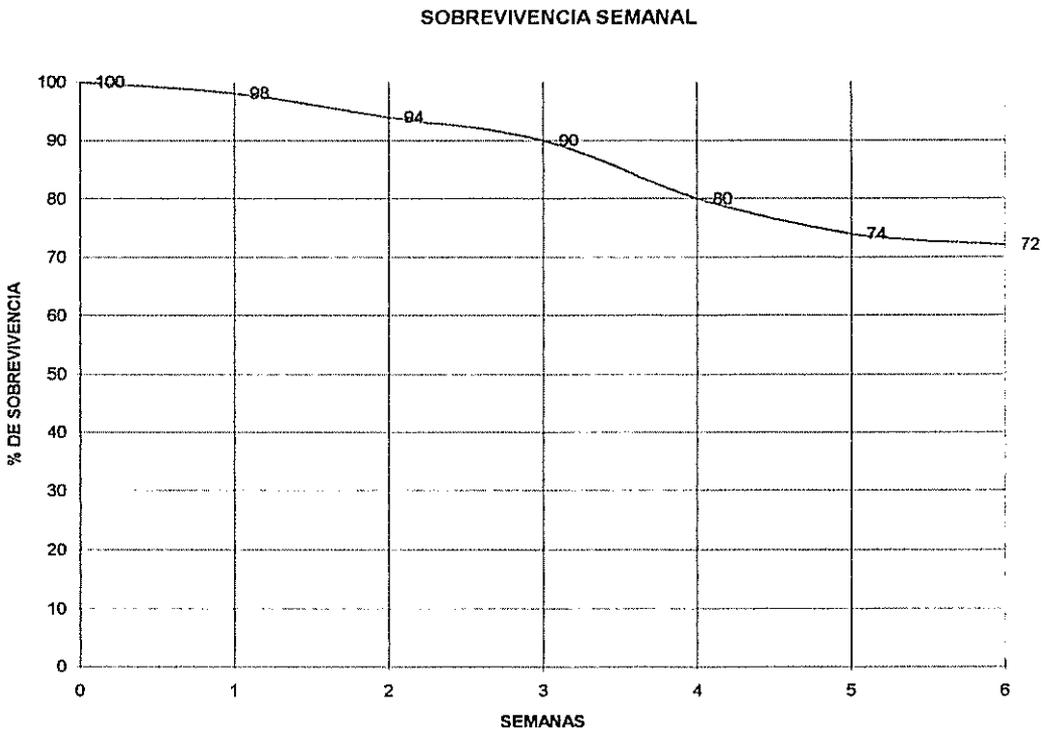
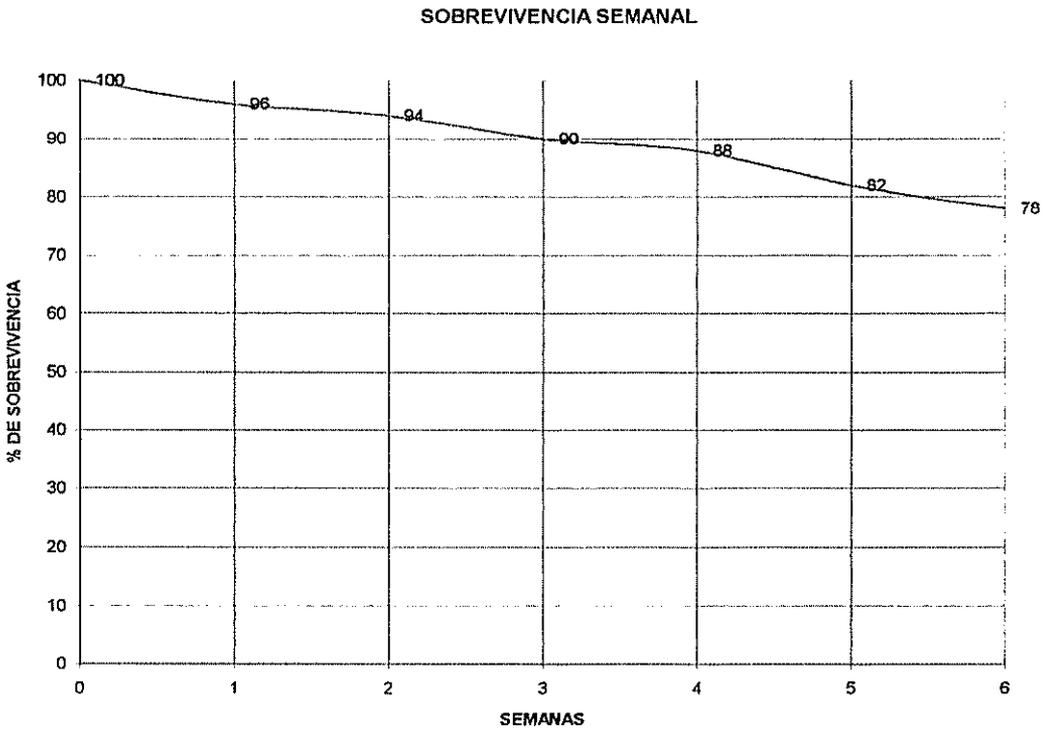


GRAFICO # 7

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T1-3*****CURVA DE SOBREVIVENCIA*****GRAFICO # 8**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T1-4*****CURVA DE SOBREVIVENCIA*****GRAFICO # 9**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T2-1*****CURVA DE SOBREVIVENCIA*****GRAFICO # 10**

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T2-2

CURVA DE SOBREVIVENCIA

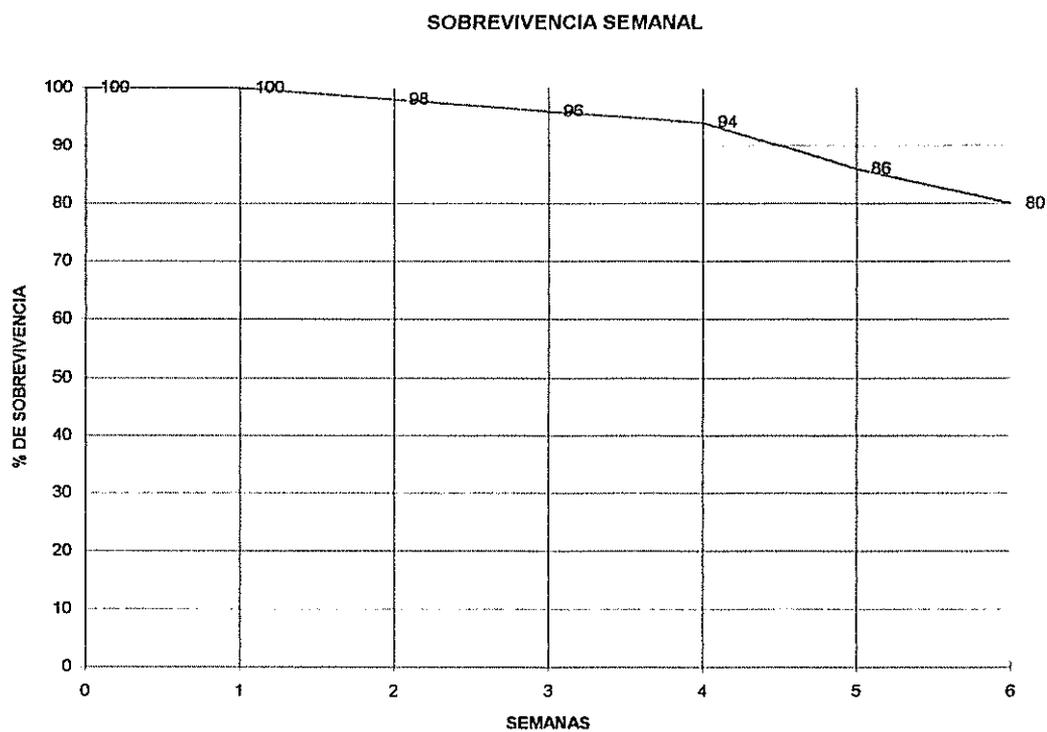


GRAFICO # 11

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T2-3

CURVA DE SOBREVIVENCIA

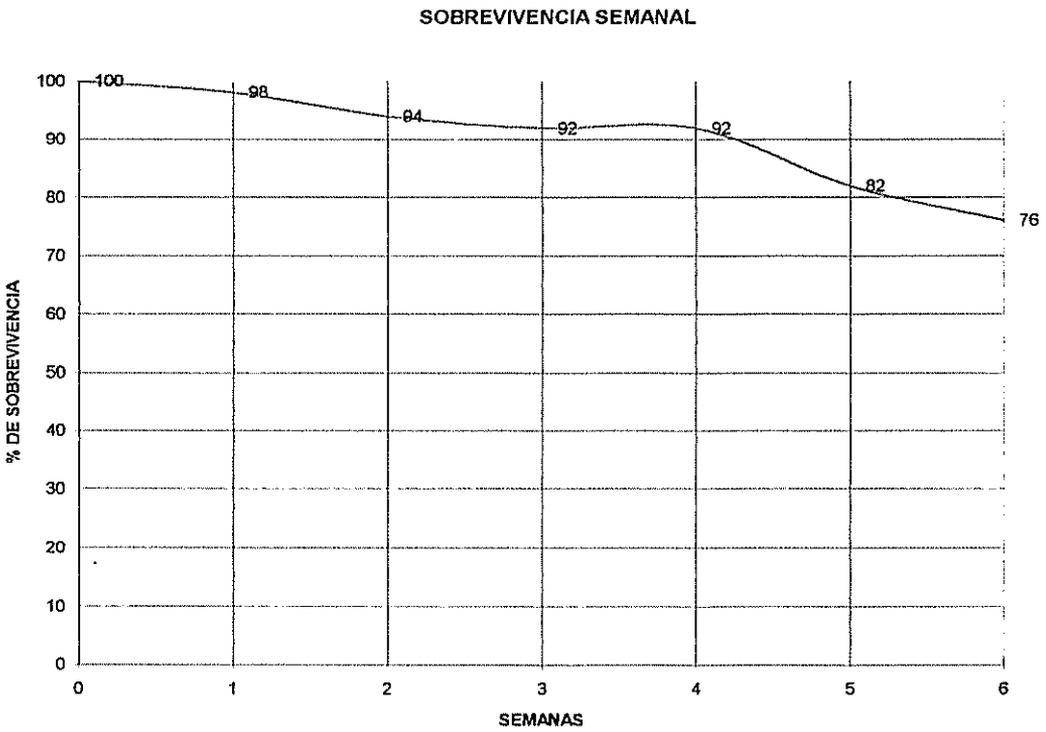
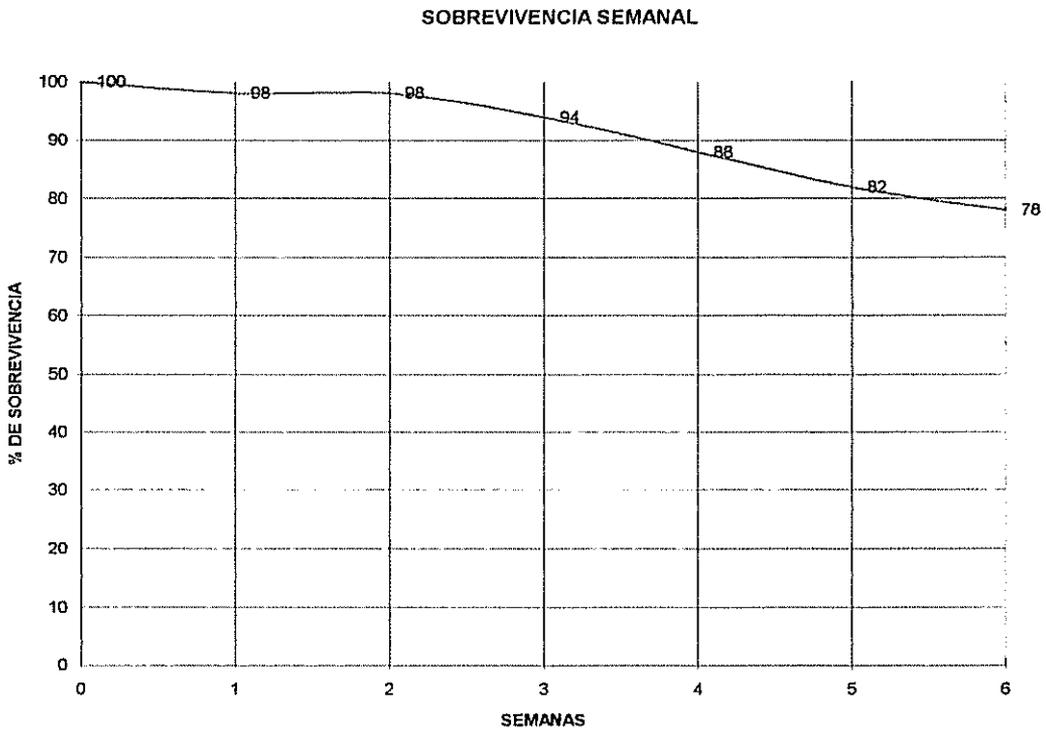
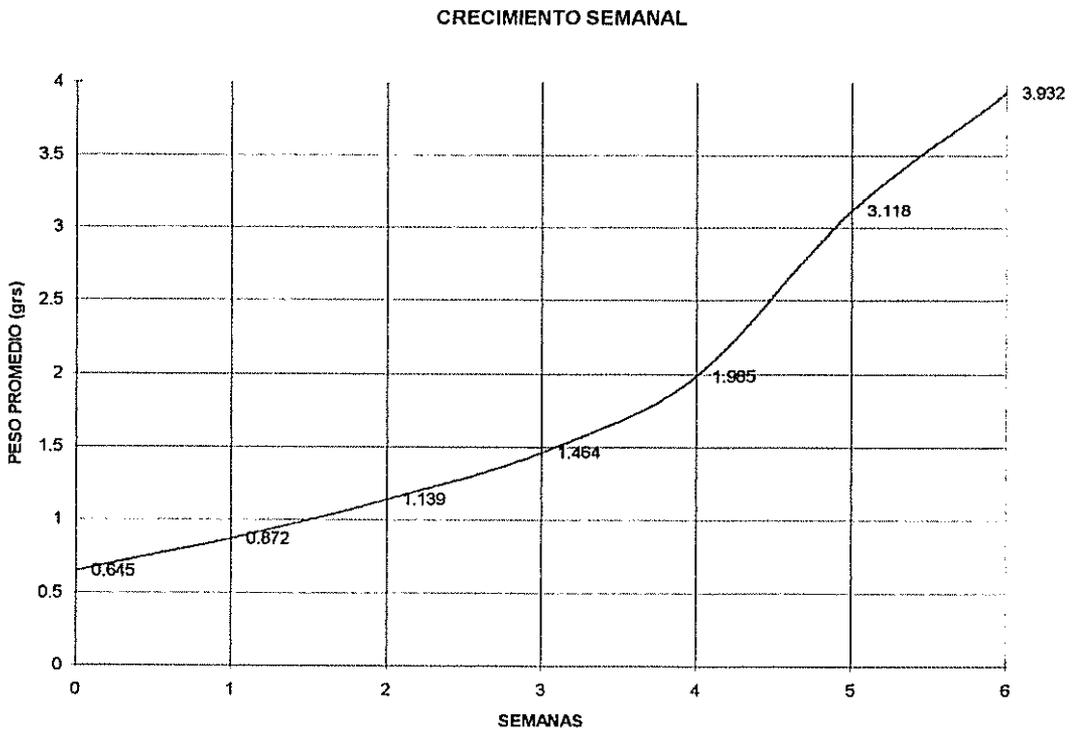
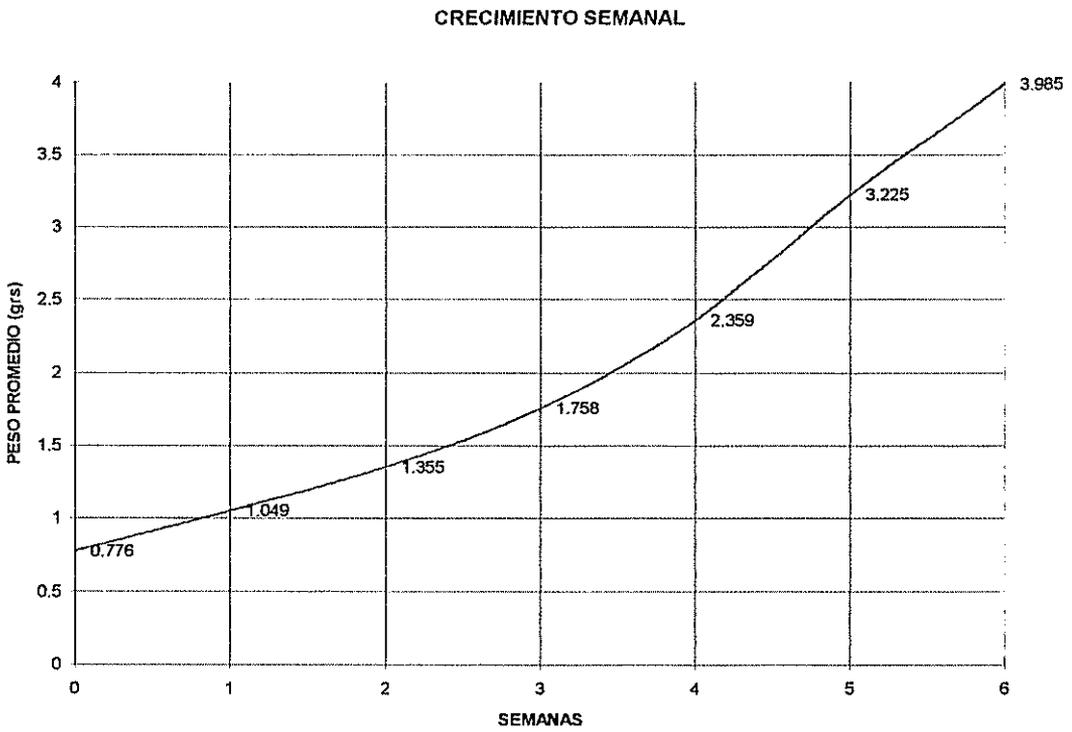
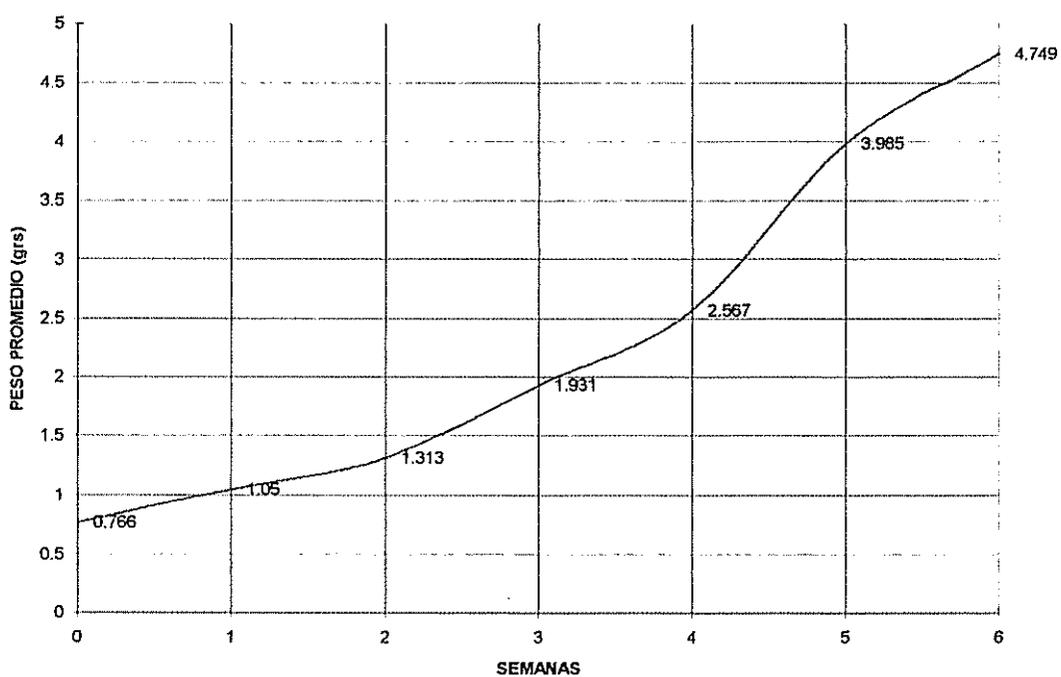


