



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

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

Título del trabajo

Efectos del dióxido de cloro para el control de vibriosis en el  
camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

**PROYECTO INTEGRADOR**

**Previo a la obtención del título de  
Ingeniero Acuícola**

Presentado por:

Jorge Samuel Segura Rivero

Víctor Ernesto Martínez Nieto

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**Año: 2022**



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**College of Maritime Engineering and Sea Science**

Work title

Effects of chlorine dioxide for the control of vibriosis in white shrimp  
(*Penaeus vannamei*)

**INTEGRATING PROJECT**

**Prior to obtaining the title of  
Aquaculture Engineer**

by:

Jorge Samuel Segura Rivero

Víctor Ernesto Martínez Nieto

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

Year: 2022

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios por darme la fuerza y guía todo este tiempo, a mis padres Jorge y Cecilia quienes con su paciencia, esfuerzo, consejos y apoyo incondicional me han formado e inculcado valores, siendo ellos mismos ejemplos a seguir, para ser una persona de bien, también por el apoyo a lo largo de mi etapa estudiantil y en todo momento de mi vida.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos me apoyaron en toda mi carrera universitaria y a lo largo de la vida.

Finalmente, a la familia que hice en baloncesto, los amigos que hice a lo largo de mi vida y todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

**Samuel Segura.**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis tíos y a mi hermano Nicolás, pero principalmente a mi mamá María Cristina Nieto y a mi tío Vicente Gastón Nieto. Fueron ellos quienes me apoyaron en los buenos y malos momentos que se presentaron en el trayecto de mi carrera. Por enseñarme siempre a afrontar cada obstáculo sin rendirme y ayudándome a demostrando cada día la mejor versión de mí.

A mis abuelitos Norma Gallino y Víctor Nieto quienes me ayudaron en todo momento durante mi trayecto universitario con sus enseñanzas, apoyos y consejos.

Finalmente, a mis amigos, seres cercanos que han estado para mí a lo largo de mi vida durante toda mi carrera, con sus valiosos y fraternos aportes para mejorar como persona y como profesional.

**Víctor Martínez.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestros más sinceros agradecimientos a los diferentes departamentos y laboratorios de experimentación de la Facultad de Marítima en la ESPOC los cuales nos permitieron utilizar sus instalaciones para realizar este proyecto.

A nuestro tutor el Ph.D. Víctor Osorio Cevallos, quien estuvo presente en todo momento para guiarnos, aconsejarnos, enseñarnos y corregirnos durante todo el proyecto.

Al MSc. Jonathan Castro Lara por sus enseñanzas, paciencia y colaboración en esta investigación.

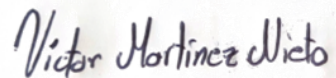
## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; (Jorge Samuel Segura Rivero y Víctor Ernesto Martínez Nieto) y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



---

Jorge Samuel Segura Rivero



---

Víctor Ernesto Martínez Nieto

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:  
WILFRIDO ERNESTO  
ARGUELLO GUEVARA

VICTOR  
HUGO  
OSORIO  
CEVALLOS

Firmado  
digitalmente por  
VICTOR HUGO  
OSORIO CEVALLOS  
Fecha: 2022.09.22  
11:41:29 -05'00'

**Wilfrido Argüello, Ph.D.**

PROFESOR DE LA MATERIA

**Víctor Osorio, Ph.D.**

TUTOR

## RESUMEN

En los laboratorios de larvas el control y mitigación de vibrios en los animales y en el agua es de suma importancia, por lo que esta industria usa diferentes productos para la eliminación de estas bacterias, pero algunos productos usados para la desinfección son tóxicos, se mantienen en el medio por tiempos prolongados o no son aceptados, también al no tener una sustancia adecuada para combatir estas bacterias ocurre la mortalidad de los animales y consiguiente pérdidas económicas, por lo que el objetivo de este estudio fue “Determinar la toxicidad del dióxido de cloro en poslarvas de camarón *P. vannamei* y analizar la factibilidad de utilizar el compuesto para controlar *vibrios sp.* en los cultivos de camarón blanco”, con estos antecedentes, se determinó la toxicidad de este compuesto químico en poslarvas, y se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC). En el presente proyecto se determinó la mortalidad y se evaluó la toxicidad del dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) en poslarvas de camarón en el estadio PI14; que se sometieron a diferentes tratamientos de 1.00, 1.50, 2.00 mg/l de ClO<sub>2</sub>. El diseño experimental contó con cuatro tratamientos, de cuatro réplicas de 30 poslarvas cada uno; con una población total de 480 poslarvas. Se contabilizó la mortalidad al cabo de 24 horas y se utilizó un análisis estadístico mediante la prueba de Turkey usando el programa RStudios para determinar las variaciones entre los tratamientos. Paralelamente, se realizó el MIC con concentraciones de 2.00, 1.75, 1.50, 1.25, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.20, 0.15 mg/l de ClO<sub>2</sub>, donde se observó las concentraciones en donde no había crecimiento bacteriano, y en las pruebas negativas se tomó una muestra para inocularla en una placa agar y demostrar si dicha concentración actúa como bacteriostático o bactericida. Los resultados mostraron que a una concentración de 1 mg/l de ClO<sub>2</sub> los animales no muestran una toxicidad al químico y este actúa como bactericida.

**Palabras clave:** dióxido de cloro, ClO<sub>2</sub>, MIC, mortalidad, PI14, toxicidad, *Penaeus vannamei*.



## ABSTRACT

In larval laboratories, the control and mitigation of vibrios in animals and water is of utmost importance, so this industry uses different products for the elimination of these bacteria, but some products used for disinfection are toxic, are kept in the environment for long periods of time or are not accepted industrially, also by not having an adequate substance to combat these bacteria occurs mortality of the animals and consequent economic losses, therefore, the objective of this study was the "Effects of chlorine dioxide for the control of vibriosis in white shrimp (*Penaeus vannamei*)", with this background, the toxicity of this chemical compound should be determined so that, once the amount of mortality produced by the product at different concentrations has been evaluated, the minimum inhibitory concentration test (MIC) is performed, in addition to a test to determine whether these concentrations act as a bacteriostatic or as a bactericide, and thus discover whether the concentration that prevents bacterial growth is toxic to the white shrimp postlarvae. In the present project, the mortality and toxicity evaluation of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) in shrimp postlarvae at P114 stage was determined, where the postlarvae were subjected to the treatments of 1.00, 1.50, 2.00 mg/l of ClO<sub>2</sub> and the control. We used 480 postlarvae with four replicates of 30 postlarvae per treatment and used observation to count the mortality of the postlarvae population in a 24-hour and a statistical analysis by Turkey test using the RStudios program. Then the MIC was performed with concentrations of 2.00, 1.75, 1.50, 1.25, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.20, 0.15 mg/l of ClO<sub>2</sub>, where the concentrations where there was no bacterial growth were observed, and in the negative tests a sample was taken to inoculate it in an agar plate to demonstrate if such concentration acts as bacteriostatic or bactericidal. The results showed that at a concentration of 1 mg/l of ClO<sub>2</sub>, the animals do not show toxicity to the chemical and it acts as a bactericide.

**Key words:** chlorine dioxide, ClO<sub>2</sub>, MIC, mortality, P114, toxicity, *Penaeus vannamei*.

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	5
DECLARACIÓN EXPRESA .....	6
EVALUADORES .....	7
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
CAPÍTULO 1 .....	17
1. Introducción .....	17
1.1 Descripción del problema .....	18
1.2 Justificación del problema .....	20
1.3 Objetivos .....	20
1.3.1 Objetivo General .....	20
1.3.2 Objetivos Específicos.....	20
1.4 Marco teórico .....	21
1.4.1 Especie <i>Penaeus vannamei</i> .....	21
1.4.2 Bacterias patógenas en la Acuicultura .....	22
1.4.3 Género <i>Vibrio</i> .....	23
1.4.4 Concentración mínima inhibidora (MIC) .....	26
CAPÍTULO 2.....	27
2. Metodología.....	27
2.1 Desinfección general de materiales y equipos.....	28
2.2 Diseño experimental del bioensayo .....	28
2.3 Obtención de los animales, agua y balanceado .....	29
2.3.1 Agua .....	29
2.3.2 Postlarvas de camarón ( <i>Penaeus vannamei</i> ).....	29
2.3.3 Balanceado.....	30
2.4 Determinación del dióxido de cloro en el agua .....	31

2.5	Aclimatación de las postlarvas .....	31
2.6	Determinación de la toxicidad del ClO <sub>2</sub> .....	32
2.7	Concentración mínima inhibidora (MIC) .....	32
<b>CAPÍTULO 3.....</b>		<b>35</b>
3.	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>35</b>
3.1	Resultados de la toxicidad del ClO <sub>2</sub> .....	35
3.2	Resultados MIC.....	41
3.3	Análisis estadístico.....	43
3.4	Análisis de costos.....	51
<b>CAPÍTULO 4.....</b>		<b>53</b>
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	53
4.1	Discusión del caso .....	53
4.2	Conclusiones.....	53
4.3	Recomendaciones.....	54
Bibliografía.....		55
APÉNDICES .....		58

## ABREVIATURAS

CIO <sub>2</sub>	Dióxido de cloro
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
PL14	Expresión de los días que tiene el animal en la etapa de postlarva
MIC	Concentración mínima inhibitoria
AHPND	Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
TSV	Síndrome de Taura
IHHNV	Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
YHV	Virus de la Cabeza Amarilla
IMNV	Virus Mionecrosis Infecciosa
EHP	Microsporidio Enterocytozoon hepatopenaei

## SIMBOLOGÍA

l	Litros
°C	Grados centígrados
g	Gramos
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mg/l	Miligramos sobre litro
μl	Microlitros
ppm	Partes por millón
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno

## ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1.1 Porcentaje de camarones infectados debido a la enfermedad con cada especie de Vibrio. (Somboon, Purivirojkul, Limsuwan, & Chuchird, 2012) .....	18
Ilustración 1.2 Participación de los principales grupos patógenos en pérdidas económicas de la industria camaronera. (Figueredo, y otros, 2020) .....	23
Ilustración 3.1 Gráfica de la mortalidad versus tiempo del grupo control (no expuesto al ClO <sub>2</sub> ) en la columna de agua. (Martínez & Segura, 2022) .....	36
Ilustración 3.2 Gráfica de la concentración 1 mg/l de ClO <sub>2</sub> y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022).....	37
Ilustración 3.3 Gráfica de la concentración 1.5 mg/l de ClO <sub>2</sub> y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022).....	39
Ilustración 3.4 Gráfica de la concentración 2 mg/l de ClO <sub>2</sub> y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022).....	40
Ilustración 3.5 Gráfica de la concentración promedio de ClO <sub>2</sub> vs promedio de la mortalidad vs tiempo. ....	41
Ilustración 3.6 Resultado de turbidez luego de 24 horas. ....	42
Ilustración 3.7 Crecimiento bacteriano en placa de agar .....	43
Ilustración 3.8 Análisis de varianza. ....	44
Ilustración 3.9 Resultados de la prueba de Turkey para las dosis. ....	45
Ilustración 3.10 Análisis de varianza. ....	46
Ilustración 3.11 Resultados de prueba de Turkey para el tiempo. ....	46
Ilustración 3.12 Diagrama de cajas de las dosis entre la mortalidad vs tiempo. Se observa la distribución de los datos en cada tiempo, obteniendo una similitud en las dosis de control (color naranja), dosis 1 (color verde) y dosis 2 (color celeste), siendo la más alejada de los demás datos la dosis 3 (color morado). ....	48
Ilustración 3.13 Distribución de tiempo y mortalidad en función de las dosis. La dosis de control (color naranja) es muy similar a la dosis 2 (color verde) y la dosis 3 (color celeste), siendo la dosis 3 (color morado) la que más se sobresalga en cuanto a la mortalidad. ....	49
Ilustración 3.14 Tabla del análisis de varianza. ....	50
Ilustración 3.15 Media muestral de las mortalidades de cada dosis desde los 120 minutos. Parece que las mortalidades no son iguales en las diferentes dosis. ....	50
Ilustración 3.16 Resultados de prueba de Turkey para la mortalidad y el tiempo mayor de 120 minutos. ....	51

Ilustración 0.1 Sistema de bioensayo armado. ....	58
Ilustración 0.2 Tanques reservorios. ....	58
Ilustración 0.3 Acuarios rotulados con la concentración de ClO <sub>2</sub> . ....	59
Ilustración 0.4 Acuario con postlarvas de camarón. ....	59
Ilustración 0.5 Postlarvas de camarón en la experimentación con ClO <sub>2</sub> . ....	60
Ilustración 0.6 Fotómetro para la medición de ClO <sub>2</sub> . ....	60
Ilustración 0.7 Control de temperatura de los acuarios. ....	61
Ilustración 0.8 Placa de cultivo para bioensayo inoculados y filas rotuladas. ....	61
Ilustración 0.9 Cultivo del contenido en los pocillos en una placa de agar. ....	62
Ilustración 0.10 Placa de agar inoculada y sellada. ....	62
Ilustración 0.11 Placa de agar luego de las 24 horas de sembrada. ....	63
Ilustración 0.12 Pruebas de estrés y del ClO <sub>2</sub> en las larvas del laboratorio. ....	63
Ilustración 0.13 Transporte del agua marina tratada del laboratorio hasta el laboratorio de piscicultura en la ESPOL. ....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Pérdidas económicas estimadas en camaronicultura causadas por algunas de las enfermedades más importantes. (Figueredo, y otros, 2020) .....	22
Tabla 1.2 Cronología global de las principales enfermedades infecciosas en camarones <i>Penaeidos</i> . (Figueredo, y otros, 2020) .....	23
Tabla 1.3 Límites para el crecimiento del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y su condición óptima. (ACHIPIA, 2017) .....	25
Tabla 2.1. Cantidad y descripción de los materiales usados en el proyecto. ....	27
Tabla 2.2 Composición del balanceado LARVAMAX.....	30
Tabla 2.3 Composición del balanceado LARFEED. ....	30
Tabla 2.4 Composición del balanceado ZEIGLER.....	30
Tabla 2.5 Concentraciones del dióxido de cloro y cantidades de cada compuesto. (Martínez y Segura, 2022).....	33
Tabla 3.1 Acuarios de control de tiempo en minutos versus mortalidad. (Martínez & Segura, 2022) .....	35
Tabla 3.2 Concentración de 1 mg/l de ClO <sub>2</sub> versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida. ....	36
Tabla 3.3 Concentración de 1.5 mg/l de ClO <sub>2</sub> versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida. ....	38
Tabla 3.4 Concentración de 2 mg/l de ClO <sub>2</sub> versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida. ....	39
Tabla 3.5 Resultados del crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones del dióxido de cloro. (Martínez & Segura, 2022) .....	42
Tabla 3.6 Concentraciones del dióxido de cloro que actúan como bactericida. (Martínez & Segura, 2022) .....	43
Tabla 3.7 Dosis y numeración de estos para el respectivo análisis estadístico. ....	44
Tabla 3.8 Tiempo y numeración de estos para el respectivo análisis estadístico. ....	44
Tabla 3.9 Costos para la elaboración de la experimentación. (Martínez & Segura, 2022) .....	51
Tabla 3.10 Costos de diferentes productos y su comparación de precio con el volumen total de desinfección.....	52



# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector camaronero en el Ecuador ha llegado a ser una de las actividades de producción con mayor desarrollo, abriendo nuevas líneas de mercado hacia diferentes partes del mundo (CNA, 2021). Sin embargo, la presencia de enfermedades es un tema que detiene el crecimiento del cultivo de camarón y esto se debe a la incidencia de diversos agentes patógenos que cada día evolucionan y se vuelven más resistentes a los tratamientos. (Navarro, 2016)

En los últimos años la producción del camarón en el Ecuador ha incrementado de una manera progresiva y sostenible, llevando a que la mayoría de los productores implementen protocolos moderados con uso excesivo de insumos para poder satisfacer esta demanda que involucra la intensificación de su producción. Sin embargo, todo este proceso requiere de un control mucho más detallado, de formas de cultivos más específicas y de una aplicación de alimentos e insumos que sometan a los organismos a un crecimiento más rápido (España, 2021). La Vibriosis es una enfermedad bacteriana extracelular provocada por varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. Estas bacterias en ciertas ocasiones poseen una patogénesis desconocida. (Cuéllar-Anjel, 2013)

La Vibriosis es la causante de mortalidades en cultivos de camarón generando de 6 a 8 mil millones de dólares en pérdidas anuales en diferentes países productores alrededor del mundo y afectando tanto al sector de hatcheries o laboratorios (larvicultura) como a las camaroneras en las etapas de engorde (Figueredo, et al., 2020);. La presencia de una vibriosis generalmente ocurre cuando existe un cambio drástico de las condiciones o parámetros ambientales causando así un aumento en la velocidad de la multiplicación bacteriana. (Cuéllar-Anjel, 2013)

En el anuario de pesca y medio ambiente de la universidad de Tailandia en el año 2012, se informó acerca de diferentes enfermedades del camarón producidas por vibrios, como las heces blancas (SHB), Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), y la enfermedad luminiscente, y se identificó el porcentaje de camarón infectados por cada especie de *Vibrio* identificado en la

hemolinfa y en el intestino como se aprecia en la ilustración 1.1. (Somboon, Purivirojkul, Limsuwan, & Chuchird, 2012)

**Ilustración 1.1 Porcentaje de camarones infectados debido a la enfermedad con cada especie de Vibrio.**  
(Somboon, Purivirojkul, Limsuwan, & Chuchird, 2012)

ESPECIE DE VIBRIO	% DE INFECCIONES DE CAMARONES POR LA ENFERMEDAD ESPECIE DE VIBRIO	
	Hemolinfa	Intestino
<i>V. Vulnificus</i>	80	80
<i>V. Fluviales</i>	44	44
<i>V. Parahaemolyticus</i>	26	26
<i>V. Alginolyticus</i>	20	20
<i>V. Damselae (Photobacterium Damselae)</i>	18	18
<i>V. Mimicus</i>	8	8
<i>V. Cholera (non01)</i>	6	6

## 1.1 Descripción del problema

Los diferentes microorganismos que conforman el género Vibrio se han convertido en uno de los principales factores de mortalidad en el cultivo del camarón. La mortalidad producida por vibrios también es muy común en los laboratorios de larvas, por lo que es importante encontrar maneras seguras y amigables con el ambiente para el control de estos patógenos. (Somboon, Purivirojkul, Limsuwan, & Chuchird, 2012)

El dióxido de cloro al ser un desinfectante, también se lo usa al agregarlo al agua potable para la eliminación de virus, bacterias o algún tipo de organismos como parásitos que puedan causar enfermedades al ser humano. La Agencia De Protección Ambiental (EPA) recomienda que la concentración máxima de dióxido de cloro que se debe usar para el tratamiento del agua potable no debe ser mayor a 0.8 ppm. (World Health Organization, 2017)

Los camarones, al igual que otras especies en el sector acuícola, son susceptibles a contraer enfermedades ya sea en la producción natural como también en la producción en camaroneras o en laboratorios. Muchas de estas enfermedades se desarrollan durante el proceso del cultivo de la especie, aunque en ciertos casos se puede contraer la enfermedad por agentes externos. En muchas ocasiones al no tener un protocolo de acción que elimine estos patógenos dentro de los medios de cultivo esto generará pérdidas económicas al sector. Es por ello que la implementación de nuevas

herramientas o vías para combatir patógenos o bacterias ayudarán a bajar la tasa de mortalidad en los cultivos ya sean en camaronas o en laboratorios de larvas de camarón. (Marcillo, 2003)

El dióxido de cloro puede ser usado para la desinfección del agua en piscinas camaronas como piscícolas (sin animales en el agua) con una concentración de 250 mg/l de  $\text{ClO}_2$  en el agua. Incluso materiales para los procesos de laboratorios de larvas, que necesitan una mejor limpieza y desinfección, pueden ser inmersos por al menos 1 hora en el agua con el producto agitando frecuentemente. Una dosificación continua de tan solo 3 mg/l no tiene ningún efecto adverso en la alcalinidad, salinidad, pH, OD del agua o en el fitoplancton, además de demostrar que una dosificación de 0.5 mg/l o menor es capaz de eliminar vibrios. (Flick, 2015)

En un estudio realizado por el Instituto de Ecología de la Universidad de Vilnius, Lituania en el año 2005, se analizaron los efectos de toxicidad del dióxido de cloro en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para determinar la sensibilidad de este organismo ante este compuesto y conocer las concentraciones máximas aceptables en los medios de cultivos ( $\text{LC}_{50}$ ) a exposiciones de 96 horas durante un periodo de 20 días. Los resultados obtenidos indicaron que para luego de 96 horas la dosis aceptada para larvas fue de 2.2mg/l, mientras que para etapas juveniles/adultos fue de 1.6 mg/l. (Gintaras Svecevičius, 2005)

Songsrichun et al. 2020, indico que en el camarón tigre (*Penaeus monodon*) se usó una concentración de 0.25 ppm de dióxido de cloro para la eliminación de algunas especies de Vibrios; así mismo, con una concentración de 0.75 ppm de dióxido de cloro pudo eliminar el virus de la mancha blanca (WSSV) y el virus de la cabeza amarilla (YHS) en un intervalo de dos horas. (Songsrichun, Songpradit, Thapuksorn, & Supamattaya, 2000)

El dióxido de cloro se emplea en una gran variedad de industrias, como la del gas, petróleo y alimentos. Por ejemplo, en la producción de alimentos y bebidas el dióxido de cloro se lo emplea en el agua actuando como un agente antimicrobiano para el procesamiento de aves de corral y para el lavado de todo tipo de alimentos que son para el consumo humano provenientes del sector agrícola. (Medina Guerra, 2020)