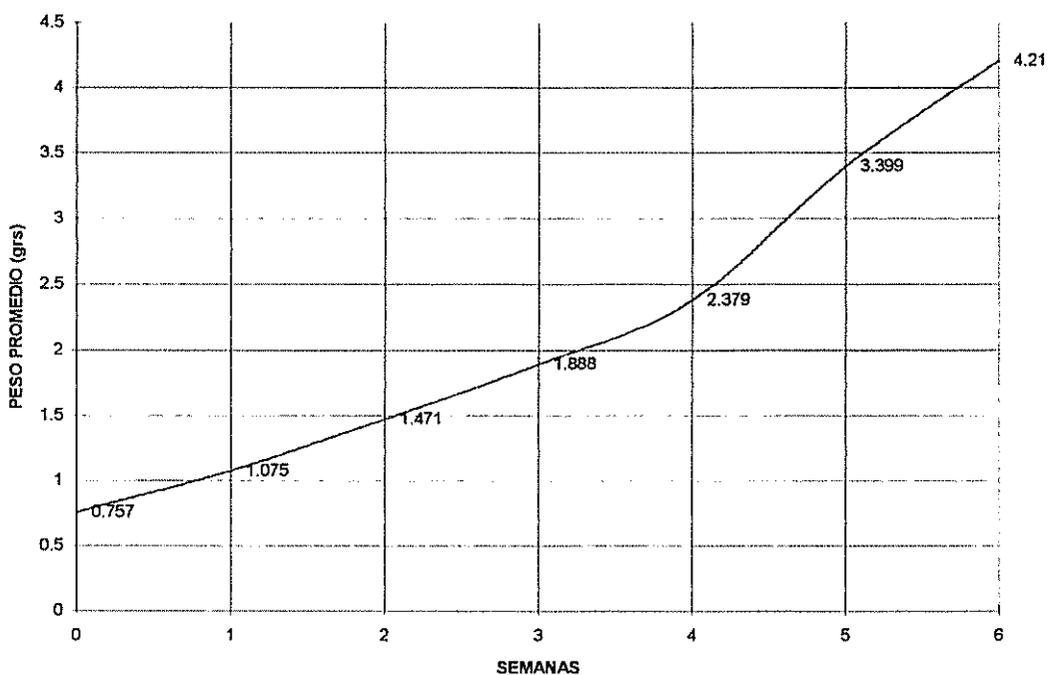
GRAFICO # 12

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T2-4*****CURVA DE SOBREVIVENCIA*****GRAFICO # 13**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA C-1*****CURVA DE CRECIMIENTO*****GRAFICO # 14**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA C-3*****CURVA DE CRECIMIENTO*****GRAFICO # 15**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA C-4*****CURVA DE CRECIMIENTO*****CRECIMIENTO SEMANAL****GRAFICO # 16**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T1-1*****CURVA DE CRECIMIENTO*****CRECIMIENTO SEMANAL****GRAFICO # 17**

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T1-2

CURVA DE CRECIMIENTO

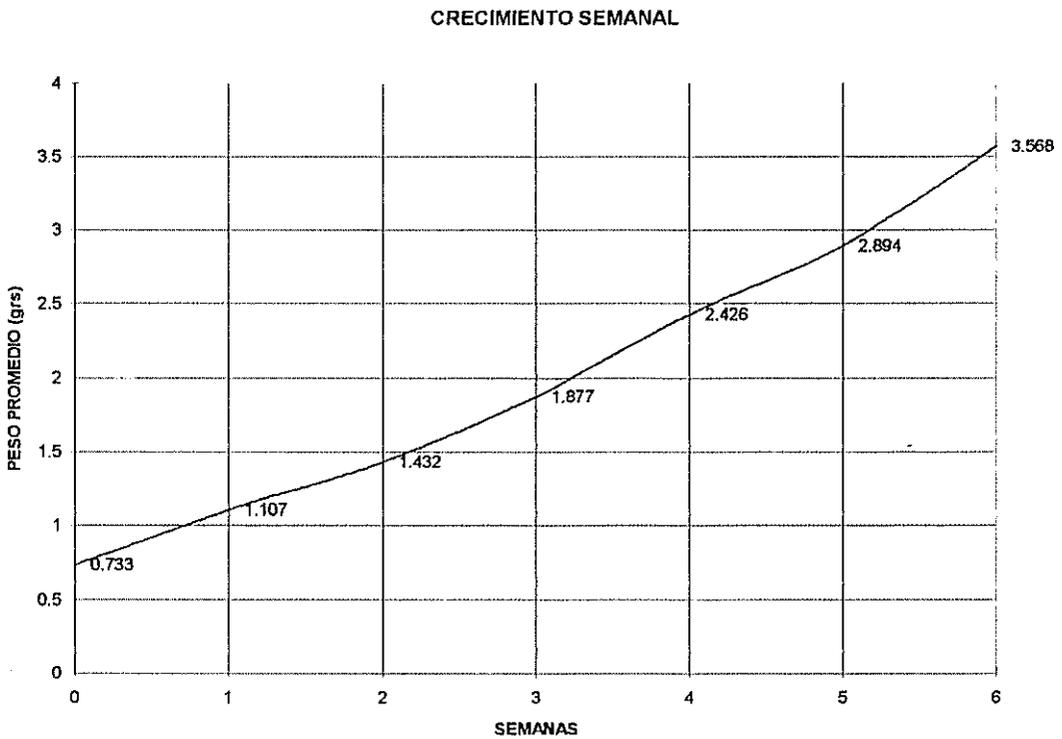


GRAFICO # 18

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T1-3

CURVA DE CRECIMIENTO

CRECIMIENTO SEMANAL

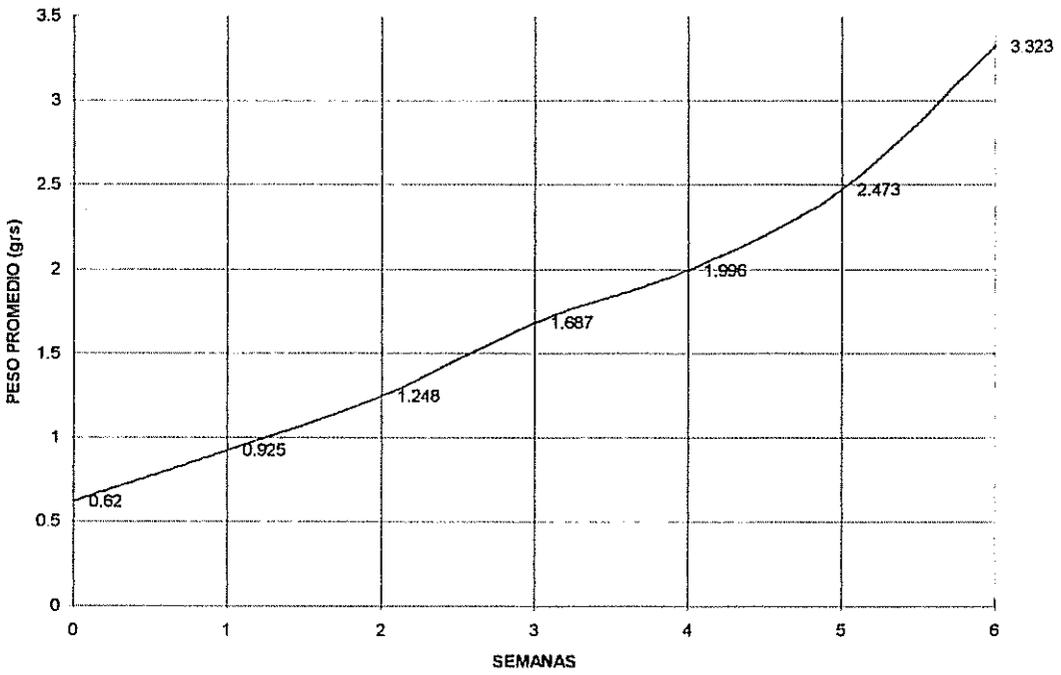


GRAFICO # 19

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T1-4

CURVA DE CRECIMIENTO

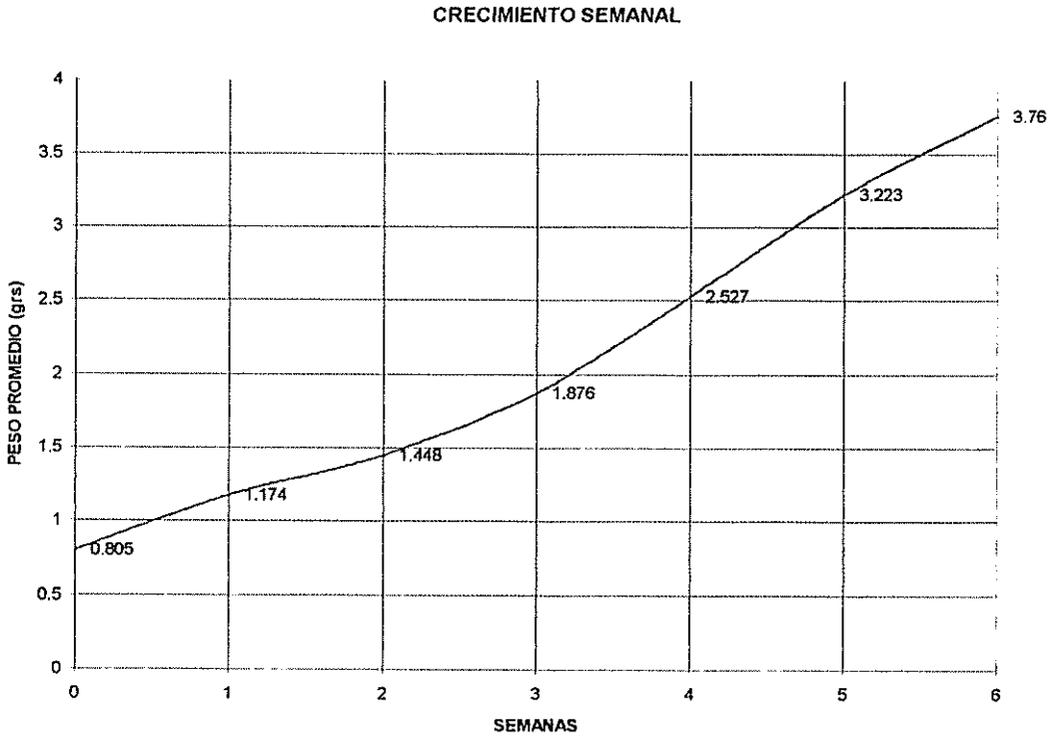
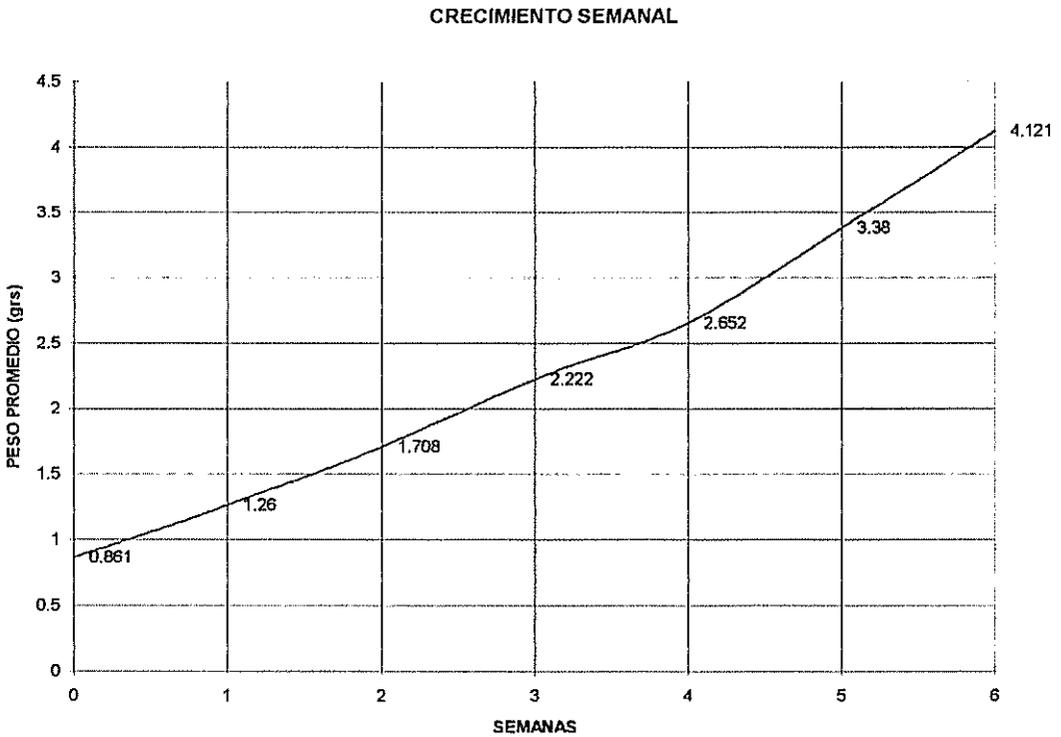
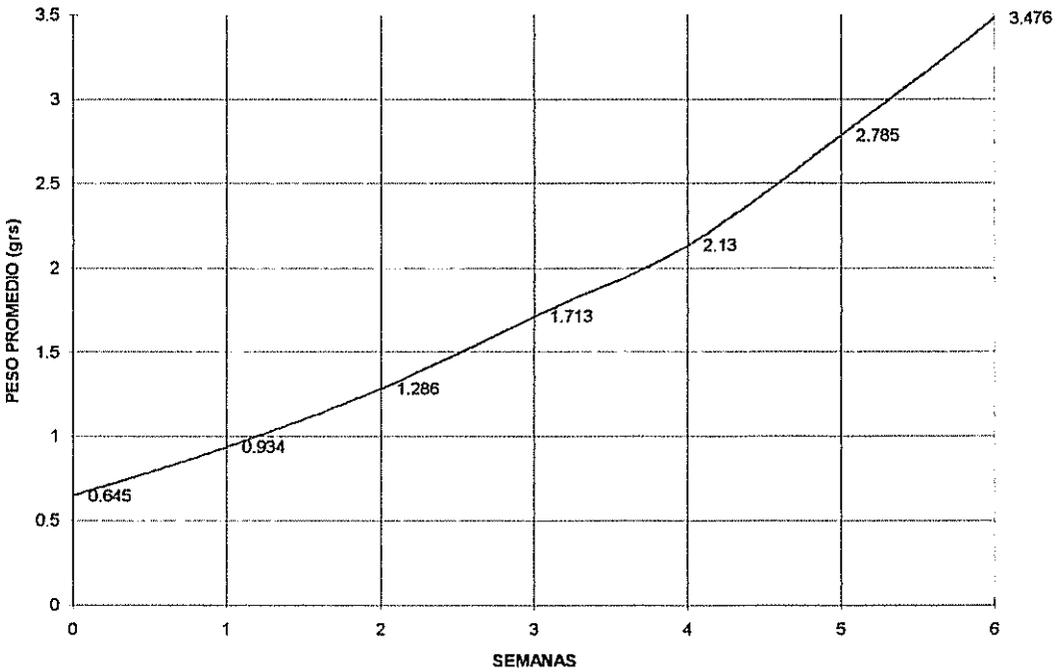
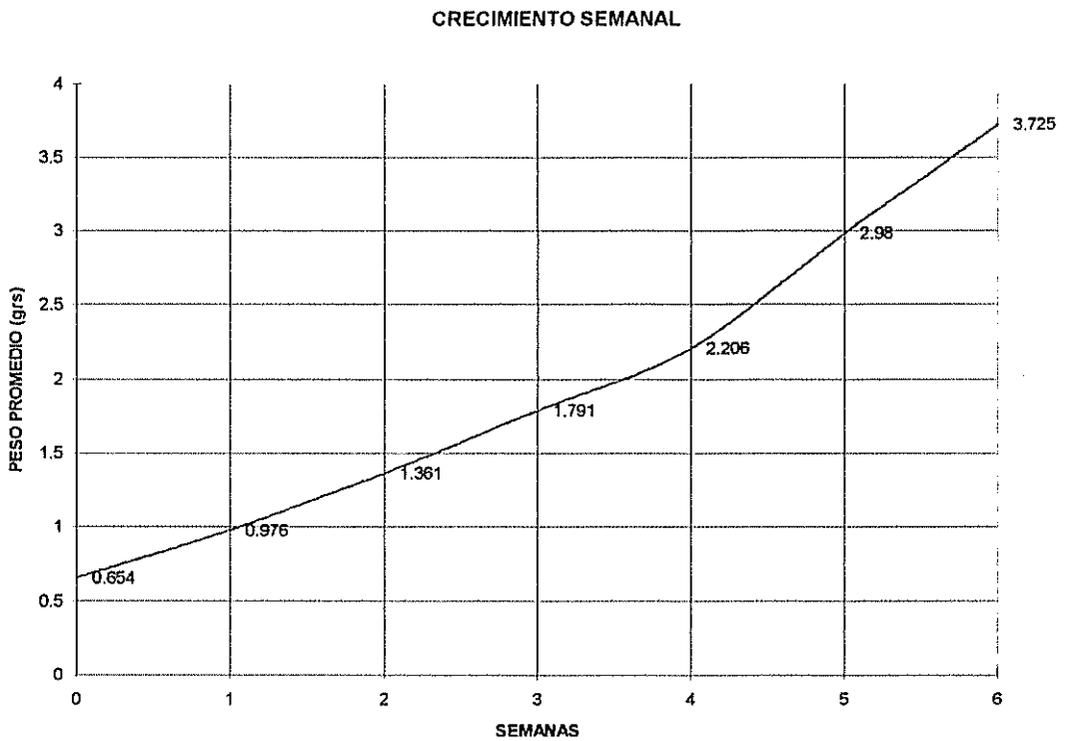


GRAFICO # 20

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T2-1*****CURVA DE CRECIMIENTO*****GRAFICO # 21**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T2-2*****CURVA DE CRECIMIENTO*****CRECIMIENTO SEMANAL****GRAFICO # 22**

UNIDAD EXPERIMENTAL :**GAVETA T2-3*****CURVA DE CRECIMIENTO*****GRAFICO # 23**

UNIDAD EXPERIMENTAL :