El dióxido de cloro también es empleado en hospitales y entornos sanitarios para esterilizar los equipos médicos y en laboratorios todo tipo de superficies, salas, habitaciones y herramientas. Estudios demuestran que usando las dosificaciones adecuadas el dióxido de cloro es seguro y eficaz para la eliminación de bacterias en áreas dentro de los hospitales (FDA, 2010). El dióxido de cloro es reconocido por la FDA

como un agente oxidante antimicrobiano. Este químico por ser un rápido degradante durante su uso, no es considerado como una preocupación tóxica de acuerdo con la determinación del GRAS (Generally Recognized as Safe). Además de ser aceptado, es usado directamente para el tratamiento de desinfección de frutas y vegetales con una solución de 3 ppm o menor, y también para la desinfección de las superficies de las industrias elaboradoras de alimentos. (Selective Micro Technologies, 2017)

## **1.2 Justificación del problema**

El dióxido de cloro posee la capacidad de eliminar microorganismos en medios acuáticos incluyendo propagaciones bacterianas, fúngicas, esporas y virus. Posee alta capacidad de absorber y penetrar las paredes celulares y puede inhibir rápidamente la síntesis de proteínas para la destrucción de microorganismos. Estudios científicos han demostrado que no es dañino para las especies acuáticas cuando es utilizado en dosis adecuadas. Debido a la presencia constante de Vibriosis y otros agentes patógenos en el sector acuícola, el emplear dióxido de cloro bajo ciertos criterios y correctas dosificaciones podría ser una alternativa para contrarrestar la vibriosis en el cultivo de camarón a partir de postlarvas. Además, se eliminaría el uso de antibióticos y otros químicos que pueden no ser amigables con el ambiente.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Determinar la toxicidad del dióxido de cloro en postlarvas de camarón *P. vannamei* y analizar la factibilidad de utilizar el compuesto para controlar *vibrios sp.* en los cultivos de camarón.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la toxicidad del dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) en concentraciones de hasta 2 ppm durante 24 horas en postlarvas de camarón *P. vannamei*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de dióxido de cloro para el *Vibrio parahaemolyticus*.
- Determinar la pertinencia o no del uso de dióxido de cloro para controlar vibriosis en cultivos postlarvas de camarón.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Especie *Penaeus vannamei*

El camarón blanco del pacífico de la familia *Penaeus*, es la principal especie de cultivo en las costas del Ecuador, en donde casi el 100% de la producción le corresponde a la especie *Penaeus Vannamei*, debido a que es una de las especies más resistentes a cambios ambientales durante su proceso de desarrollo en cautiverio. (Gonzabay-Crespin, Vite-Cevallos, Garzón-Montealegre, & Quizhpe-Cordero, 2021)

El camarón blanco es originario de la costa del océano Pacífico, que recorre desde Sonora, México en el norte, hacia centro y Sudamérica hasta el Perú, en agua donde la temperatura normalmente oscila entre los 24 a 27 a grados centígrados durante la mayor parte del año. La especie *Penaeus Vannamei* se la localiza en ambientes marinos tropicales. Esta especie en etapas adultas vive y se reproduce en mar abierto, mientras que en etapas larvarias migra normalmente a las costas para pasar su desarrollo juvenil. Su etapa juvenil y pre adulta se puede encontrar en estuarios, manglares o en lagunas costeras. (Anaya Rosas, 2005)

#### 1.4.1.1 Clasificación Taxonómica

El camarón blanco taxonómicamente se encuentra en el *phylum* artrópoda ya que posee patas articuladas y dentro de la clase crustácea por que posee un caparazón externo o exoesqueleto. Perteneciente al orden Decápoda por poseer 5 pares de patas caminadoras. (FAO, 2009)

Reino: *Animalia*

Filo: *arthropoda*

Subfilo: *Crustacea*

Clase: *Malascostraca*

Orden: *Decapoda*

Suborden: *Dendrobranchiata*

Infraorden: *Caridea*

Familia: *Penaeidae*

Género: *Litopenaeus*

Especie: *P. vannamei*

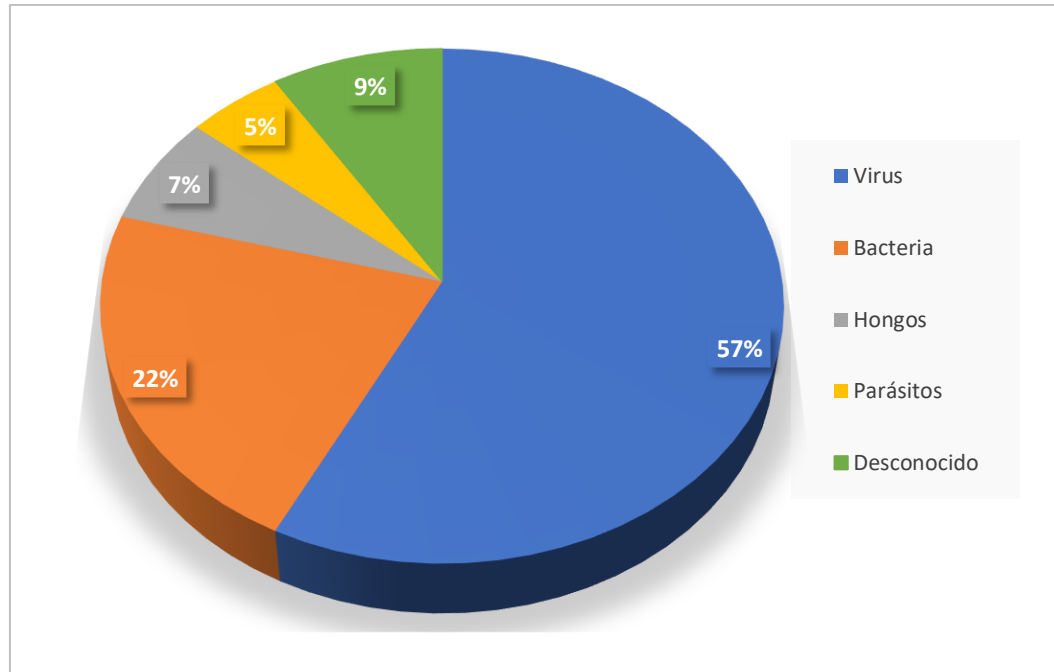
### 1.4.2 Bacterias patógenas en la Acuicultura

En sistemas acuáticos, la población bacteriana posee un papel importante en la descomposición de materia orgánica y en el reciclaje de nutrientes; sin embargo, el sector acuícola cada vez se desarrolla más, intensificando su producción usando en mayores proporciones aditivos, compuestos orgánicos, disminución en las tasas de recambio de agua, incremento en la densidad de siembra y un mayor uso de alimento. Cada uno de estos aspectos son factores que crean un ambiente propicio para el crecimiento de variedad microbiana tanto patógena como oportunista. (Varela & Choc-Martínez, 2020)

El crecimiento de la población microbiana patógena actualmente es la mayor causante del incremento de mortalidad en los medios de cultivos y por ende de pérdidas económicas por problemas de malos protocolos que contrarresten estas enfermedades. De estas bacterias las del género *Vibrio* son las principales causantes de altas pérdidas en la producción del camarón. Estudios realizados en el 2020 afirman que tanto EE. UU. y Asia perdieron cerca de 6 a 8 mil millones de dólares por infecciones de camarón con AHPND, enfermedad que es producida por una toxina que genera ciertas cepas de *Vibrio parahaemolyticus*. (Figueredo, y otros, 2020)

Tabla 1.1 Pérdidas económicas estimadas en camaronicultura causadas por algunas de las enfermedades más importantes. (Figueredo, y otros, 2020)

Enfermedad	Región		Totales (millones)
	América	Asia	
IHHNV	500 – 1.000		500 – 1.000
TSV	2.000	1.2000	3.200
WSSV	Mas de 2.000	Mas de 6.000	Mas de 8.000
YHV	ND	500	500
IMNV	ND	ND	1.200
AHPND	ND	ND	Mas de 6.000
EHP	ND	ND	1.000



**Ilustración 1.2 Participación de los principales grupos patógenos en pérdidas económicas de la industria camaronera. (Figueredo, y otros, 2020)**

### 1.4.2 Género *Vibrio*

La familia *Vibrionaceae* está formada por bacilos gramnegativos que pueden tener o no motilidad, y entre ellas tenemos 3 géneros que son: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo entorno natural son los ecosistemas marinos y fluviales. Son bacterias motiles, crecen en agar nutritivo incubadas a temperaturas de 35 grados centígrados en atmosfera aerobia y anaerobia. Este género posiblemente es el conjunto bacteriano más común presente en los medios acuícolas (cultivos de camarón). Consta de 130 especies confirmadas de las cuales 12 de ellas tiene la capacidad de infectar a humanos y 7 de ellas son vibrios patógenos de los más comunes que infectan a los sistemas de cultivos. (Figueredo, y otros, 2020)

En la tabla 1.2 se aprecia las principales enfermedades que los camarones de la familia *Penaeidos* ha sufrido a través de los años, donde podemos observar las causadas por vibrios.

**Tabla 1.2 Cronología global de las principales enfermedades infecciosas en camarones *Penaeidos*. (Figueredo, y otros, 2020)**

Año	Lugar	Enfermedad	Agente etiológico	Tipo de patógeno
-----	-------	------------	-------------------	------------------

1971	Texas, EEUU	Micosis larval	<i>Lagenidium sp.</i>	Fúngico
1974	Florida, EEUU	Baculovirus tetraédrica	<i>Baculovirus penaei</i> (BP)	Viral
1975	Georgia, EEUU	Enfermedad del camarón Algodonoso	Microsporidios	Fúngico
1978	Florida, EEUU	Infección por bacterias filamentosas	<i>Leucothrix mucor</i>	Bacteriano
1980	México	Baculovirus esférica	MBV	Viral
1981	Hawái, EEUU	Necrosis hipodérmica y Hematopoyectica infecciosa	IHHNV	Viral
1981	Japón	Necrosis Baculoviral de la glándula digestiva	BMN	Viral
1982	Tailandia	Gregarinosis	<i>Nematopsis spp.</i>	Protista
1982	Tailandia	Fusariosis	<i>Fusarium solani</i>	Fúngica
1985	Malasia	Parvovirus hepatopancreática	HPV	Viral
1988	Cuba	Haplosporidiosis hepatopancreática	HPH	Protista
1989	Ecuador	Necrosis séptima de la hepatopáncreas	SHPN	Bacteriano
1990	Texas, EEUU	Hepatopancreatitis necrotizante	<i>Hepatobacter penaei</i> (NHP)	Bacteriano
1991	Tailandia	Virosis de la cabeza amarilla	YHV	Viral
1992	Australia	Virosis vacuolizante del órgano linfoide	LOVV	Viral
1992	Ecuador	Virosis del síndrome de Taura	TSV	Viral
1993	Japón	Enfermedad de las manchas blancas	WSSV	Viral
1993	Texas, EEUU	Gregarinosis larval	<i>Paraophiodina scolecoides</i>	Protista
1996	Australia	Virosis de Mourilyan	MoV	Viral
1996	Australia	Virosis de la mortalidad de los reproductores	SMV	Viral
1996	Australia	Virosis asociada a las branquias	GAV	Viral
2002	Brasil	Mionecrosis infecciosa	IMNV	Viral
2002	China	Nodaviriosis de la mortalidad encubierta	CMNV	Viral
2003	Tailandia	Microsporidiosis hepatopancreática	<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> (EHP)	Fúngico
2004	Belice	Nodavirus de <i>Penaeus vannamei</i>	PvNV	Viral
2004	Colombia	Espiroplasmosis	<i>Spiroplasma penaei</i>	Bacteriano