GAVETA T2-4

CURVA DE CRECIMIENTO

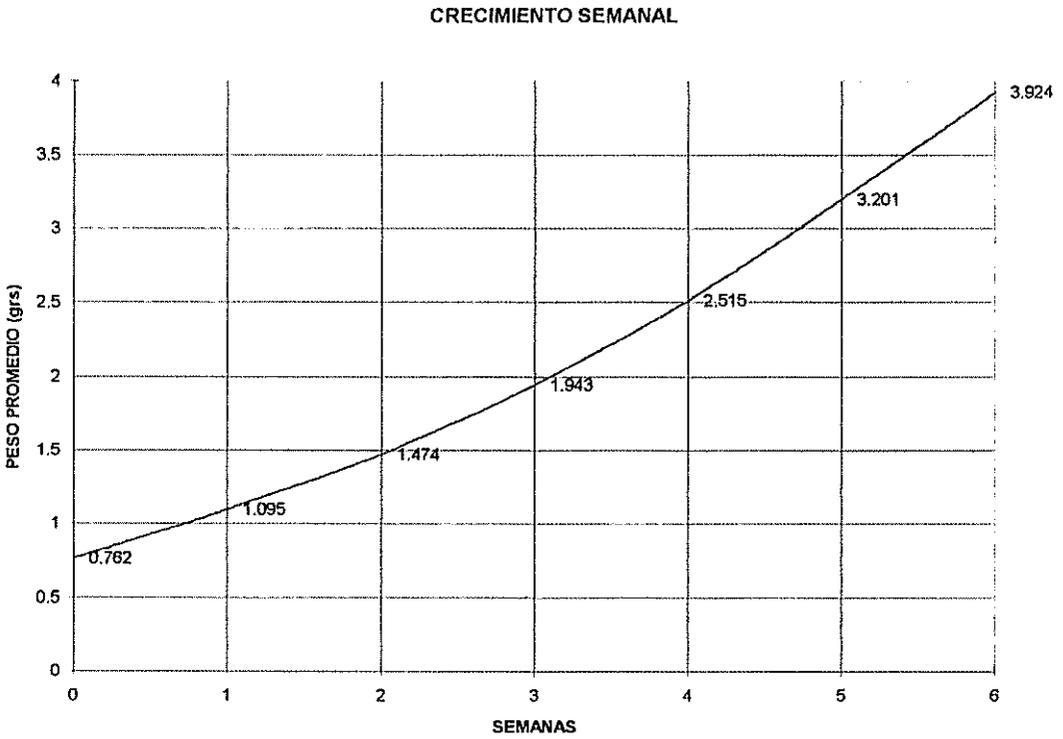


FIGURA # 24

TASAS DE SOBREVIVENCIA EN LA CULMINACION DEL ENSAYO

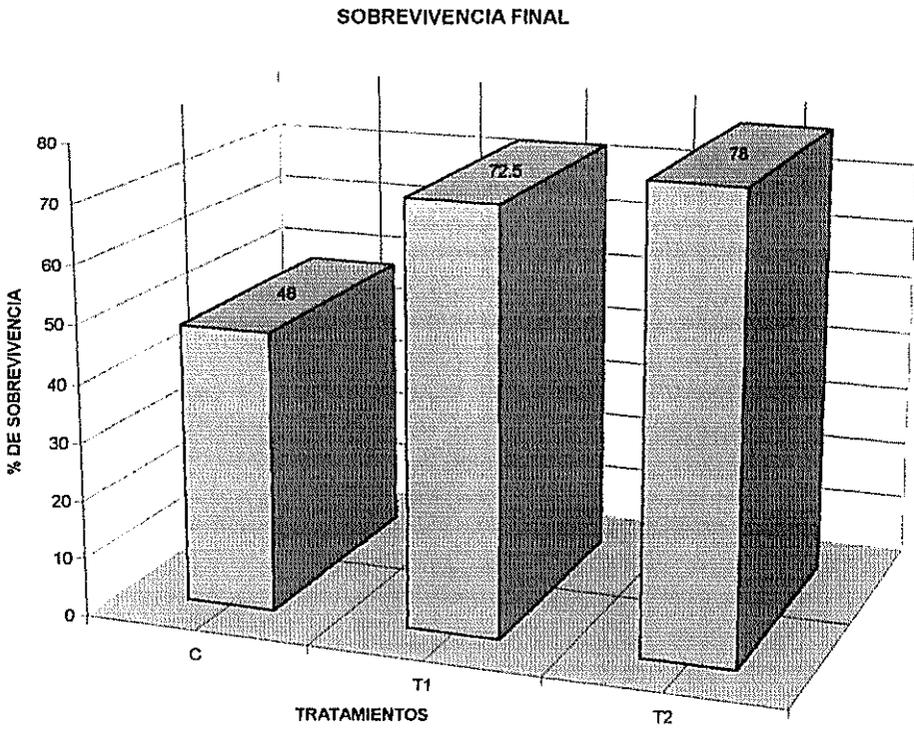


GRAFICO # 25

RESULTADOS DE PESOS PROMEDIOS EN LA CULMINACION DEL ENSAYO

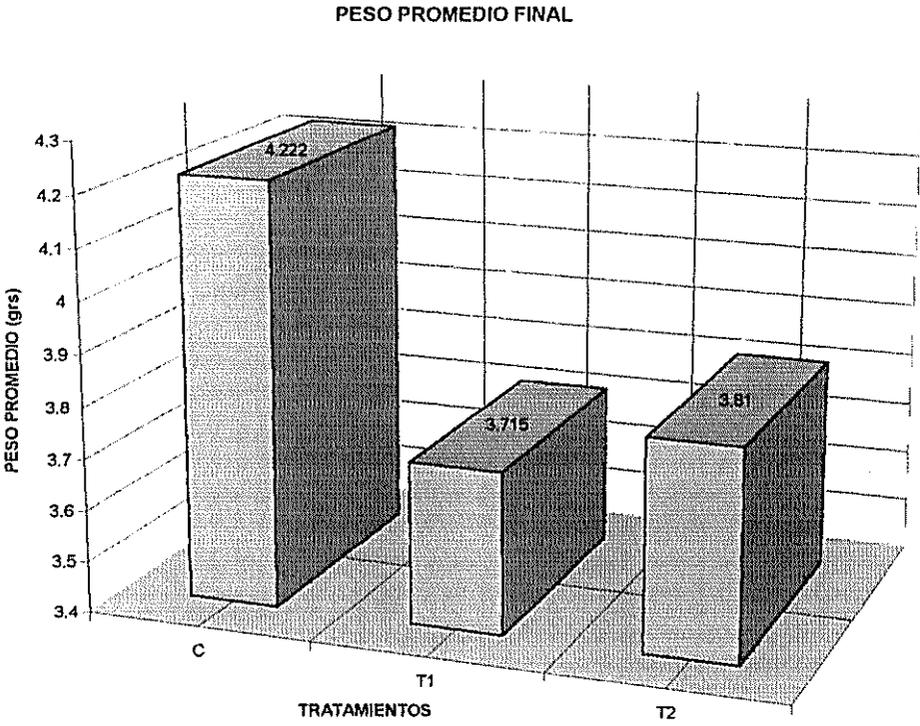


GRAFICO # 26

RESULTADOS DE BIOMASA EN LA CULMINACION DEL ENSAYO

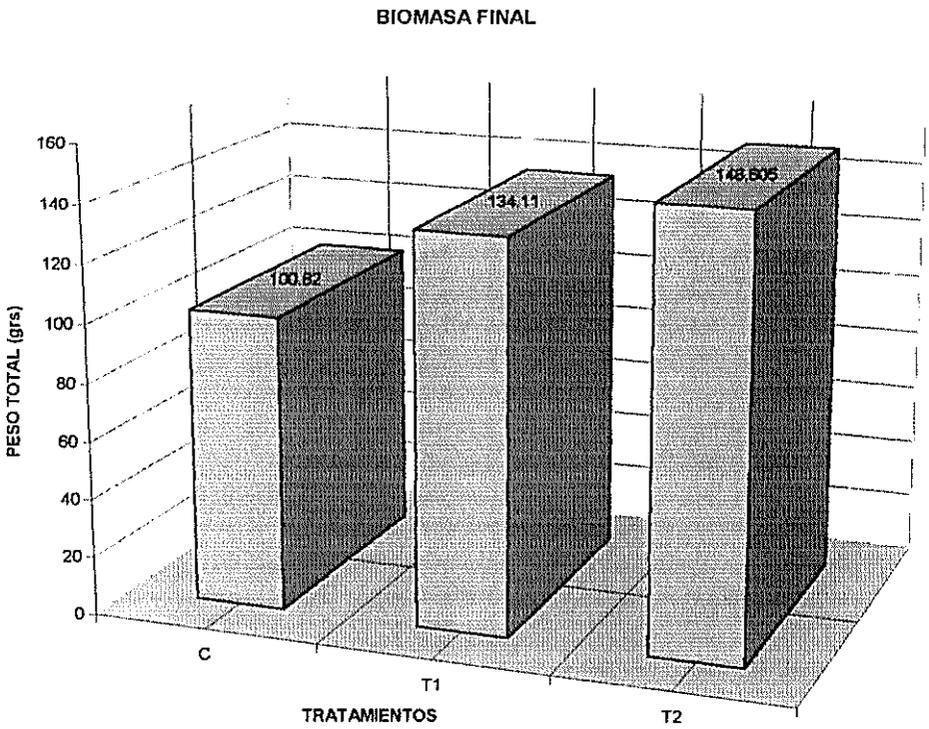


GRAFICO # 27

TASAS DE CONVERSION ALIMENTICIA EN LA CULMINACION DEL ENSAYO

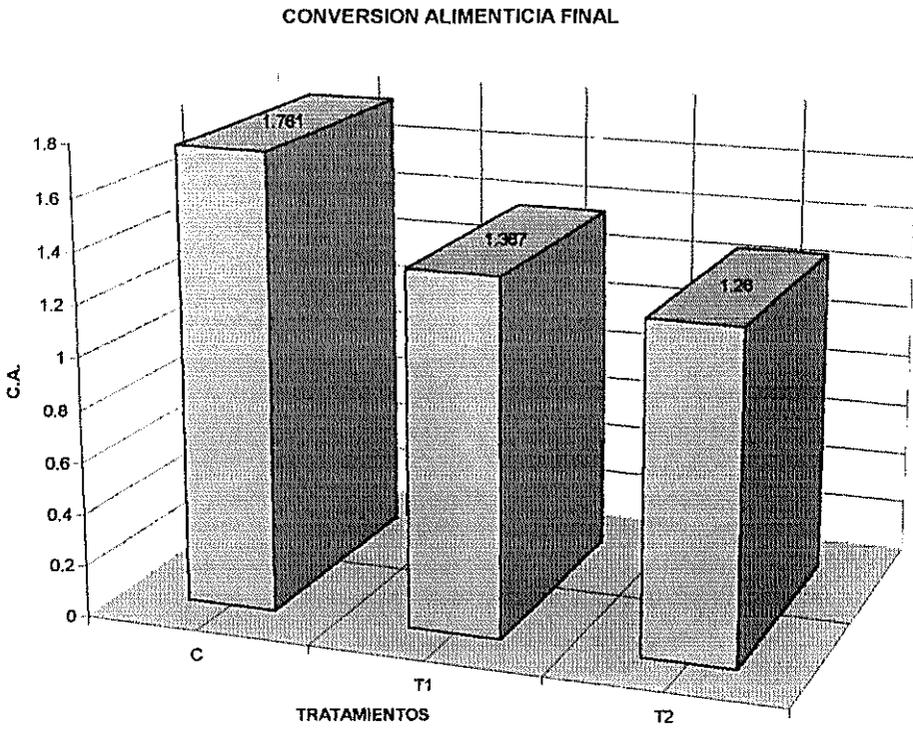


GRAFICO # 28

COMPOSICION DE LOS INGREDIENTES DE LA DIETA EXPERIMENTAL

COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS INGREDIENTES DE LA DIETA ENSAYADA

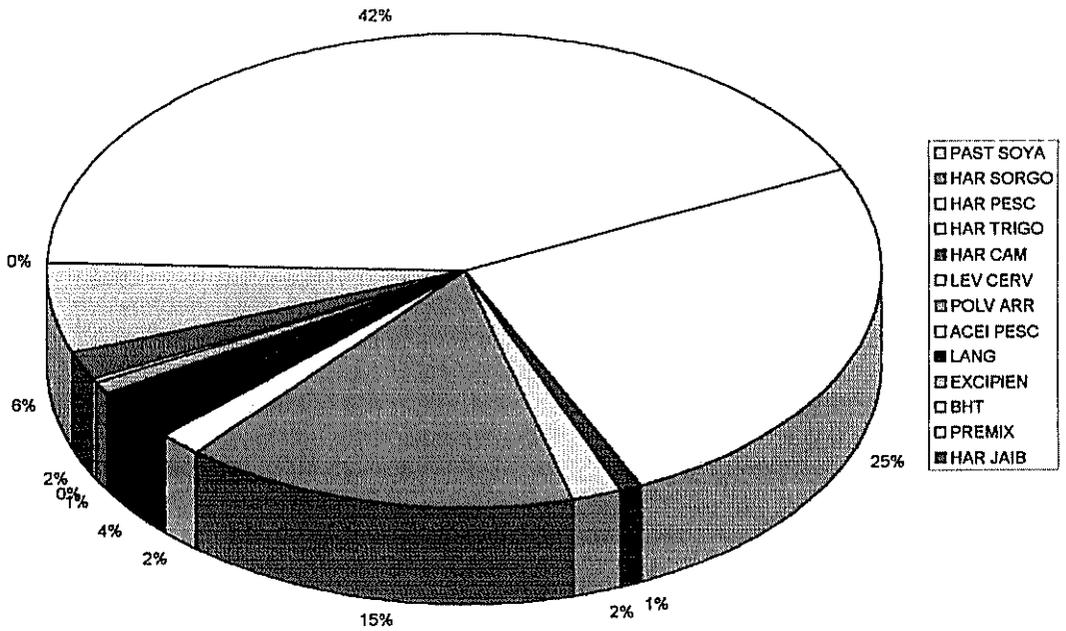


GRAFICO # 29

COMPOSICION NUTRICIONAL DE LA DIETA

EXPERIMENTAL

COMPOSICION NUTRICIONAL DE LA DIETA ENSAYADA

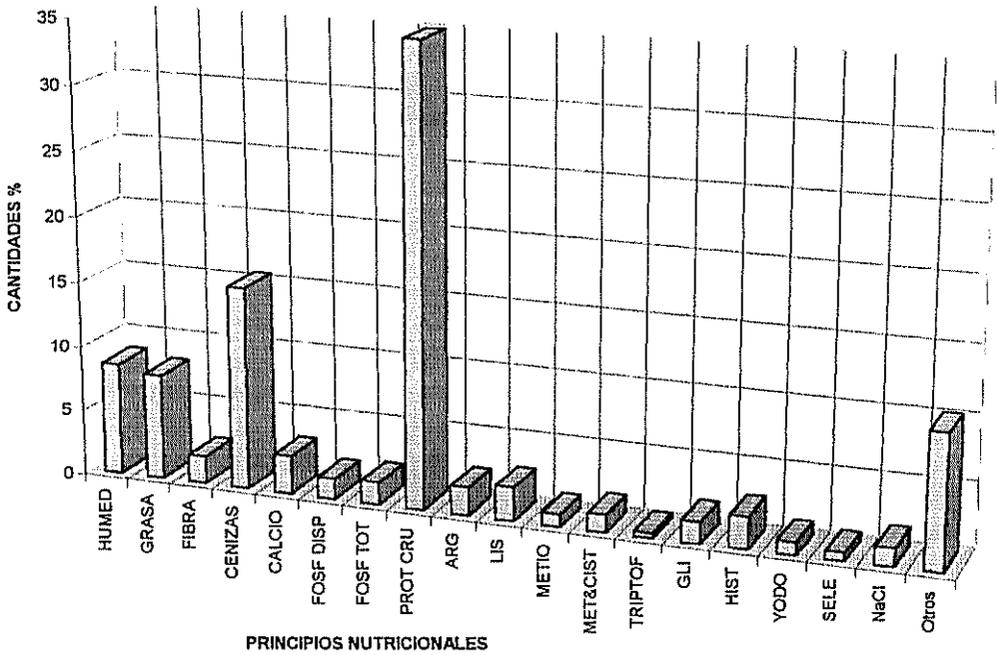
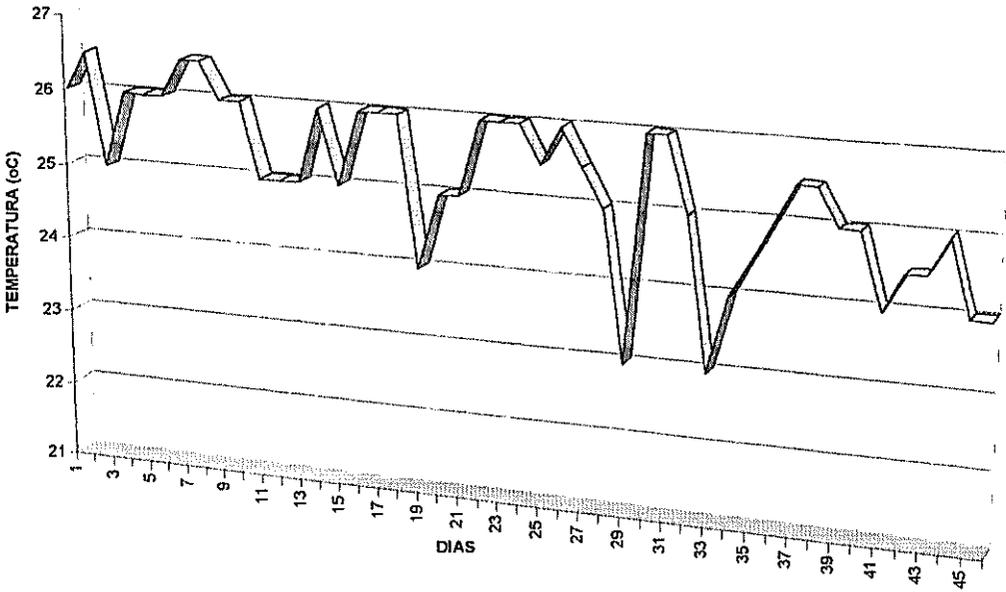


GRAFICO # 30

CURVA DE TEMPERATURA DIARIA

FLUCTUACION DIARIA DE TEMPERATURA

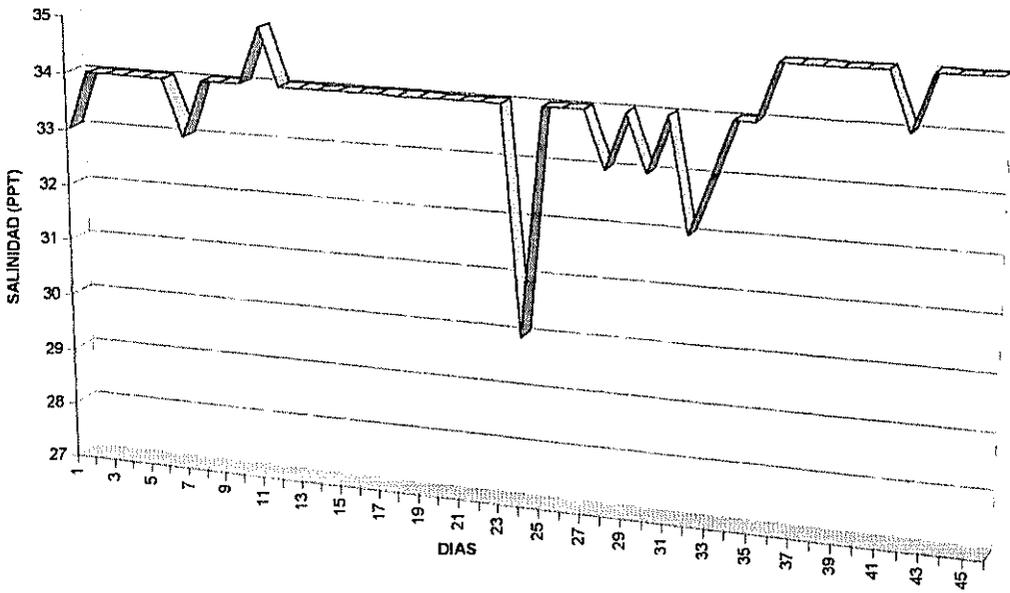


Nota: La muestra fue extraída de la toma de agua.

GRÁFICO # 31

CURVA DE SALINIDAD DIARIA

FLUCTUACION DIARIA DE SALINIDAD

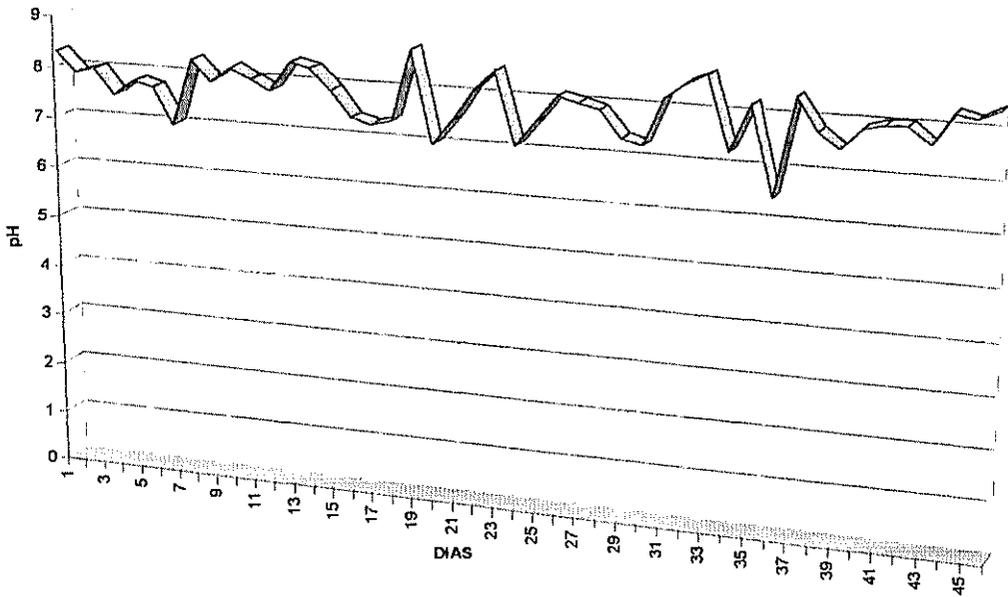


Nota: La muestra fue extraída de la toma de agua.

GRAFICO # 32

CURVA DE pH DIARIO

FLUCTUACION DIARIA DE pH



Nota: La muestra fue extraída de la toma de agua.

GRAFICO # 33

4.3.- ANALISIS ECONOMICO.

Realizamos un estudio económico comparativo (Frank Knight, 1981); acerca del costo de investigar la producción de un juvenil para cada tratamiento, bajo nuestras condiciones experimentales, a fin de obtener conclusiones económicas, y conocer cual de las dietas resultaba mas conveniente.

Para obtener este costo individual, utilizamos la sobrevivencia media obtenida en cada tratamiento; es cuestión de dividir el costo total para el número de juveniles sobrevivientes en cada tratamiento. Los valores considerados en este análisis fueron los vigentes en el mercado, especialmente en la provincia de Manabí y más concretamente en la ciudad de Manta, en esa época.

Para el efecto de este estudio solo consideramos los costos de insumos y de materia prima, más no consideramos costos fijos, sueldos y salarios, costos de mantenimiento y reparación, costos administrativos, transporte, alquiler y mantenimiento de equipos, porque van a variar significativamente de un lugar a otro o de una ciudad a otra. La manera como se utilizaron estos insumos lo explicamos detalladamente en el diseño del protocolo del experimento. Las tablas # 37, # 38 y # 39 muestran los resultados para cada tratamiento .

TABLA XXXIV
COSTOS DE INVESTIGACION Y PRODUCCION DE UN JUVENIL POR
TRATAMIENTO
CONTROL(0PPM)

INSUMOS	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (SUCRES)	COSTO (SUCRES)
COLORO	0.55 KG	9000	4950
TIOSULFATO DE SODIO	0.3 KG	3000/KG	900
EDTA	0.06 KG	9500/KG	570
ARGENTYNE	0.3 LTS	40000/LT	12000
PAPEL TOALLA	1	2500/ROLLO	2500
PAPEL ALUMINIO	1	6000/ROLLO	6000
ALCOHOL	0.3 GALONES	10000/GALON	3000
FUNDAS	100 FDS	1000/CIENTO	1000
AGUA SALADA	3.3 TANQUEROS DE 2 TN	5000/TANQUERO DE 2TN	16500
AGUA DULCE	0.3 TANQUEROS DE 6 TN	40000/TANQUERO DE 6 TN	12000
ALIMENTO(0PPM)	0.340602 KG	1514/KG	515.67
JUVENILES	150 J	10/JUVENIL	1500
COSTO TOTAL			61435.67

COSTO TOTAL / SOBREVIVENCIA = COSTO DE PRODUCCION DE UN JUVENIL.

$61435 / 72 = 853.27$ SUCRES/JUVENIL= COSTO MEDIO.

TABLA XXXV

COSTOS DE INVESTIGACION Y PRODUCCION DE UN JUVENIL POR TRATAMIENTO.

TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)

INSUMOS	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (SUCRES)	COSTO (SUCRES)
COLORO	0.725 KG	9000	6525
TIOSULFATO DE SODIO	0.35 KG	3000/KG	1050
EDTA	0.08 KG	9500/KG	760
ARGENTYNE	0.35 LTS	40000/LT	14000
PAPEL TOALLA	1.5 ROLLOS	2500/ROLLO	3750
PAPEL ALUMINIO	1.5 ROLLOS	6000/ROLLO	9000
ALCOHOL	0.35 GALONES	10000/GALON	3500
FUNDAS	100 FDS	1000/CIENTO	1000
AGUA SALADA	4.35 TANQUEROS DE 2 TN	5000/TANQUERO DE 2TN	21750
AGUA DULCE	0.35 TANQUEROS DE 6 TN	40000/TANQUERO DE 6 TN	14000
ALIMENTO(9.7 PPM).	0.534546 KG	1514/KG	809.30+32.625= 841.92
JUVENILES	200 J	10/JUVENIL	2000
COSTO TOTAL			78176.92

COSTO TOTAL / SOBREVIVENCIA = COSTO DE PRODUCCION DE UN JUVENIL.

$78176.92 / 145 = 539.15$ SUCRES / JUVENIL. = COSTO MEDIO.

TABLA XXXVI

COSTOS DE INVESTIGACION Y PRODUCCION DE UN JUVENIL POR TRATAMIENTO.

TRATAMIENTO 2 (22 PPM)

INSUMOS	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO (SUCRES)	COSTO (SUCRES)
CLORO	0.725 KG	9000	6525
TIOSULFATO DE SODIO	0.35 KG	3000/KG	1050
EDTA	0.08 KG	9500/KG	760
ARGENTYNE	0.35 LTS	40000/LT	14000
PAPEL TOALLA	1.5 ROLLOS	2500/ROLLO	3750
PAPEL ALUMINIO	1.5 ROLLOS	6000/ROLLO	9000
ALCOHOL	0.35 GALONES	10000/GALON	3500
FUNDAS	100 FDS	1000/CIENTO	1000
AGUA SALADA	4.35 TANQUEROS DE 2 TN	5000/TANQUERO DE 2TN	21750
AGUA DULCE	0.35 TANQUEROS DE 6 TN	40000/TANQUERO DE 6 TN	14000
ALIMENTO(22PPM)	0.56586 KG	1514/KG	856.71+76.125= 932.83
JUVENILES	200 J	10/JUVENIL	2000
COSTO TOTAL			78267.83

COSTO TOTAL / SOBREVIVENCIA = COSTO DE PRODUCCION DE UN JUVENIL.
 $78267.83 / 156 = 501.71$ SUCRES / JUVENIL.=COSTO MEDIO.

COSTO DE PRODUCCION E INVESTIGACION DE UN JUVENIL ,PARA CADA TRATAMIENTO

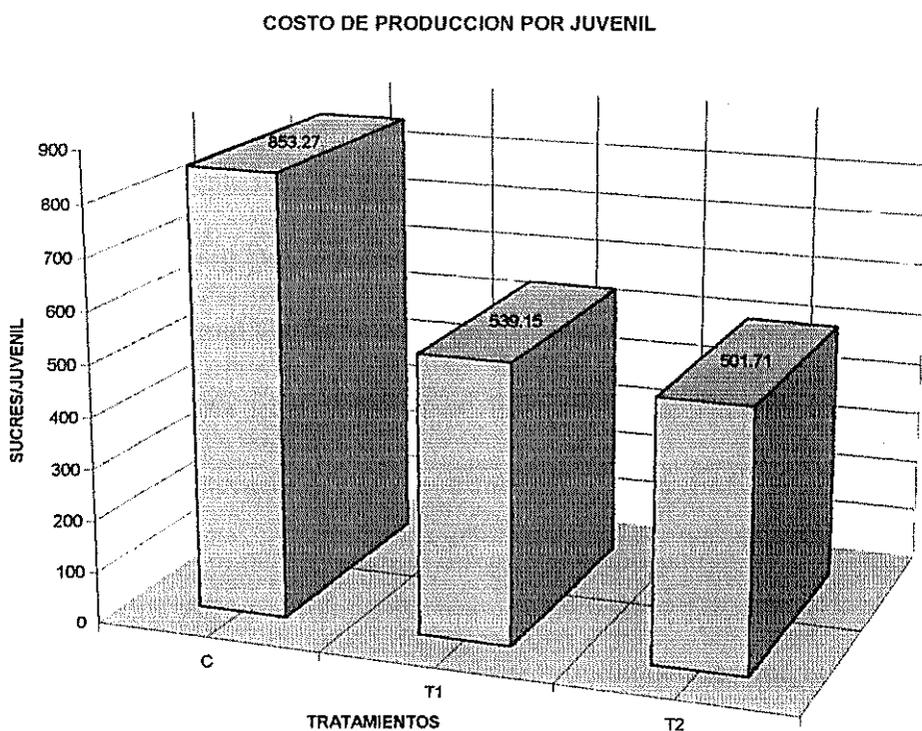


GRAFICO # 34

4.4.- ANALISIS ESTADISTICO.

Realizamos ANOVAS de una Vía al 95% de confianza para evaluar la sobrevivencia, el peso promedio y la conversión alimenticia (William G. Cochran ; and Gertrude M. Cox); el mismo que lo realizamos para todas las semanas, es decir con las tablas de resultados semanales, desde la primera semana hasta la semana final.

Simultáneamente realizamos un Análisis de Rangos Múltiples para los mismos parámetros; bajo las mismas restricciones que el ANOVA de una vía (William G. Cochran ; and Gertrude M. Cox), semanalmente desde la primera semana, hasta la semana final del ensayo. El Análisis de Rangos Múltiples, es una prueba más específica, que la utilizamos con la finalidad de establecer un contraste lógico, para evaluar la diferencia significativa entre los tratamientos.

El razonamiento fundamental para la aplicación de este tipo de metodología es la de establecer un patrón de evaluación ordenado del ensayo y conocer en que punto (semana), la hipótesis nula es rechazada.

No obstante el dato en la semana final es de mayor importancia en las tres variables evaluadas, ya que es en la cual se concluye la aceptación o negación

de la hipótesis nula y por tanto se evalúa realmente el efecto en el experimento (Irwin Miller, John E Freund and Richard A Johnson ,1992).

Elaboramos una tabla por semana, desde la primera hasta la semana final, en la que se incluyen simultáneamente un ANOVA y un Análisis de Rangos Múltiples tanto para los resultados de peso promedio, como lo presentamos en la tablas: # 40, # 41, # 42, # 43, # 44 y # 45, como para el número de organismos sobrevivientes como lo argumentamos en las tablas: # 46, # 47, # 48, # 49, # 50 y # 51. De los resultados de la semana final de las tasas de conversión alimenticia elaboramos similarmente el mismo diseño de tabla, como lo denotamos en la tabla # 52.

Elaboramos tablas de medias para los datos de: sobrevivencia final , conversión alimenticia, peso promedio inicial y final y biomasa inicial y final, tal como lo argumentamos en las tablas # 53, # 54, # 55, # 56, # 57 y # 58.

4.5.- RESULTADOS.-

- 1.- En la sobrevivencia se observó diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control, con un nivel de confianza al 95%. El mejor porcentaje de sobrevivencia lo obtuvimos con el tratamiento 2 (78%), seguido por el tratamiento 1 (72.5 %) y por último el control con la menor sobrevivencia (48%).
- 2.- No se presentó diferencia significativa alguna del peso promedio entre los tratamientos y el control, con un nivel de confianza al 95%. El peso promedio mas alto se lo obtuvo con el control (4.22 grs), seguido por el tratamiento 2 (3.81grs) y el tratamiento 1 (3.71grs) consecutivamente.
- 3.- Se presentó diferencia significativa de la conversión alimenticia C.A entre los tratamientos y el control, con un nivel de confianza al 95%. La menor tasa de C.A correspondió al tratamiento 2 (1.260), la mayor tasa de C.A correspondió al control (1.761), la C.A del tratamiento 1 fue de (1.360).
- 4.- El menor costo de producir un juvenil corresponde al tratamiento 2 (S/ 501.71/Juv), seguido por el tratamiento 1 (S/ 539.15/juv) y por último, al control le correspondió el costo medio mas elevado (S/ 853.27/ Juv).

5.- La comparación con las tablas bioquímicas clásicas utilizando las mini reacciones de la cintas API 20 E, nos dio como resultado una excelente identificación de las 4 cepas utilizadas en este estudio:

La cepa Verde luminiscente fue identificada como Vibrio vulnificus.

La cepa Verde no luminiscente se la identifico como Vibrio sp.

La cepa Amarilla cremosa fue identificada como Vibrio alginolyticus.

La cepa Amarilla plana se la identifico como Aeromona sp.

6.- El MIC para el Vibrio vulnificus fue de 4ppm, no obstante en la concentración de 3.003 ppm se presentó una condición de crecimiento bacteriano muy leve, pequeñísimas colonias crecieron aisladamente para finalmente inhibir su crecimiento en 4ppm.

El MIC para el Vibrio sp fue de 2ppm.

El MIC para el Vibrio alginolyticus fue de 10 ppm; en la concentración de 9.009 ppm se presentó un crecimiento bacteriano muy leve, para finalmente inhibir su crecimiento en 10ppm.

El MIC para Aeromona sp fue de 4ppm; en la concentración de 3.003 se presentó crecimiento bacteriano muy leve .