2008	Tailandia	Enfermedad de la deformidad del segmento abdominal	Desconocido (ASDD)	Idiopático
2008	Guatemala	Estreptococosis	<i>Streptococcus sp.</i>	Bacteriano
2009	China	Enfermedad de la necrosis agua de la hepatopáncreas	AHPND	Bacteriano
2014	China	Iridovirus de hemocitos del camarón	SHIV	Viral
2016	Norteamérica	Infección amebiana	<i>Paramoeba sp.</i>	Protista

#### 1.4.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Los miembros del género *Vibrio* se han convertido en una de las limitaciones más importantes en la producción y comercio de la industria del camarón. Son las responsables de varias enfermedades y mortalidades de hasta el 100% en la producción. Estas infecciones se generan frecuentemente en criaderos, aunque también existen casos en piscinas de engorde. (Brock, 2009)

Las infecciones por vibriosis se las conocen como enfermedad del caparazón negro, necrosis hepatopancreática, putrefacción de la cola, branquias marrones, síndrome del intestino posterior y enfermedad bacteriana luminiscente. (Brock, 2009)

Algunos de los signos clínicos de una infección por vibrios en camarón son:

Pérdida del apetito, necrosis en los túbulos del hepatopáncreas, branquias amarillas y en algunos casos luminiscencia (Brock, 2009).

El *vibrio parahaemolyticus* es un bacilo gram negativo, aerobio, fermentador de glucosa, no de sacarosa, oxidasa positiva y ureasa variable, por lo que se requiere de medios selectivos salinos para su desarrollo. (ACHIPIA, 2017)

Tabla 1.3 Límites para el crecimiento del *Vibrio parahaemolyticus* y su condición óptima. (ACHIPIA, 2017)

Variables	Min-Max	Óptimo
Temperatura °C	5-43	37
pH	4.8-11	7.8-8.6
Actividad de agua	0.94-0.996	0.98

### **1.4.3 Concentración mínima inhibidora (MIC)**

Según los laboratorios IDEXX, el MIC es la concentración más baja en la que una sustancia inhibe el desarrollo y crecimiento de una cepa bacteriana determinada. Esta prueba cuantitativa es usada mayormente en la determinación de antibióticos más efectivos, dando una decisión adecuada en cuanto al tratamiento de infecciones, así obtener una mayor probabilidad de éxito, además de ayudar contra la resistencia a los antibióticos. (IDEXX, 2022)

El valor crítico de una sustancia se define como la dilución más baja donde la bacteria muestra resistencia. No se puede comparar diferentes valores de MIC, sino en la diferencia que hay entre MIC y el valor crítico. (IDEXX, 2022)

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

Para la fase experimental del presente proyecto ya sea en la fase de desinfección, construcción o armado del sistema se emplearon los siguientes materiales los cuales están desglosados por: número de unidades, material y características del material en la siguiente tabla.

### Materiales

Tabla 2.1. Cantidad y descripción de los materiales usados en el proyecto.

CANTIDAD	MATERIALES Y EQUIPOS	CARACTERÍSTICA
16	Acuarios de policarbonato (especiales para realizar bioensayos)	Capacidad de 9 litros
2	Aireadores JAD S-4000B	Con 4 salidas de aire c/u
10 m	Manguera de plástico para acuario JAD	Diámetro interno de 4 mm y externo de 6 mm
8	Acoples en forma de T plásticas	Se usan para la subdivisión de las líneas de aire para cada bandeja
20	Piedras difusoras	Esférica de 5 cm
2	Tanques ovalados	Capacidad de 750 litros. Usados como reservorio de agua. Rotulados tanques 1 y 2
1	Rollo plástico	Envolver las tapas de las bandejas
1	Regleta	Con 6 enchufes
2	Cobertores de tela	Largo: 2.00 m, Ancho: 1.50 m
1	Frasco de catalizador	El catalizador hace que el dióxido de cloro reaccione más rápido
1	Dióxido de cloro	ClO <sub>2</sub>
500 g	Funda de detergente Deja	Limpia el material sin afectar el material sometido
1	Cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Aislada e identificada mediante PCR
1	Rollo de cinta	De papel
2	Plumas	Color negro
1000	Post larvas de camarón	<i>Penaeus vannamei</i> pl14
100 g	Alimento balanceado	300-500 micras (dieta comercial)
1000 l	Agua marina tratada	Proporcionada por el laboratorio
1	Fotómetro HI97738	Medidor de ClO <sub>2</sub> HANNA Instruments
2	Lavacaros	Plásticas de color naranja
2	Tachos	Plásticos

1	Solución APA	Medio de cultivo líquido
4	Calentadores de acuario RS200-W	Calefactor para acuarios tropicales
1	Balanza analítica	Para medir el balanceado a proporcionar
4	Focos incandescentes	Irradia calor a partir de la corriente eléctrica
40 g	Vitamina C	Eliminación de cloro en el agua
1	Placa de cultivo para bioensayo	De 92 pocillos
1	Funda de cucharas plásticas	
2	Tamiz de ojo pequeño	
1	Termómetro	
2	Lámparas HOMELIGHT	
4	Fanelas	
1	Extensión eléctrica	
1	Manguera de jardín	
1	Mechero bunsen	
1	Autoclave	

## 2.1 Desinfección general de materiales y equipos

Se llenaron los tanques reservorios 1 y 2 con agua potable y se desinfectaron usando solución de cloro al 5%. Las bandejas se limpiaron con detergente y franelas de cocina, una vez enjuagadas se sumergieron en los tanques con solución de cloro al 5%. Todos los materiales usados se enjuagaron con la mezcla de cloro de los tanques y se los dejó secar a la intemperie para eliminar la presencia del cloro y realizar el diseño experimental del sistema. Luego de la desinfección, se retiró el agua de los tanques y se los enjuagó con agua tratada con vitamina C para eliminar el cloro residual. Un gramo de vitamina C neutraliza 1 ppm de cloro en 455 litros de agua. (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2006)

## 2.2 Diseño experimental del bioensayo

Para el diseño experimental del proyecto se usaron 16 acuarios (9 litros de capacidad c/u) sin aireación, que se colocaron en el mesón del Laboratorio de Piscicultura con una disposición de ocho por lado. Para incrementar la temperatura del laboratorio se usaron dos mecanismos: a) dos lámparas de luz incandescente y b) agua caliente obtenida mediante la introducción de dos calentadores de acuario en la misma cantidad de baldes plásticos de 20 litros cada uno.

Se muestra el diseño experimental en la ilustración 0.1. Cabe destacar que cada una de las bandejas experimentales se hallaban con sus respectivas tapas evitando así el ingreso de polvo o de algún cuerpo extraño al sistema como también el reservorio se encontraba cubierto con los cobertores de tela evitando así mismo cualquier contaminación externa, como se observa en la ilustración 0.2.

### **2.3 Obtención de los animales, agua y balanceado**

En el ensayo se usaron postlarvas de camarón *P. vannamei*, en estadio PI14 donadas por un laboratorio de larvas ubicada en el sector la Diablica, en la Provincia de Santa Elena. Este laboratorio acuícola se dedica a la producción y venta de postlarvas de camarón blanco.

La empresa nos proporcionó además el agua para los reservorios, las postlarvas (PI14) de camarón y el balanceado con las siguientes especificaciones:

#### **2.3.1 Agua**

El agua tratada de la siguiente manera:

1. Para la desinfección del agua se suministraron 60 ml de cloro por tonelada de agua y se la dejó recirculando por aproximadamente 3 horas.
2. Pasado las 3 horas se procedió a agregar 10 g de vitamina c y 2 g de Tiosulfato sódico pentahidratado por tonelada de agua para eliminar la presencia de cloro en el medio. Luego de este proceso se dejó recirculando el agua durante 3 horas más para así tener ya el agua lista para los tanques de cultivos para los futuros recambios. (*información suministrada por el Gerente Técnico del laboratorio de postlarvas*).

#### **2.3.2 Postlarvas de camarón (*Penaeus vannamei*)**

Para la obtención de las postlarvas se coordinó con el laboratorio de larvas, en base a su cronograma de cultivo y de desarrollo larvario un día en específico en que nos pudieran proporcionar postlarvas de camarón de la especie (*Litopenaeus vannamei*) de PI14. Sabemos que estos organismos se estresan fácilmente, ya sea por el

transporte, falta de oxígeno, temperatura y otros parámetros los cuales podrían causar mortalidad.

### 2.3.3 Balanceado

El balanceado constó de la composición de la combinación del 33% de tres dietas diferentes, las cuales fueron las siguientes:

1.- LARVAMAX (6.6 kg)

Tabla 2.2 Composición del balanceado LARVAMAX.

Criterio	Porcentaje
Humedad	11%
Proteína	42%
Grasa	5%
Ceniza	12%
Fibra	5%
Tamaño	300-500 micras

2.- LARFEED (6.6 kg)

Tabla 2.3 Composición del balanceado LARFEED.

Criterio	Porcentaje
Humedad	8%
Proteína	50%
Grasa	12%
Ceniza	17%
Fibra	2%
Tamaño	300-500 micras

3.-ZEIGLER (6.6 kg)

Tabla 2.4 Composición del balanceado ZEIGLER.

Criterio	Porcentaje
Humedad	6%
Proteína	55%
Grasa	15%
Ceniza	15%
Fibra	1.5%
Tamaño	300-500 micras

La dieta usada para las postlarvas de camarón PI 14 en todo su proceso fue la mezcla de las tres dietas comerciales de alta concentración proteica.

#### **2.4 Determinación del dióxido de cloro en el agua**

Se realizaron diferentes pruebas para medir la concentración de este químico mediante el kit del fotómetro del dióxido de cloro modelo HI97738 de la marca Hanna instruments.