FOTO # 1



VISTA DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

FOTO # 2



VISTA DE LOS JUVENILES EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

FOTO # 3**PESAJE DE LA DIETA**

FOTO # 4*EXTRACCION DE MUESTRAS BACTERIOLOGICAS INTEGRADAS*

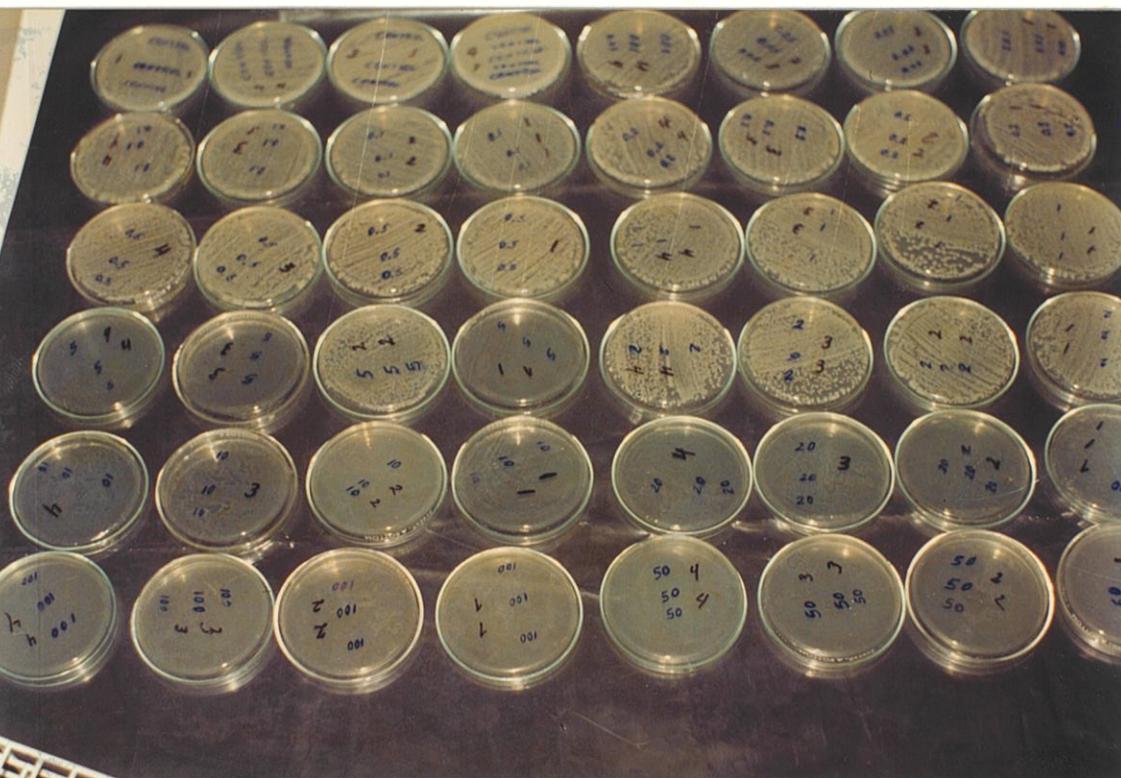
FOTO # 5*PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD - AGAR - DILUCION*

FOTO # 6*PREPARACION DE LAS DILUCIONES*

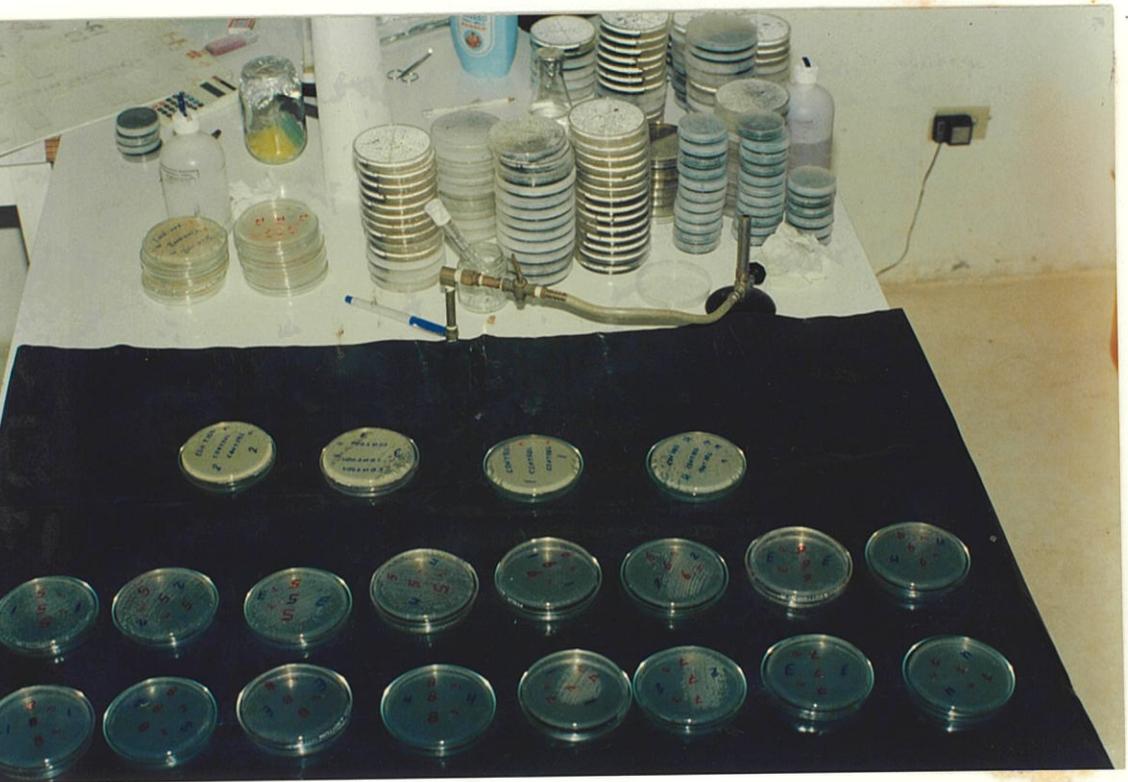
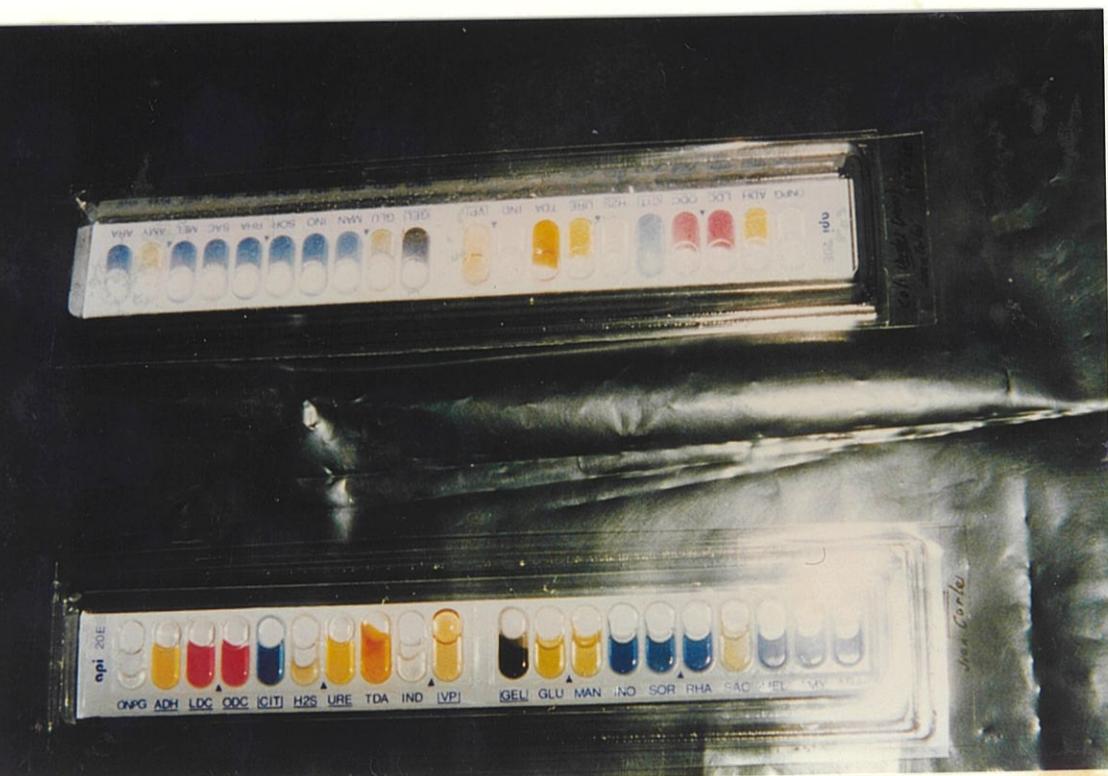
FOTO # 7**PREPARACION DEL MEDIO CON EL FLAVOFOSFOLIPOL**

FOTO # 8***CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS - OBTENCION DE CEPAS***

FOTO # 9



SISTEMA API 20E

FOTO # 10



TINCION DE GRAM

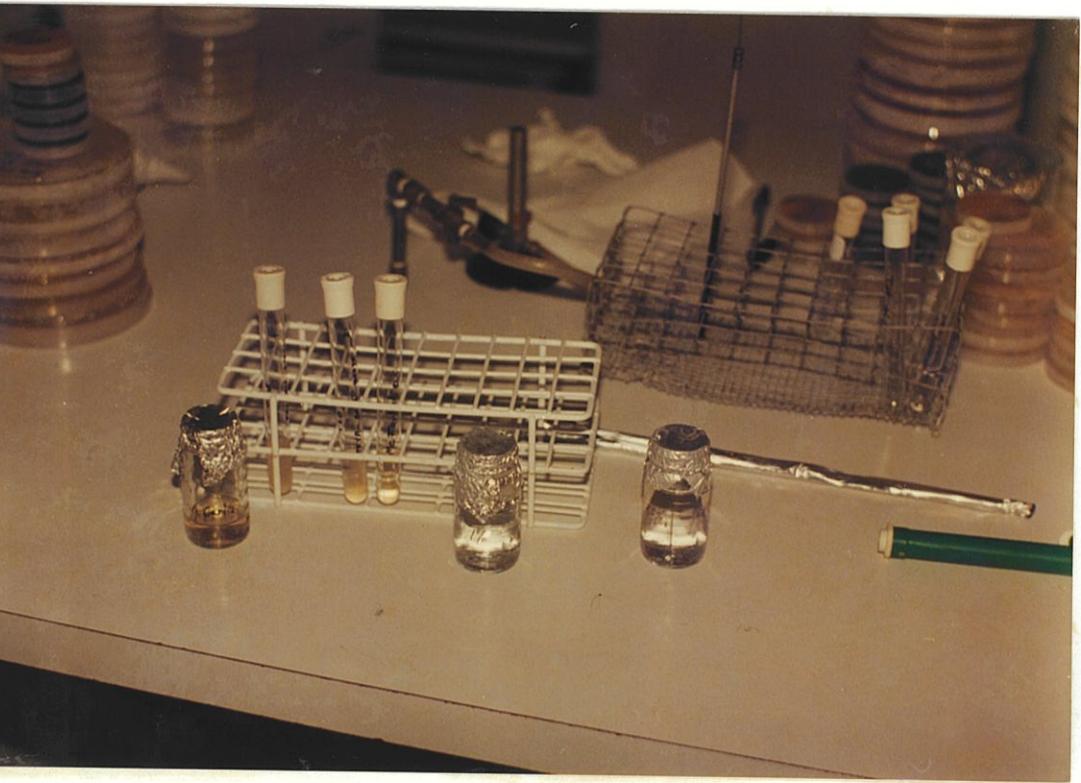
FOTO # 11*PREPARACION DEL INOCULO*

FOTO # 12*INOCULACION DE LA CEPA DEL MIC*

FOTO # 13*INCUBACION DE LOS PLATOS DEL MIC*

FOTO # 14*LECTURA DE LOS PLATOS DEL MIC*

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Después de haber finalizado este trabajo experimental de tesis, bajo las condiciones experimentales en las que fue sometido podemos concluir lo siguiente:

- 1.- La sobrevivencia es mayor en los grupos de los tratamientos que en el grupo control, el mejor porcentaje de sobrevivencia lo obtuvimos con el tratamiento 2 (22ppm), con 30% de sobrevivencia mayor que el control. Existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control, con un nivel de confianza al 95%.
- 2.- No observamos diferencias significativas en la evaluación del crecimiento de los tratamientos con respecto al control, con un nivel de confianza al 95%.
- 3.- No encontramos diferencias significativas en la sobrevivencia del tratamiento 2 con respecto al tratamiento 1, con un nivel de confianza al 95%. No obstante hay una superioridad de 5.5 % de sobrevivencia del tratamiento 2 con respecto al tratamiento 1.
- 4.- El Flavofosfolipol interviene en la mejoría de la sobrevivencia, mas no en el crecimiento individual de los especímenes, tal como lo demuestran los resultados.

- 5.- Es mucho mas barato producir un juvenil por medio del sistema del tratamiento 2, con respecto a tratamiento 1 y al control, similarmente es mas barato producir un juvenil por medio de tratamiento 1 con respecto al control. Producir un juvenil por medio del tratamiento 2 resulta 41.2 % mas barato que producirlo por medio del control. A su vez producir un juvenil por medio del tratamiento 1 resulta 36.8% mas barato con respecto al control.
- 6.- Existen diferencias significativas en la conversión alimenticia de los tratamientos con respecto al control, con un nivel de confianza al 95%. La menor conversión alimenticia la obtuvimos por medio del sistema del tratamiento 2 con 71.55% menor que el control.
- 7.- El Vibrio alginolyticus fue la cepa que necesitó mayor concentración de Flavofosfolipol (10ppm) para inhibir su crecimiento, debido a una condición de resistencia genética natural; no así las demás cepas estudiadas que presentaron un MIC menor.
- 8.- Las identificaciones de las 4 cepas aisladas en este estudio las categorizamos como excelentes, por medio de la comprobación con las tablas clásicas de las reacciones bioquímicas de los Vibrios.

Una vez de la culminado este experimento de tesis y habiéndose enunciado las conclusiones derivadas del mismo, es importante ofrecer algunas recomendaciones que a posteriori servirán de mucho beneficio para la investigación científica y para el sector productor.

- 1.- Como demostramos en este estudio que a mayor concentración del Flavofosfolipol mejoraba el porcentaje de sobrevivencia, es conveniente realizar un estudio similar, con las mismas condiciones experimentales estandarizadas, pero con la variable de aumentar las concentraciones, sobretodo que estén sobre los 22 ppm del producto, siguiendo un diseño experimental similar al utilizado, con el margen de seguridad de que el producto no va ocasionar resistencia bacteriana.
- 2.- Aumentar el estudio del radio del efecto antimicrobiano del Flavofosfolipol, con otras cepas marinas de importancia comercial, sobretodo con las especies de Aeromona spp y con Vibrio harveyi.
- 3.- Estudiar el efecto antimicrobiano del Flavofosfolipol con otros agentes patogénicos, principalmente con el grupo de las gregarinas, porque tenemos conocimientos por comunicación verbal de campo, de que el producto funciona eficientemente ante estos problemas.

- 4.- En la identificación bacteriana recomendamos utilizar el sistema de categorización por medio de comparación con las tablas de bioquímica clásica, en vez de la utilización de códigos del sistema API 20 E solamente.
- 5.- Trasladar los resultados de este estudio, en una investigación a escala de producción, aplicando el mismo diseño experimental, con 12 piscinas de producción, sin modificar ninguna variable.
- 6.- Realizar un estudio similar, aplicando el mismo diseño experimental, con condiciones experimentales similares, pero orientado a la producción de larvas de laboratorio, con la posibilidad de producir larvas con mejores porcentajes de sobrevivencias y sin causar problemas de resistencia bacteriana alguna, por las razones científicas anteriormente explicadas.
- 7.- Investigar el efecto del Flavofosfolipol como factor de liberación de resistencia extracromosómica.

ANEXOS

ANEXO A

TABLA XXXVII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

 DATA: Peso Promedio
 LEVEL CODES: Primera semana del Ensayo
 LABELS:
 MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

 SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	.0132778	2	.0066389	0.449	.6533
WITHIN GROUPS	.1182402	8	.0147800		

 TOTAL (CORRECTED) .1315180 10
 0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

 METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	.9903333	X
3	4	1.0662500	X
2	4	1.0702500	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.07992	0.21418
1 - 3	-0.07592	0.21418
2 - 3	-0.00400	0.19829

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XXXVIII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Peso Promedio

LEVEL CODES: Segunda semana del Ensayo

LABELS:

MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	.0621185	2	.0310592	1.558	.2682
WITHIN GROUPS	.1594515	8	.0199314		

TOTAL (CORRECTED) .2215700 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	1.2690000	X
2	4	1.3997500	X
3	4	1.4572500	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.13075	0.24872
1 - 3	-0.18825	0.24872
2 - 3	-0.05750	0.23027

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XXXIX

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Peso Promedio

LEVEL CODES: Tercera semana del Ensayo

LABELS:

MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	.0682862	2	.0341431	.939	.4301
WITHIN GROUPS	.2907994	8	.0363499		

TOTAL (CORRECTED) .3590856 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	1.7176667	X
2	4	1.8320000	X
3	4	1.9172500	X

CONTRAST

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.11433	0.33589
1 - 3	-0.19958	0.33589
2 - 3	-0.08525	0.31097

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XL

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Peso Promedio

LEVEL CODES: Cuarta semana del Ensayo

LABELS:

MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	.0093282	2	.0046641	.072	.9315
WITHIN GROUPS	.5208334	8	.0651042		

TOTAL (CORRECTED) .5301616 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	2.3036667	X
2	4	2.3320000	X
3	4	2.3757500	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.02833	0.44952
1 - 3	-0.07208	0.44952
2 - 3	-0.04375	0.41617

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLI

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Peso Promedio
 LEVEL CODES: Quinta semana del Ensayo
 LABELS:
 MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	.3664052	2	.1832026	1.279	.3297
WITHIN GROUPS	1.1462744	8	.1432843		
TOTAL (CORRECTED)	1.5126796	10			

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD			
LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
2	4	2.9972500	X
3	4	3.0865000	X
1	3	3.4426667	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.44542	0.66687
1 - 3	-0.35617	0.66687
2 - 3	-0.08925	0.61740

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Peso Promedio

LEVEL CODES: Sexta semana del Ensayo (Semana Final).

LABELS:

MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	.4774450	2	.2387225	1.787	.2283
WITHIN GROUPS	1.0688097	8	.1336012		
TOTAL (CORRECTED)	1.5462547	10			

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
2	4	3.7152500	X
3	4	3.8115000	X
1	3	4.2220000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.50675	0.64394
1 - 3	-0.41050	0.64394
2 - 3	-0.09625	0.59617

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLIII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Primera Semana del Ensayo.

TREATMENT LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	3.0606061	2	1.5303030	3.339	.0883
WITHIN GROUPS	3.6666667	8	.4583333		

TOTAL (CORRECTED) 6.7272727 10

MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
	3	47.666667	X
	4	48.500000	XX
	4	49.000000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
- 2	-0.83333	1.19270
- 3	-1.33333	1.19270*
- 3	-0.50000	1.10422

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLIV

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Segunda Semana del Ensayo.

LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	9.4924242	2	4.7462121	7.010	.0174
WITHIN GROUPS	5.4166667	8	.6770833		

TOTAL (CORRECTED) 14.909091 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	45.666667	X
2	4	47.250000	X
3	4	48.000000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-1.58333	1.44964*
1 - 3	-2.33333	1.44964*
2 - 3	-0.75000	1.34211

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLV

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Tercera Semana del Ensayo.

LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	62.310606	2	31.155303	12.208	.0037
WITHIN GROUPS	20.416667	8	2.552083		

TOTAL (CORRECTED) 82.727273 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	40.666667	X
2	4	45.250000	X
3	4	46.500000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-4.58333	2.81441*
1 - 3	-5.83333	2.81441*
2 - 3	-1.25000	2.60564

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLVI

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Cuarta Semana del Ensayo.

LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	164.01515	2	82.007576	23.292	.0005
WITHIN GROUPS	28.16667	8	3.520833		

TOTAL (CORRECTED) 192.18182 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	35.666667	X
2	4	42.750000	X
3	4	45.250000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-7.08333	3.30569*
1 - 3	-9.58333	3.30569*
2 - 3	-2.50000	3.06048

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLVII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Quinta Semana del Ensayo.

LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	425.51515	2	212.75758	32.318	.0001
WITHIN GROUPS	52.66667	8	6.58333		

TOTAL (CORRECTED) 478.18182 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	26.666667	X
2	4	39.500000	X
3	4	41.500000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-12.8333	4.52025*
1 - 3	-14.8333	4.52025*
2 - 3	-2.00000	4.18494

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLVIII

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA:Número de organismos Sobrevivientes.

LEVEL CODES:Sexta Semana del Ensayo (Semana Final).

LABELS:

MEANS PLOT:CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST:LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F RATIO	SIG.LEVEL
BETWEEN GROUPS	420.15909	2	210.07955	58.457	.0000
WITHIN GROUPS	28.75000	8	3.59375		
TOTAL (CORRECTED)	448.90909	10			

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD:95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
1	3	24.000000	X
2	4	36.250000	X
3	4	39.000000	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-12.2500	3.33975*
1 - 3	-15.0000	3.33975*
2 - 3	-2.75000	3.09201

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA XLIX

ONE -WAY ANALYSIS OF VARIANCE

DATA: Conversión Alimenticia

LEVEL CODES: Semana Final del Ensayo.

LABELS:

MEANS PLOT: CONF .INT CONFIDENCE LEVEL :95 RANGE TEST: LSD

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE OF VARIATION - SUM OF SQUARES - DF- MEAN SQUARE - F RATIO - SIG.LEVEL

BETWEEN GROUPS	.4608492	2	.2304246	40.344	.0001
WITHIN GROUPS	.0456917	8	.0057115		

TOTAL (CORRECTED) .5065409 10

0 MISSING VALUES (S) HAVE BEEN EXCLUDED.

MULTIPLE RANGE ANALYSIS

MULTIPLE RANGE ANALYSIS FOR :

METHOD: 95 PERCENT LSD

LEVEL	COUNT	AVERAGE	HOMOGENEOUS GROUPS
3	4	1.2600000	X
2	4	1.3675000	X
1	3	1.7616667	X

CONTRAST	DIFFERENCE +/-	LIMITS
1 - 2	-0.39417	0.13314*
1 - 3	-0.50167	0.13314*
2 - 3	-0.10750	0.12327

* DENOTES A STATISTICALLY SIGNIFICANT DIFFERENCE

TABLA L

TABLA DE MEDIAS PARA LA SOBREVIVENCIA FINAL

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	24.000000	1.1547005	1.0944938	21.475386	26.524614
2	4	36.250000	1.2500000	.9478594	34.063620	38.436380
3	4	39.000000	.4082483	.9478594	36.813620	41.186380
TOTAL	11	33.909091	.5715807	.5715807	32.590654	35.227527

TABLA LI

TABLA DE MEDIAS PARA LA CONVERSION ALIMENTICIA

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	1.7616667	.0538589	.0436328	1.6610211	1.8623122
2	4	1.3675000	.0366617	.0377871	1.2803384	1.4546616
3	4	1.2600000	.0318303	.0377871	1.1728384	1.3471616
TOTAL	11	1.4359091	.0227865	.0227865	1.3833487	1.4884695

TABLA LII

TABLA DE MEDIAS PARA EL PESO PROMEDIO INICIAL

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	.7290000	.0420991	.0501148	.6134028	.8445972
2	4	.7287500	.0392181	.0434007	.6286399	.8288601
3	4	.7305000	.0509779	.0434007	.6303899	.8306101
TOTAL	11	.7294545	.0261716	.0261716	.6690859	.7898232

TABLA LIII

TABLA DE MEDIAS PARA EL PESO PROMEDIO FINAL

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	4.2220000	.2639438	.2110302	3.7352273	4.7087727
2	4	3.7152500	.1875995	.1827575	3.2936925	4.1368075
3	4	3.8115000	.1379882	.1827575	3.3899425	4.2330575
TOTAL	11	3.8884545	.1102069	.1102069	3.6342458	4.1426633

TABLA LIV

TABLA DE MEDIAS PARA LA BIOMASA INICIAL

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	36.453333	2.1223991	2.4954278	30.697256	42.209411
2	4	36.437500	1.9609070	2.1611039	31.452591	41.422409
3	4	36.575000	2.5212844	2.1611039	31.590091	41.559909
TOTAL	11	36.491818	1.3031947	1.3031947	33.485805	39.497832

TABLA LV

TABLA DE MEDIAS PARA LA BIOMASA FINAL

LEVEL	COUNT	AVERAGE	STND ERROR (internal)	STND ERROR (pooled s)	95 % CONFIDENCE INTERVALS FOR MEAN	
1	3	100.82000	3.2347643	4.7661816	89.82609	111.81391
2	4	134.11000	3.8143872	4.1276344	124.58899	143.63101
3	4	148.60500	5.0647384	4.1276344	139.08399	158.12601
TOTAL	11	130.30182	2.4890572	2.4890572	124.56044	136.04320

TABLA LVI

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 24 HORAS DE CULTIVO.

PRIMERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	INCONTABLES AMARILLAS	-20000 AMARILLAS --2000 VERDES	INCONTABLES AMARILLAS -2000 VERDES
TRATAMIENTO 1 (9.7 PPM)	-15000 AMARILLAS -3000 VERDES	-25000 AMARILLAS -1000 VERDES	-35000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-17000 AMARILLAS -2000 VERDES	-7000 AMARILLAS -1000 VERDES	-8000 AMARILLAS

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 48 HORAS DE CULTIVO

PRIMERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-INCONTABLES AMARILLAS -3000 VERDES	-SPREAD DE COLONIAS AMARILLAS Y VERDES(2+)	SPREAD DE COLONIAS AMARILLAS Y VERDES(2+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-20000 AMARILLAS -6000 VERDES	-30000 AMARILLAS -10000 VERDES	-40000 AMARILLAS -3000 VERDES
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-18000 AMARILLAS -2000 VERDES	-7000 AMARILLAS -2000 VERDES	-10000 AMARILLAS -1000 VERDES

TABLA LVII

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 24 HORAS DE CULTIVO.

SEGUNDA SEMANA.

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-16000 AMARILLAS -1000 VERDES	-7000 AMARILLAS -1000 VERDES	-16000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-18000 AMARILLAS	-26000 AMARILLAS	-18000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22 PPM)	-63000 AMARILLAS -2000 VERDES	-65000 AMARILLAS -2000 VERDES	-90000 AMARILLAS -1000 VERDES

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 48 HORAS DE CULTIVO

SEGUNDA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-15000 AMARILLAS -2000 VERDES	-18000 AMARILLAS -3000 VERDES	-19000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-20000 AMARILLAS	-30000 AMARILLAS	-19000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-70000 AMARILLAS -4000 VERDES	-65000 AMARILLAS -4000 VERDES	-92000 AMARILLAS -2000 VERDES

TABLA LVIII

**CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE
LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.**

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 24 HORAS DE CULTIVO

TERCERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-188000 AMARILLAS -1000 VERDES	-312000 AMARILLAS -4000 VERDES	-108000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-80000 AMARILLAS	-68000 AMARILLAS -4000 VERDES	-36000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-108000 AMARILLAS -4000 VERDES	-336000 AMARILLAS	-96000 AMARILLAS -

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 48 HORAS DE CULTIVO.

TERCERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-512000 AMARILLAS Y VERDES	-350000 AMARILLAS -5000 VERDES	-312000 AMARILLAS Y VERDES
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-416000 AMARILLAS Y VERDES	-70000 AMARILLAS -5000 VERDES	-SPREAD AMARILLAS Y VERDES(2+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	SPREAD AMARILLAS Y VERDES	-340000 AMARILLAS	-164000 AMARILLAS

TABLA LIX

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 24 HORAS DE CULTIVO.

CUARTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-220000 AMARILLAS -4000 VERDES	-80000 AMARILLAS -1000 VERDES	-140000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-112000 AMARILLAS	-128000 AMARILLAS	-130000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-100000 AMARILLAS -4000 VERDES	-176000 AMARILLAS	-128000 AMARILLAS

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 48 HORAS DE CULTIVO

CUARTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-228000 AMARILLAS -5000 VERDES	-117000 AMARILLAS -2000 VERDES	-244000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-217000 AMARILLAS	-182000 AMARILLAS Y VERDES	-228000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-160000 AMARILLAS Y VERDES	-244000 AMARILLAS Y VERDES	-140000 AMARILLAS Y VERDES

TABLA LXI**CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE
LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.***LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 24 HORAS DE CULTIVO**SEXTA SEMANA*

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-46000 AMARILLAS -2000 VERDES	-76000 AMARILLAS -1000 VERDES	-25000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD AMARILLAS Y VERDES(2+)	-105000 AMARILLAS	-86000 AMARILLAS
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-380000 AMARILLAS	--75000 AMARILLAS	-41000 AMARILLAS

*LECTURA DE UFC/ML EN AGAR TCBS A 48 HORAS DE CULTIVO.**SEXTA SEMANA.*

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-50000 AMARILLAS -3000 VERDES	-78000 AMARILLAS -2000 VERDES	-75000 AMARILLAS Y VERDES
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD DE AMARILLAS Y VERDES(3+)	-SPREAD DE AMARILLAS Y VERDES(2+)	-SPREAD AMARILLAS Y VERDES(2+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-395000 AMARILLAS Y VERDES	-380000 AMARILLAS Y VERDES	-54000 AMARILLAS Y VERDES

TABLA LXII

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO.

PRIMERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-284000	SPREAD(1+)	-SPREAD
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-128000	-136000	-152000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD(1+)	-144000	-124000

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

PRIMERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-292000	-SPREAD(2+)	-SPREAD
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-244000	-256000	-200000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD (2+)	-320000	-240000

TABLA LXIII

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO

SEGUNDA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(1+)	SPREAD(1+)	-SPREAD
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-200000	-200000	-124000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-240000	-120000	-SPREAD (2+)

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

SEGUNDA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-220000	-210000	-240000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-250000	-120000	-SPREAD(2+)

TABLA LXIV

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO.

TERCERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD(1+)	-208000	-178000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(2+)	-132000

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

TERCERA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(2+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)

TABLA LXV

**CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE
LAS UNIDADES EXPERIMENTALES .**

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO.

CUARTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO #2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-148000	-164000	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-140000	-196000	-112000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-212000	-200000	-SPREAD(2+)

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

CUARTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-300000	-441000	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-312000	-448000	-348000
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD(2+)	-228000	-SPREAD(2+)

TABLA LXVI

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES.

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO

QUINTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD (1+)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(2+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-172000	-SPREAD(1+)	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(1+)

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

QUINTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(2+)
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(1+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(1+)

TABLA LXVII

CONTAJE DE COLONIAS BACTERIANAS DEL AGUA PROCEDENTE DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES .

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 24 HORAS DE CULTIVO

SEXTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(1+)	-67000	-64000
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(2+)	-SPREAD(2+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-276000	-296000	-168000

LECTURA DE UFC/ML EN AGAR MARINO A 48 HORAS DE CULTIVO

SEXTA SEMANA

TRATAMIENTO	PLATO#1	PLATO#2	PLATO#3
CONTROL (0PPM)	-SPREAD(1+)	-SPREAD(1+)	-224000
TRATAMIENTO 1 (9.7PPM)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(3+)	-SPREAD(3+)
TRATAMIENTO 2 (22PPM)	-392000	-412000	-212000

TABLA LXVIII

TABLA DE ALIMENTACION DE JUVENILES, DE JOSE VILLALON

Primera parte

PESO PROMEDIO (grs)	PORCENTAJE DE LA BIOMASA (%) <i>Alimentación diaria</i>
1.0	6.00
1.5	5.33
2.0	4.83
2.5	4.50
3.0	4.23
3.5	4.00
4.0	3.80
4.5	3.60
5.0	3.43
5.5	3.30
6.0	3.20
6.5	3.00
7.0	2.93
7.5	2.83
8.0	2.76
8.5	2.70
9.0	2.66
9.5	2.63
10.0	2.57
10.5	2.50
11.0	2.43

TABLA DE ALIMENTACION DE JUVENILES, DE JOSE VILLALON

Segunda parte

PESO PROMEDIO (grs)	PORCENTAJE DE LA BIOMASA (%) <i>Alimentación diaria</i>
11.5	2.40
12.0	2.33
12.5	2.27
13.0	2.23
13.5	2.16
14.0	2.10
14.5	2.06
15.0	2.00
15.5	1.96
16.0	1.93
16.5	1.90
17.0	1.87
17.5	1.83
18.0	1.80
18.5	1.77
19.0	1.73
19.5	1.70
20.0	1.69
20.5	1.66
21.0	1.66
21.5	1.60
22.0	1.59

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL METODO DE SIEMBRA BACTERIANA

OBTENCION DE CEPAS

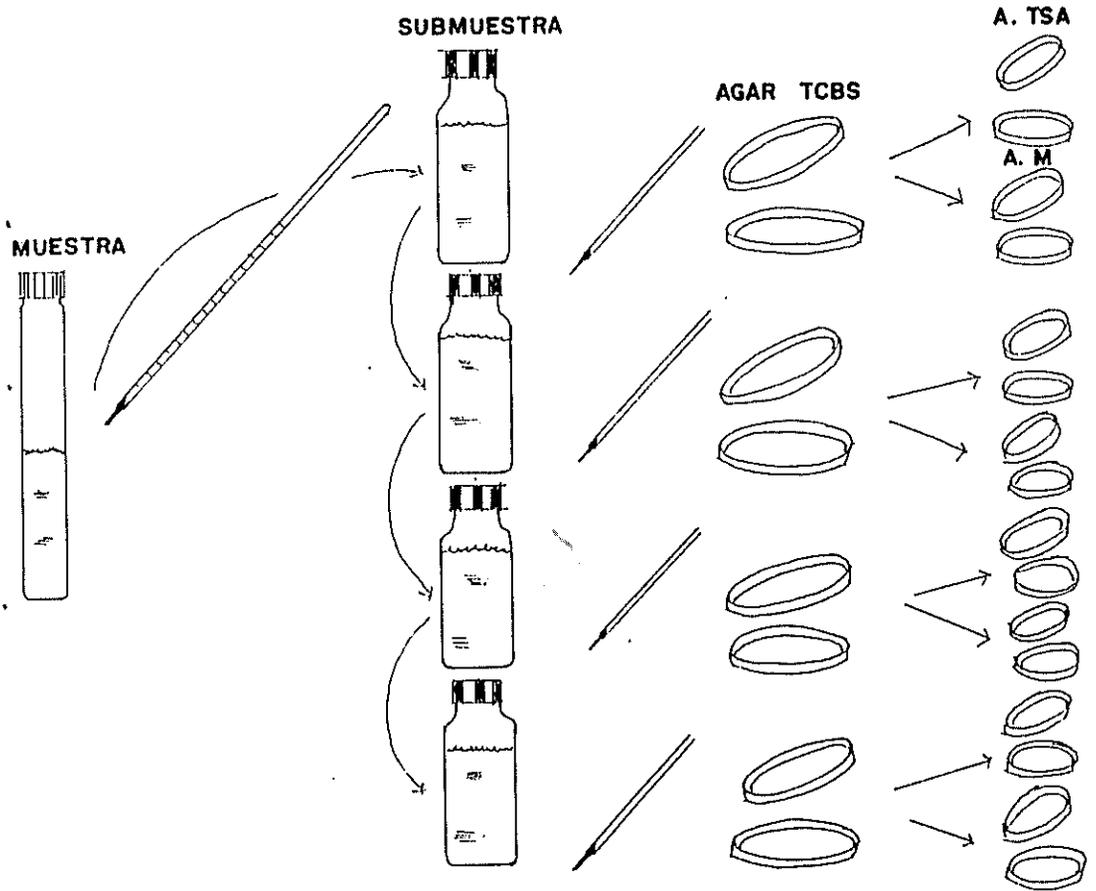


FIGURA # 35

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA TINCION DE GRAM

TINCION DE GRAM

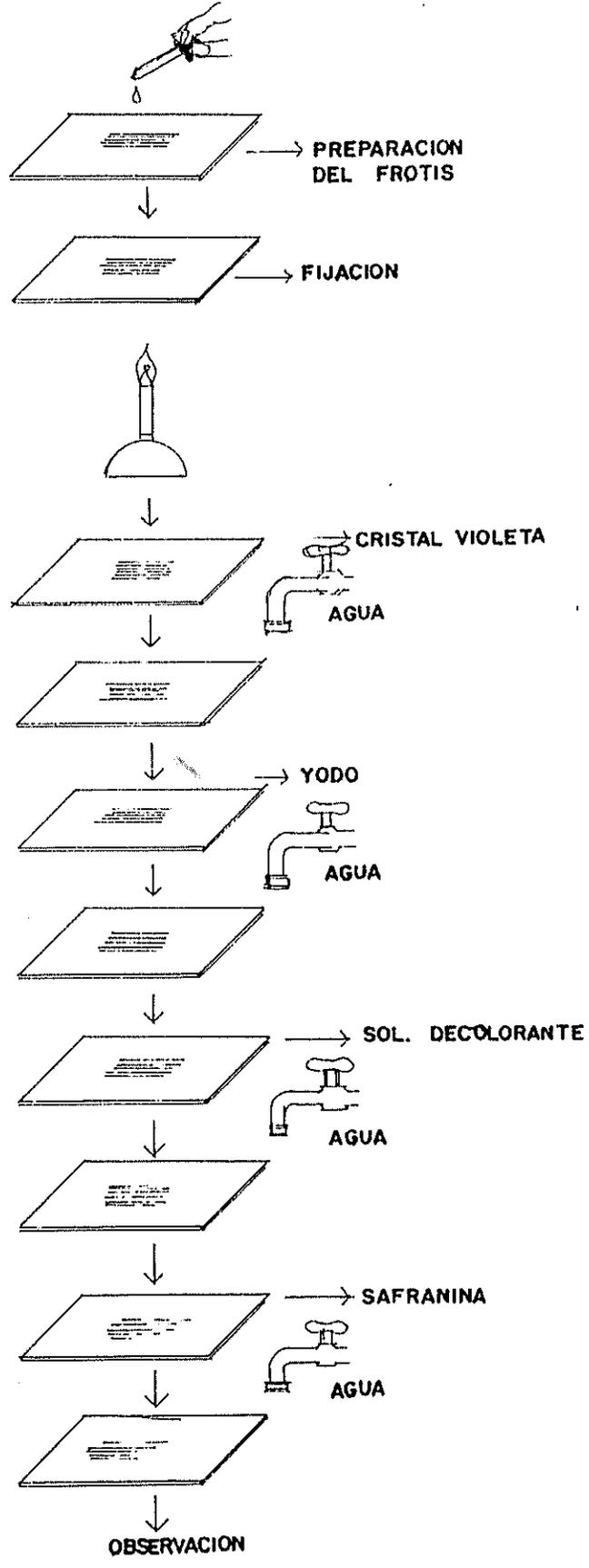


FIGURA # 36

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albert Balows and W.J Hausler 1981. Diagnostic Procedures for Bacterial ,Mycotic Parasitic Infections .Washington ,D.C.
- 2.- American Public health Association 1976.Compendium of Methods for the microbiological foods.
- 3.- American Society for Microbiology 1991. Manual of Clinical microbiology.Washington D.C.
- 4.- Austin,B and Austin D.1989.Methods for the Microbiological. Examination of Fishand shellfishs.
- 5.- Bedo S;L. Bodis and T. Ravasz. The effect of growth promoters on the metabolism of young lambs.Int Symp on shepp production in farms.Debrecen,Ungarn. 14.-16.8.1984.
- 6.-Benjaminson M. A; DE Guzman B. C.Weil A.J. Voges -Proskauer test : expeditious techniques for routine use.(1964) J Bacterio. 87, 234-235.

- 7.- Casillas, E; M.A Kenny, B.H Minshew, and F. D. Schoenknecht. 1981. Effect of ionized calcium and soluble magnesium on the predictability of *Pseudomonas aeruginosa* with gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:987-992
- 8.- Corpet D. E. The effect of Bambermycin, Carbadox, Chlortetracycline and Olaquinox on antibiotic resistance. Intestinal coliforms :a new animal model .*Ann. Microbiology In Pasteur* 135 (1984) A.S.329-339.
- 9.- Cowan S. T; Steel K. J. Manual for the identification of Enterobacteriaceae. (1970) Cambridge University Press Cambridge ,U. K.
- 10.- Dealy J. and M . W Moeller. Influence of Bambermycins on salmonella infection and antibiotic resistance in calves. *J of Animal Science* 44.(1977) 5. S 734-738.
- 11.- Edwards P.R; Edwards P.R; Ewing W.H. Identification of Enterobacteriaceae.(1972) 3rd de. Burgess Publishing co.Mineapolis, Minn.
- 12.-Erisson ,H.M and J.C.Sherris .1971.Antibiotic sensitivity testing .Report of an international collaborative study .*Acta Pathol.Microbiol.Scand .Sect B .Suppl* 217:1-90.

- 13.- Fagerberg D.J. Antibiotic feeding, antibiotic resistance and alternatives. American Hoechst Corporation, Somerville 1979.
- 14.- George B.A; D. J Fagerberg , C. L .Quarles, J.M Fenton and G. A . McKinley. Effect Bambermycins on quality ,prevalence,duration and antimicrobial resistance of Salmonella typhimurium experimentally infected broiler chickens. American J. of Vet Research 43 ,(1982) 2. S 299-303.
- 15.- Hilpert R; J Winter and O. Kandler. Agricultural feed additives and disinfectans as inhibitory factors in anaerobic digestions. Agricultural Wastes 10 (1984) S.103-116.
- 16.- Hoechst eteco. 1992. Uso de Flavomycin en alimentos para camarón .Ecuador.
- 17.- Holmes B; Willcox W.R; Lapage S.P. Identifications of Enterobacteriaceae by the API 20 E system. (1978) J.Clin. Pathol. 31 ,22-30.
- 18.-Huber G. and G.Nesemann. Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis Biochemical and Biophysical research. Communications 30 (1968) 1 S.7-13.

- 19.- Huber G;U.Schacht, H.L .Weidenmueller,J.Dchmidt Thomé, J.Duphorn and Tsches en. Moenomycin, a new antibiotic. Characterisation and Chemistry. Antimicrobial Agents and Chemoterapy ,(1966).S 737-742.
- 20.- Irwin R.Miller. John E Freund. Richard Johnson.1993. University of Arizona - Probabilidad y Estadística para Ingenieros.
- 21.- Jones, R.N. 1983. Antimicrobial susceptibility testing (AST): a review of changing - trends quality control,guidelines, test accuracy and recommendations for testing of B·lactam drugs. Diagn.Microbiol.Infect.Dis 1:1 -24.
- 22.- Koornhof H.J; M.R Jacobs, J.I .Ward, P.C. Appelbaum, and F.A .Hallet 1979. Therapy and control of antibiotic resistant Pneumococcal disease, P. 286 -289. Inc D .Schlessinger.(de). Microbiology 1979. American Society for microbiology, Washington ,DC.
- 23.- M de la Higuera.1977 .Diseños y Métodos experimentales de Evaluación de dietas. Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética . Universidad de Granada España.

- 24.- Murray R. Piegel. 1961 . Estadística. Renselaer Polytechnic Institute.
- 25.- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1982. Tentative reference dilution procedure for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. M.H. T. National Committee for clinical laboratory standards, Villanova ,Pa.
- 26.- Nord .C.E; Lindberg A.A ;Dahlback A.Evaluation of five test kits .API .Auxotab , Enterotube ,Pathotec and R/B -for identification of Enterobacteriaceae .(1974) Med Microb.Immunol.159,211-220.
- 27.- Petersdorf ,R.G;and J.J Plorde .1963.The usefulness of in vitro sensitivity test in - antibiotic therapy .Annu Rev.Med 14:41-56
- 28.- Rita R.Colwell.1984.Vibrios in the Environment.New York.
- 29.- Sahm,D.F;C.N Baker ,R.N Jones, and C Thornsberry.1983.Medium -dependent zone size discrepancies associated with susceptibility testing of group D streptococci - against various cephalosporin .J.Clin. Microbiol.18: 858-865.
- 30.- Sampling for Microbiological Analysis:Principles and Specific Applications.University of Toronto Press 1974.Toronto Canada.

- 31.- Sherris ,J.C.1977.The antibiotic sensitivity test.Variability .Interpretation .Rapid versus overnight.Agar versus broth ,p.170-185.In V Lorian (de); Significance of medical microbiology in the care of patients .The Willians and Wikings Co;Baltimore.
- 32.- Sherris ,J.C ;A.L Rashad ,and G.A Lighthart.1967 .Laboratory determination of - antibiotic susceptibility to ampicillin and chepalothin.Ann.N.Y.Acad.Sci.145:248-265.
- 33.- Singer J.M Volcani B.E. An improved ferric chloride test for differentiating Proteus -Providencia group from other Enterobacteriaceae.(1955) J.Bacteriol.69,303.
- 34.- S.R Paton I.C Castro .P Whelan .1990. Introducción a la Bioestadística de campo. Fundación Charles Darwin.
- 35.- T.J Donovan and A.L Furniss.1982 Lancet .Vibrios,Aeromonas ,Plesiomonas and - Photobacterium.
- 36.- Van Der Waaij D; Tielemans -Speltie TM; DE Roeck-Houben A.M.J. Infection by and distribution of biotypes of Enterobacteriaceae species in leukaemic patients treated under ward conditions and units for protective isolation in seven hospital in Europe.(1977).Infection 5,3,188-194.

- 37.- Watanabe T;Y Ogata ,K Sugawara and K. Oda. Increase of Flavomycin sensitivity of bacteria by R -factors.Procedings of the first International Symposium on infectious (Transferable) .Antibiotic Resistance .30.8.-2.9.1971.
- 38.- Welzel P;B.Wietfeld.F.Kunisch,T Schubert, K Hobert, H. Duddeck and D Muller. Moenomycin :Further structural studies and preparation of simple derivates .39 (1983).9 S 1983.
- 39.- Willian G. Cochran Gertrude .M Cox. 1992.Diseños Experimentales .Universidad de Johns Hopkins.
- 40.- Willian O Leary.1992.Practical Handbook of Microbiology. Boca Raton .Fl