Se usaron dos tubos cilíndricos graduados (#1 y #2) con 25 ml de muestra en cada uno, de ahí se agregó 0.5 ml del reactivo A, se los tapó y agitó 5 veces. Luego, se agregó el paquete de reactivo B en el tubo #1, se lo tapó y agitó 5 veces. Después, a los dos tubos se le agrega 5 ml del reactivo C, se los tapó y agitó 5 veces. Posteriormente, se les agregó 5 ml del reactivo D a ambos tubos, se los tapó y agitó 5 veces. A continuación, Se colocó 10 ml del tubo #1 en la cubeta A, la que se tapó y se introdujo en el fotómetro. En el fotómetro se presionó “zero” para calibrar en cero. Finalmente, se colocó 10 ml del tubo #2 en la cubeta B, la que se tapó y se introdujo en el fotómetro, se presiona “read” y el fotómetro nos proporciona la medición del dióxido de cloro de la muestra en la unidad de concentración de mg/l. (HANNA Instruments, s.f.)

#### **2.5 Aclimatación de las postlarvas**

La funda en la que fueron transportadas las larvas se la abrió y se colocó el contenido en un acuario, se midió la temperatura y el oxígeno disuelto del agua de las postlarvas como también la del agua que se usó para la aclimatación. Se le introdujo una manguera con piedra difusora para airear la bolsa y se comenzó la aclimatación retirando 1 litro del agua de la pecera y añadiendo 1 litro del agua marina tratada, se esperó 30 minutos y se volvió a retirar y añadir otro litro de agua, así consecutivamente hasta realizar un recambio de agua del cien por ciento y el agua de la pecera sea la misma que la de las bandejas. Se alimentó y espero 30 minutos para visualizar la actividad de las larvas. Luego, se introdujo el tamiz, se pescaron las larvas y se las colocaron en las lavacaros para contabilizarlas con la ayuda de dos inyecciones con la punta doblada. Una vez que se contaron 30 larvas, se las

introdujo en una bandeja y se sigue contando hasta que se situaron 30 larvas en cada bandeja.

El agua marina tratada y la funda con las larvas provienen del mismo laboratorio, por lo que no se tomó en cuenta la salinidad de estas.

## **2.6 Determinación de la toxicidad del ClO<sub>2</sub>**

En los acuarios ya rotuladas se les agregó 4 litros del agua marina tratada, se colocó aireación y se dejó funcionando el sistema por tres días. Se realizaron 4 tratamientos de concentraciones diferentes, el primer tratamiento fue el control, con 0 mg/l de dióxido de cloro; y los otros tratamientos fueron de 1, 1.5 y 2 mg/l o ppm de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). Se realizaron 4 réplicas de cada prueba y se las colocó en diferentes ubicaciones del mesón para garantizar la aleatoriedad de la prueba. Se introdujo 30 postlarvas en cada acuario, dando un tiempo de adaptación de dos horas antes de realizar la experimentación. Los ensayos de toxicidad tuvieron una duración de 24 horas, con alimentación cada 3 horas de 30 mg, sin aireación y sin recambio de agua. Se determinó la concentración de dióxido de cloro mediante el fotómetro HI97738 y se contabilizó las larvas muertas mediante la observación. Se realizaron las mediciones con el fotómetro cada 10, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos. Con las postlarvas en los acuarios, se le introdujo la concentración de dióxido de cloro estipulado para cada acuario y se observó la concentración del químico en el agua y la mortalidad en los tiempos que se realizaron las mediciones.

## **2.7 Concentración mínima inhibidora (MIC)**

Para el desarrollo de este procedimiento necesitaremos los siguientes materiales:

- 50 ml de agua peptona
- 50 ml de solución salina de NaCl al 5% de NaCl
- Dióxido de cloro
- Microplacas de cultivo celular
- Pipetas de 20-200 µl, 100-1000 µl, 0.5-20 µl
- Placas de agar TSA al 2% de NaCl
- Tubos de 1.5 ml
- Tubos de ensayo



## Medio de cultivo

Para las soluciones que se colocarán en cada tubo de 1,5 ml en base a las concentraciones, seguiremos la siguiente tabla: (Irith Wiegand, 2008)

**Tabla 2.5 Concentraciones del dióxido de cloro y cantidades de cada compuesto. (Martínez y Segura, 2022)**

Concentración ppm	Agua peptona ul	Solución salina 0.5% NaCl ul	Ácido orgánico ul	Volumen final ul
2	900	220	80	1200
1.75	900	230	70	1200
1.50	900	240	60	1200
1.25	900	250	50	1200
1.00	900	260	40	1200
0.75	900	270	30	1200
0.50	900	280	20	1200
0.25	900	290	10	1200
0.20	900	292	8	1200
0.15	900	294	6	1200

La mezcla de los componentes mencionados se realizó en un tubo de 1,5ml, donde se colocó un volumen fijo de 900ul de agua de peptona al 2% de NaCl, dejando como volumen variable 300ul comprendido entre solución salina al 2% de NaCl y una solución de dióxido de cloro a 30 ppm. Los cálculos de los volúmenes variables de dióxido de cloro se realizaron utilizando la ecuación EQ 2.1.

$$(2.1) \quad C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$
$$C_1 * 300 \text{ ul} = 2 \text{ ppm} * 1200 \text{ ul}$$
$$C_1 = 8 \text{ ppm}$$

Transcurridas las 24 horas de incubación, se observó la turbidez de cada uno de los pocillos inoculados, indicativo de crecimiento bacteriano. La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la menor concentración en la cual no se obtuvo crecimiento bacteriano (no se observó turbidez). (Becton, Dickinson and Company, 2010)

- Si se observa turbidez es un indicativo de que la concentración del dióxido de cloro no fue suficiente para detener el crecimiento bacteriano, por ende, a esta concentración se la denominará R de resistente.
- Si no se observa turbidez puede indicar que la concentración del dióxido de cloro ha detenido el crecimiento de forma total o parcial de las cepas bacterianas.

Después se analiza si la concentración en la que no hubo crecimiento actúa como bactericida o bacteriostático.

- Bactericida: Si el dióxido de cloro ha provocado la muerte de la bacteria.
- Bacteriostático: Si la bacteria en presencia del dióxido de cloro solo ha detenido su crecimiento celular, sin embargo, si ya no se encuentra en contacto esta puede retomar su crecimiento normal.

Se procedió a rotular la tercera y cuarta fila, cada fila de la placa de cultivo celular de 96 pocillos, cada fila con 12 pocillos, las secciones de las concentraciones que íbamos analizar para así tener una mejor interpretación de los datos y observar si había o no crecimiento bacteriano, La confirmación del efecto bacteriostático o bactericida se realizó pasando una muestra con un asa de horquilla desde los pocillos en donde no se observó turbidez a una placa de TSA al 2% de NaCl; y se dejó incubando durante 24 horas a 35°C (ver ilustraciones 0.9, 0.10 y 0.11).

Luego del tiempo de incubación, se observó el crecimiento bacteriano en las placas de TSA al 2% de NaCl. Los resultados obtenidos en base al crecimiento se analizaron junto con lo obtenido en la placa de siembra líquida de la primera parte del MIC.

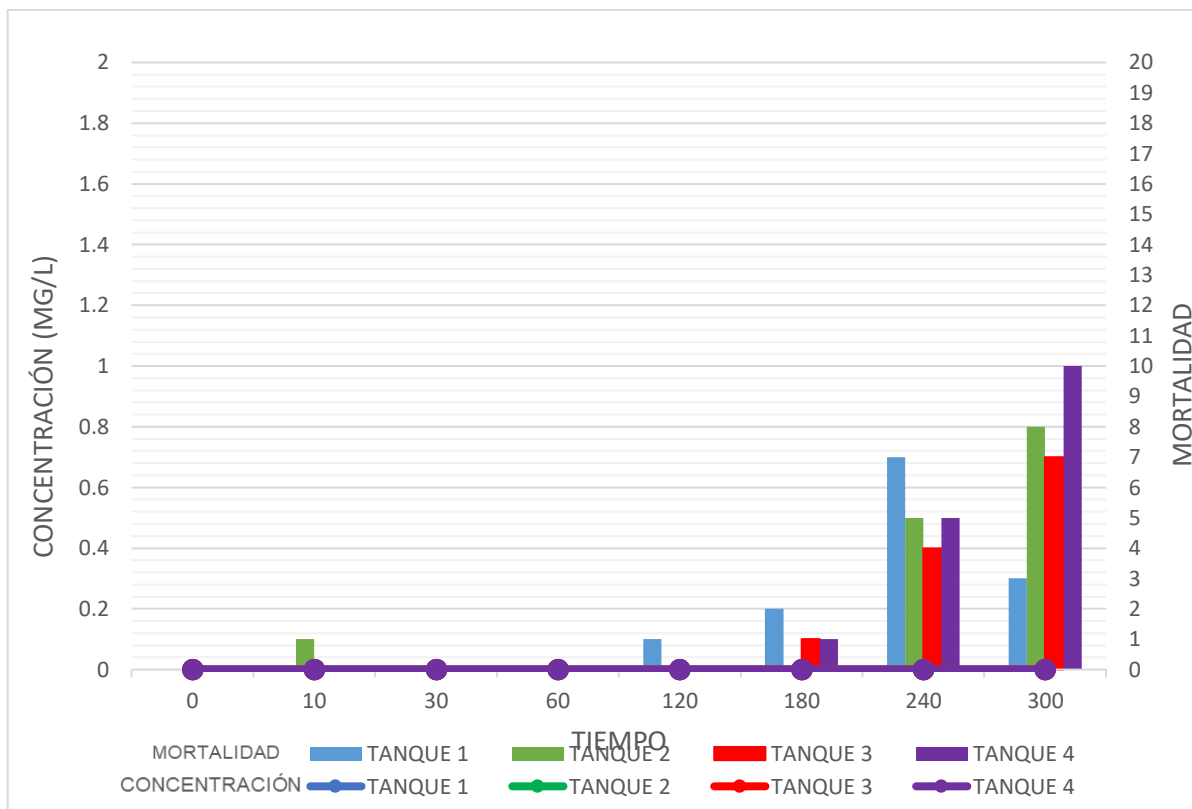
# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Resultados de la toxicidad del ClO<sub>2</sub>

Tabla 3.1 Acuarios de control de tiempo en minutos versus mortalidad. (Martínez & Segura, 2022)

CONTROL		
	TIEMPO (min)	MORTALIDAD
ACUARIO 1	10	0
	30	0
	60	0
	120	1
	180	2
	240	7
	300	3
ACUARIO 2	TIEMPO (min)	MORTALIDAD
	10	1
	30	0
	60	0
	120	0
	180	0
	240	5
300	8	
ACUARIO 3	TIEMPO (min)	MORTALIDAD
	10	0
	30	0
	60	0
	120	0
	180	1
	240	4
300	7	
ACUARIO 4	TIEMPO (min)	MORTALIDAD
	10	0
	30	0
	60	0
	120	0
	180	1
	240	5
300	10	



**Ilustración 3.1 Gráfica de la mortalidad versus tiempo del grupo control (no expuesto al ClO<sub>2</sub>) en la columna de agua. (Martínez & Segura, 2022)**

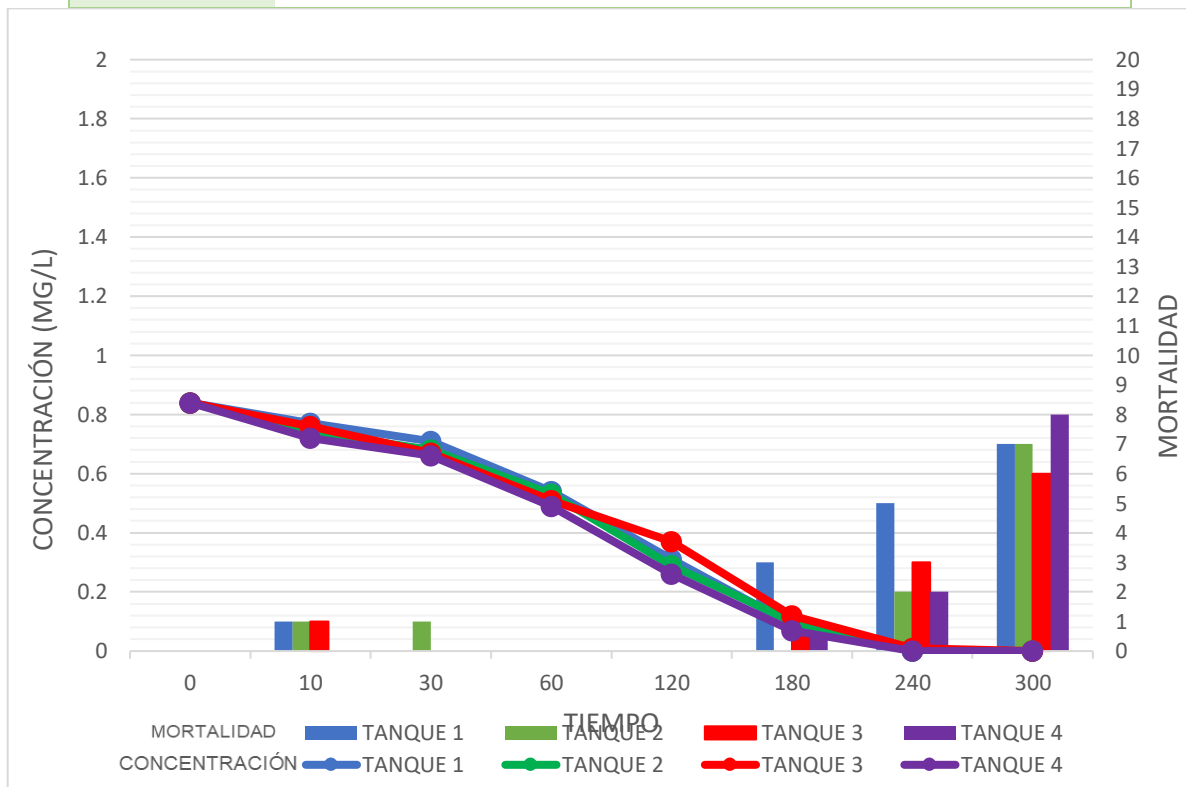
Se observó mortalidad en todos los tratamientos, incluido el control, a partir de los 120 minutos de experimentación, que podrían estar relacionados a factores externos como la presencia de residuos de alimento, falta de oxígeno y recambio de agua.

**Tabla 3.2 Concentración de 1 mg/l de ClO<sub>2</sub> versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida.**

\* animales muertos debido a otros parámetros y no por la presencia de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). (Martínez & Segura, 2022)

Concentración 1 mg/l (I <sub>0</sub> = 0.84 mg/l)			
	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mg/l)	MORTALIDAD
ACUARIO 1	10	0.77	1
	30	0.71	0
	60	0.54	0
	120	0.31	0
	180	0.09	3*
	240	0.00	5*
	300	0.00	7*
ACUARIO 2	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mg/l)	MORTALIDAD
	10	0.74	1

	30	0.68	1
	60	0.53	0
	120	0.29	0
	180	0.10	0
	240	0.00	2*
	300	0.00	7*
ACUARIO 3	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mg/l)</b>	<b>MORTALIDAD</b>
	10	0.76	1
	30	0.67	0
	60	0.51	0
	120	0.37	0
	180	0.12	1*
	240	0.01	3*
	300	0.00	6*
ACUARIO 4	<b>TIEMPO (min)</b>	<b>CONCENTRACIÓN (mg/l)</b>	<b>MORTALIDAD</b>
	10	0.72	0
	30	0.66	0
	60	0.49	0
	120	0.26	0
	180	0.07	1*
	240	0.00	2*
	300	0.00	8*



**Ilustración 3.2 Gráfica de la concentración 1 mg/l de  $\text{ClO}_2$  y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022)**

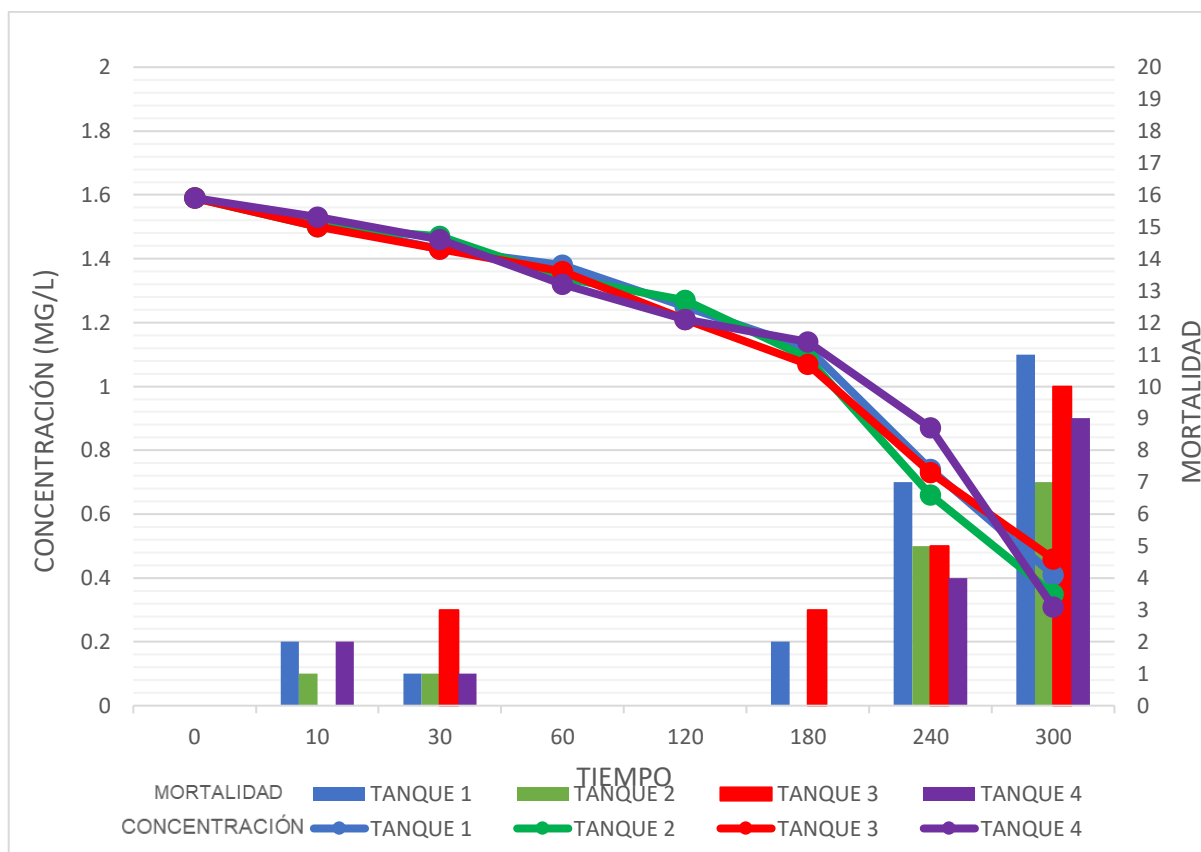
Observando los resultados de la tabla e ilustración 3.2, la concentración de  $\text{ClO}_2$  no produjo mortalidades significativas (nivel de confianza del 95%) en la población de postlarvas, la mayor mortalidad observada fue de 6.67% ocurriendo solo en el acuario 2

hasta las dos horas de exposición al ClO<sub>2</sub>. Mediante un análisis estadístico se comprobó que los animales muertos después de los 120 minutos de estar en exposición del químico se deben a otro/s factor/es que no fuera el ClO<sub>2</sub>, por lo que las muertes después de ese tiempo no se las contabilizaron para la mortalidad total por dióxido de cloro. El análisis estadístico se observa en el capítulo 3.3.

Tabla 3.3 Concentración de 1.5 mg/l de ClO<sub>2</sub> versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida.

\* animales muertos debido a otros parámetros y no por la presencia de dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>). (Martínez & Segura, 2022)

Concentración 1.5 mg/l (I0= 1.59 mg/l)			
	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mg/l)	MORTALIDAD
ACUARIO 1	10	1.51	2
	30	1.43	1
	60	1.38	0
	120	1.25	0
	180	1.12	2*
	240	0.74	7*
	300	0.41	11*
ACUARIO 2	10	1.50	1
	30	1.47	1
	60	1.34	0
	120	1.27	0
	180	1.09	0
	240	0.66	5*
	300	0.35	7*
ACUARIO 3	10	1.50	0
	30	1.43	3
	60	1.36	0
	120	1.21	0
	180	1.07	3*
	240	0.73	5*
	300	0.46	10*
ACUARIO 4	10	1.53	2
	30	1.46	1
	60	1.32	0
	120	1.21	0
	180	1.14	0
	240	0.87	4*
	300	0.31	9*



**Ilustración 3.3 Gráfica de la concentración 1.5 mg/l de  $\text{ClO}_2$  y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022)**

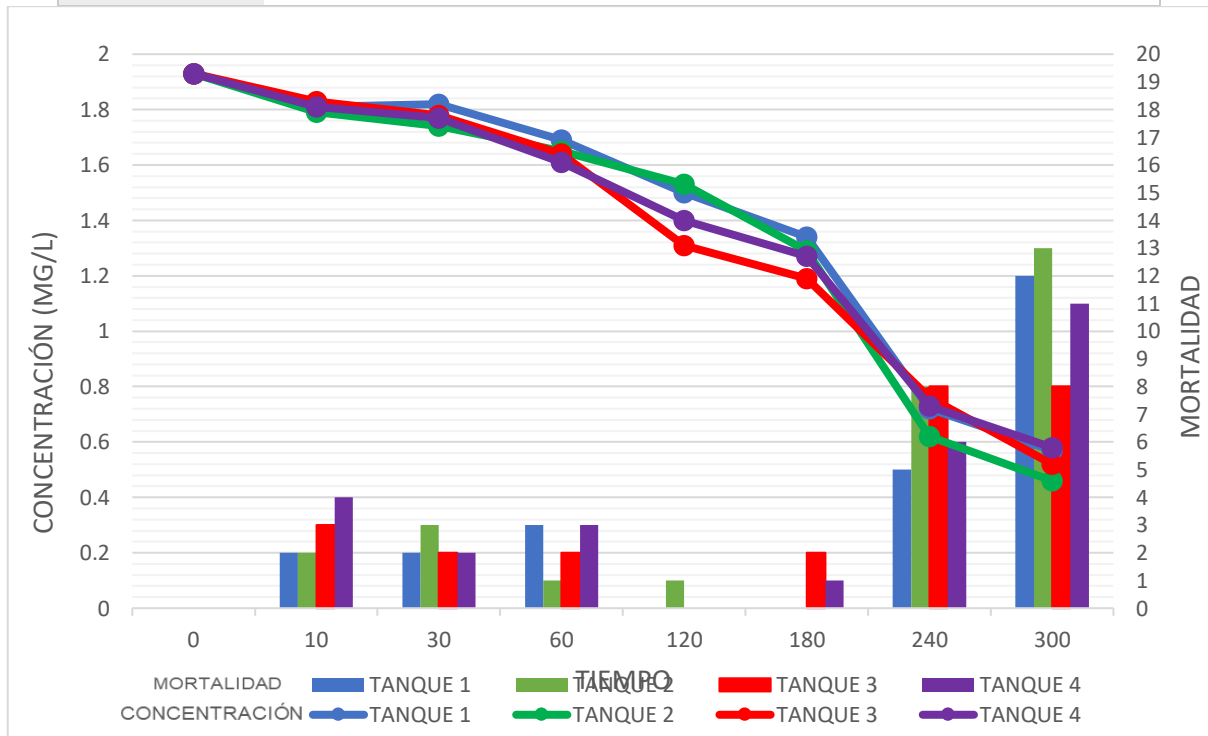
Observando los resultados de la tabla 3.3, la concentración de  $\text{ClO}_2$  no produce mortalidades mayores al 10% de la población durante la exposición a este químico por una duración de 2 horas. Mediante un análisis estadístico se comprobó que los animales muertos después de los 120 minutos de estar en exposición del químico que se deben a otro/s factor/es que no fuera el  $\text{ClO}_2$ , por lo que las muertes después de ese tiempo no se las contabilizaron para la mortalidad total por dióxido de cloro. El análisis estadístico se observa en el capítulo 3.3.

**Tabla 3.4 Concentración de 2 mg/l de  $\text{ClO}_2$  versus el tiempo en minutos y la mortalidad obtenida.**

\* animales muertos debido a otros parámetros y no por la presencia de dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ). (Martínez & Segura, 2022)

Concentración 2 mg/l ( $I_0 = 1.93$ mg/l)			
	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mg/l)	MORTALIDAD
ACUARIO 1	10	1.81	2
	30	1.82	2
	60	1.69	3
	120	1.50	0
	180	1.34	0
	240	0.72	5*

	300	0.57	12*
	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (mg/l)	MORTALIDAD
ACUARIO 2	10	1.79	2
	30	1.74	3
	60	1.65	1
	120	1.53	1
	180	1.29	0
	240	0.62	8*
	300	0.46	13*
ACUARIO 3	10	1.83	3
	30	1.78	2
	60	1.64	2
	120	1.31	0
	180	1.19	2*
	240	0.76	8*
	300	0.52	8*
ACUARIO 4	10	1.81	4
	30	1.77	2
	60	1.61	3
	120	1.40	0
	180	1.27	1*
	240	0.73	6*
	300	0.58	11*

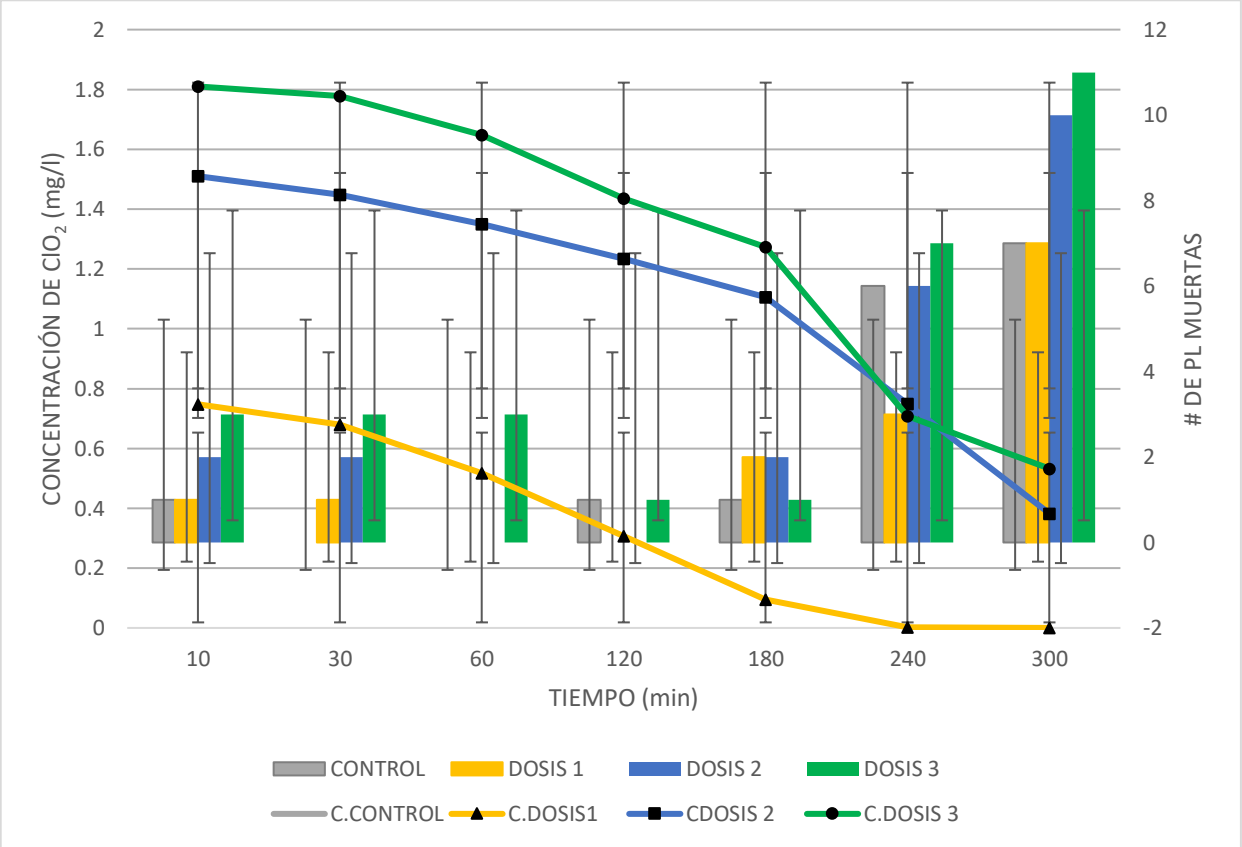


**Ilustración 3.4** Gráfica de la concentración 2 mg/l de  $\text{ClO}_2$  y mortalidad versus el tiempo de exposición. (Martínez & Segura, 2022)

Observando los resultados de la tabla e ilustración 3.4, la concentración de  $\text{ClO}_2$  no produce mortalidades mayores al 23% de la población. Mediante un análisis estadístico



se comprobó que los animales muertos después de los 120 minutos de estar en exposición del químico que se deben a otro/s factor/es que no fuera el ClO<sub>2</sub>, por lo que las muertes después de ese tiempo no se las contabilizaron para la mortalidad total por dióxido de cloro. El análisis estadístico se observa en el capítulo 3.3.



**Ilustración 3.5 Gráfica de la concentración promedio de ClO<sub>2</sub> vs promedio de la mortalidad vs tiempo.**

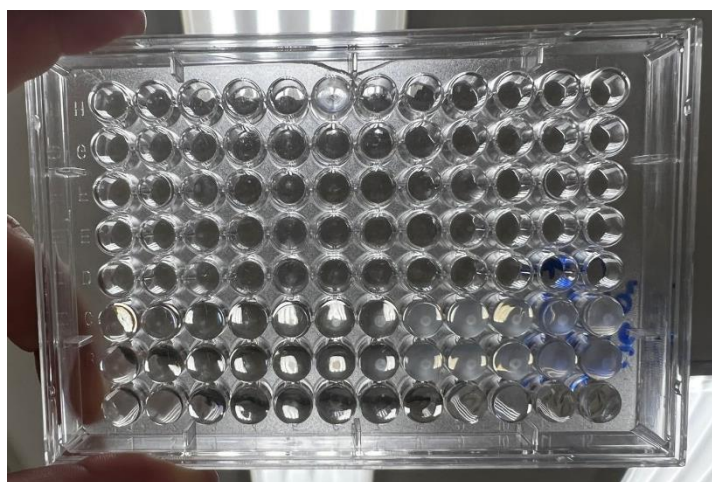
En la ilustración 3.5 se observa el promedio de la concentración de ClO<sub>2</sub> y la cantidad de muertos de las dosis y control con sus respectivas replicas. Se aprecia como la concentración de dióxido de cloro (líneas en la gráfica) decrece a medida que pasa el tiempo, las mortalidades (columnas en la gráfica) antes del minuto 120 son mínimas, ya que después del minuto 120 se comprobó mediante el análisis estadístico que las muertes son ocasionadas por otro/s factor/es ajenos al químico dióxido de cloro. También tenemos la desviación estándar de los parámetros, que demuestran que los datos son dispersos con respecto a la media de la población.

### 3.2 Resultados MIC

Resultados de crecimiento bacteriano en el medio de agua peptona se observan en la tabla 3.5 e ilustración 3.5

**Tabla 3.5 Resultados del crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones del dióxido de cloro.**  
(Martínez & Segura, 2022)

# de pocillo (solución más bacteria)	Concentración dióxido de cloro en mg/l	Análisis
1	0.15	Crecimiento positivo
2	0.2	Crecimiento positivo
3	0.25	Crecimiento positivo
4	0.5	Crecimiento negativo
5	0.75	Crecimiento negativo
6	1	Crecimiento negativo
7	1.25	Crecimiento negativo
8	1.50	Crecimiento negativo
9	1.75	Crecimiento negativo
10	2	Crecimiento negativo



**Ilustración 3.6 Resultado de turbidez luego de 24 horas.**

Una vez revisados el crecimiento bacteriano basados en la turbidez, se confirmó los pocillos en que no se observó turbidez tomando una muestra con el asa y sembrándola en una placa de TSA al 2% de NaCl sin dióxido de cloro; para saber si el producto funciona como bacteriostático o bactericida.

Luego de las 24 horas de inoculación se obtuvo el siguiente resultado:



**Ilustración 3.7** Crecimiento bacteriano en placa de agar

Para el análisis en la placa de agar de la ilustración 3.6, se dividió la placa en 7 secciones las cuales son las 7 concentraciones que se analizaron, el cual se hizo un análisis en base a la observación se puede notar que hubo crecimiento en la sección 6 y 7. Los resultados son los siguientes:

**Tabla 3.6** Concentraciones del dióxido de cloro que actúan como bactericida. (Martínez & Segura, 2022)

<b>Sección</b>	<b>Concentración (mg/l)</b>	<b>Resultado</b>
1	2	Actúa como bactericida
2	1.75	Actúa como bactericida
3	1.50	Actúa como bactericida
4	1.25	Actúa como bactericida
5	1.00	Actúa como bactericida
6	0.75	Actúa como bacteriostático
7	0.50	Actúa como bacteriostático

El valor obtenido de la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) fue de 1.00 mg/l de dióxido de cloro, donde se observó un efecto bactericida contra el *vibrio parahaemolyticus*.

### 3.3 Análisis estadístico

Modelo de análisis de varianza de dos factores:

$$Mortalidad_{ij} = Dosis_i + Tiempo_j + \varepsilon_{ij}$$

Para los niveles del factor 1:

$$i = \{n_1 = 28, n_2 = 28, n_3 = 28, n_4 = 28\}$$

Donde

**Tabla 3.7 Dosis y numeración de estos para el respectivo análisis estadístico.**

<b>i</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Dosis</b>	Control	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3

Para los niveles del factor 2:

$$j = \{m_1 = 16, m_2 = 16, m_3 = 16, m_4 = 16, m_5 = 16, m_6 = 16, m_7 = 16\}$$

Donde

**Tabla 3.8 Tiempo y numeración de estos para el respectivo análisis estadístico.**

<b>J</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Tiempo (en min)</b>	10	30	60	120	180	240	300

Contraste de hipótesis para el factor DOSIS:

$$H_0: Dosis_1 = Dosis_2 = \dots = Dosis_4$$

$$H_a: \text{No todas las } Dosis_i \text{ son iguales}$$

```

Analysis of Variance Table

Response: Mortalidad
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Dosis      3  65.61  21.869   14.218 8.238e-08 ***
Tiempo     6 937.46 156.244 101.578 < 2.2e-16 ***
Residuals 102 156.89   1.538
---
Signif. codes:
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
    
```

**Ilustración 3.8 Análisis de varianza.**

```

> TukeyHSD(aov, which = "Dosis")
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Mortalidad ~ Dosis + Tiempo, data = data)

$Dosis
      diff      lwr      upr    p adj
dosis 1-control -0.2142857 -1.08003651  0.6514651  0.9165522
dosis 2-control  0.6785714 -0.18717937  1.5443222  0.1777702
dosis 3-control  1.7500000  0.88424920  2.6157508  0.0000043
dosis 2-dosis 1  0.8928571  0.02710634  1.7586079  0.0405650
dosis 3-dosis 1  1.9642857  1.09853491  2.8300365  0.0000003
dosis 3-dosis 2  1.0714286  0.20567777  1.9371794  0.0088429

```

**Ilustración 3.9 Resultados de la prueba de Turkey para las dosis.**

- No existe diferencia entre la dosis 1 y la dosis de control
- No existe diferencia entre la dosis 2 y la dosis de control
- Existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis de control
- Existe diferencia entre la dosis 2 y la dosis 1
- Existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis 1
- Existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis 2

Realizando la prueba de Turkey con un nivel de confianza del 95% se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Se demostró que no existe diferencia significativa entre la dosis de control y la dosis 1 y 2, pero si hay diferencia significativa entre la dosis 3 (concentración mayor con 2 ppm) con todas las concentraciones, por lo que se puede concluir que la mortalidad obtenida no es la misma en las diferentes dosis.

Contraste de hipótesis para el factor Tiempo

$$H_0: \text{Tiempo}_1 = \text{Tiempo}_2 = \dots = \text{Tiempo}_7$$

$$H_a = \text{No todos los Tiempos}_j \text{ son iguales}$$

Analysis of Variance Table						
Response: Mortalidad						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Dosis	3	65.61	21.869	14.218	8.238e-08	***
Tiempo	6	937.46	156.244	101.578	< 2.2e-16	***
Residuals	102	156.89	1.538			
---						
Signif. codes:						
0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05
	'.'	0.1	' '			1

Ilustración 3.10 Análisis de varianza.

```
> TukeyHSD(aov, which = "Tiempo")
Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Mortalidad ~ Dosis + Tiempo, data = data)

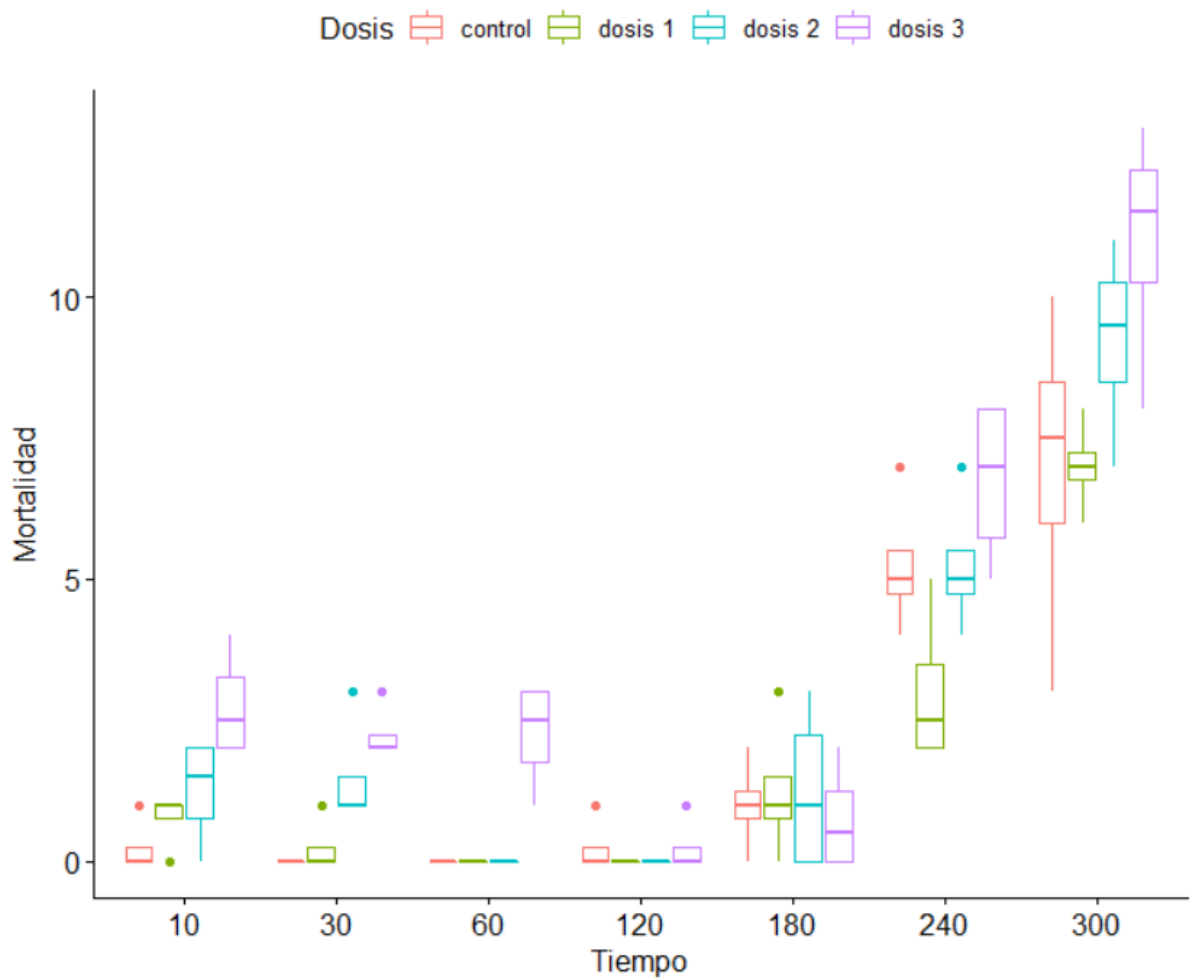
$Tiempo
      diff      lwr      upr      p adj
30-10  -0.2500 -1.56897  1.06897  0.9975033
60-10  -0.6875 -2.00647  0.63147  0.7028490
120-10 -1.1250 -2.44397  0.19397  0.1477385
180-10 -0.1875 -1.50647  1.13147  0.9995115
240-10  3.8125  2.49353  5.13147  0.0000000
300-10  7.3125  5.99353  8.63147  0.0000000
60-30  -0.4375 -1.75647  0.88147  0.9534158
120-30 -0.8750 -2.19397  0.44397  0.4239104
180-30  0.0625 -1.25647  1.38147  0.9999993
240-30  4.0625  2.74353  5.38147  0.0000000
300-30  7.5625  6.24353  8.88147  0.0000000
120-60 -0.4375 -1.75647  0.88147  0.9534158
180-60  0.5000 -0.81897  1.81897  0.9139939
240-60  4.5000  3.18103  5.81897  0.0000000
300-60  8.0000  6.68103  9.31897  0.0000000
180-120 0.9375 -0.38147  2.25647  0.3387708
240-120 4.9375  3.61853  6.25647  0.0000000
300-120 8.4375  7.11853  9.75647  0.0000000
240-180 4.0000  2.68103  5.31897  0.0000000
300-180 7.5000  6.18103  8.81897  0.0000000
300-240 3.5000  2.18103  4.81897  0.0000000
```

Ilustración 3.11 Resultados de prueba de Turkey para el tiempo.

- No existe diferencia entre el tiempo de 30 min y 10 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 60 min y 10 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 120 min y 10 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 180 min y 10 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 240 min y 10 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 10 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 60 min y 30 min

- No existe diferencia entre el tiempo de 120 min y 30 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 180 min y 30 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 240 min y 30 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 30 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 120 min y 60 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 180 min y 60 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 240 min y 60 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 60 min
- No existe diferencia entre el tiempo de 180 min y 120 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 240 min y 120 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 120 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 240 min y 180 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 180 min
- Existe diferencia entre el tiempo de 300 min y 240 min

Mediante la prueba de Turkey con un nivel de confianza del 95% se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa. Se demostró que no existe diferencia significativa entre los tiempos de 10, 30, 60, 120 y 180 minutos, pero a mayores tiempos que el último mencionado sí hay diferencia significativa, concluyendo que las mortalidades obtenidas no son iguales en los tiempos observados.



**Ilustración 3.12** Diagrama de cajas de las dosis entre la mortalidad vs tiempo. Se observa la distribución de los datos en cada tiempo, obteniendo una similitud en las dosis de control (color naranja), dosis 1 (color verde) y dosis 2 (color celeste), siendo la más alejada de los demás datos la dosis 3 (color morado).



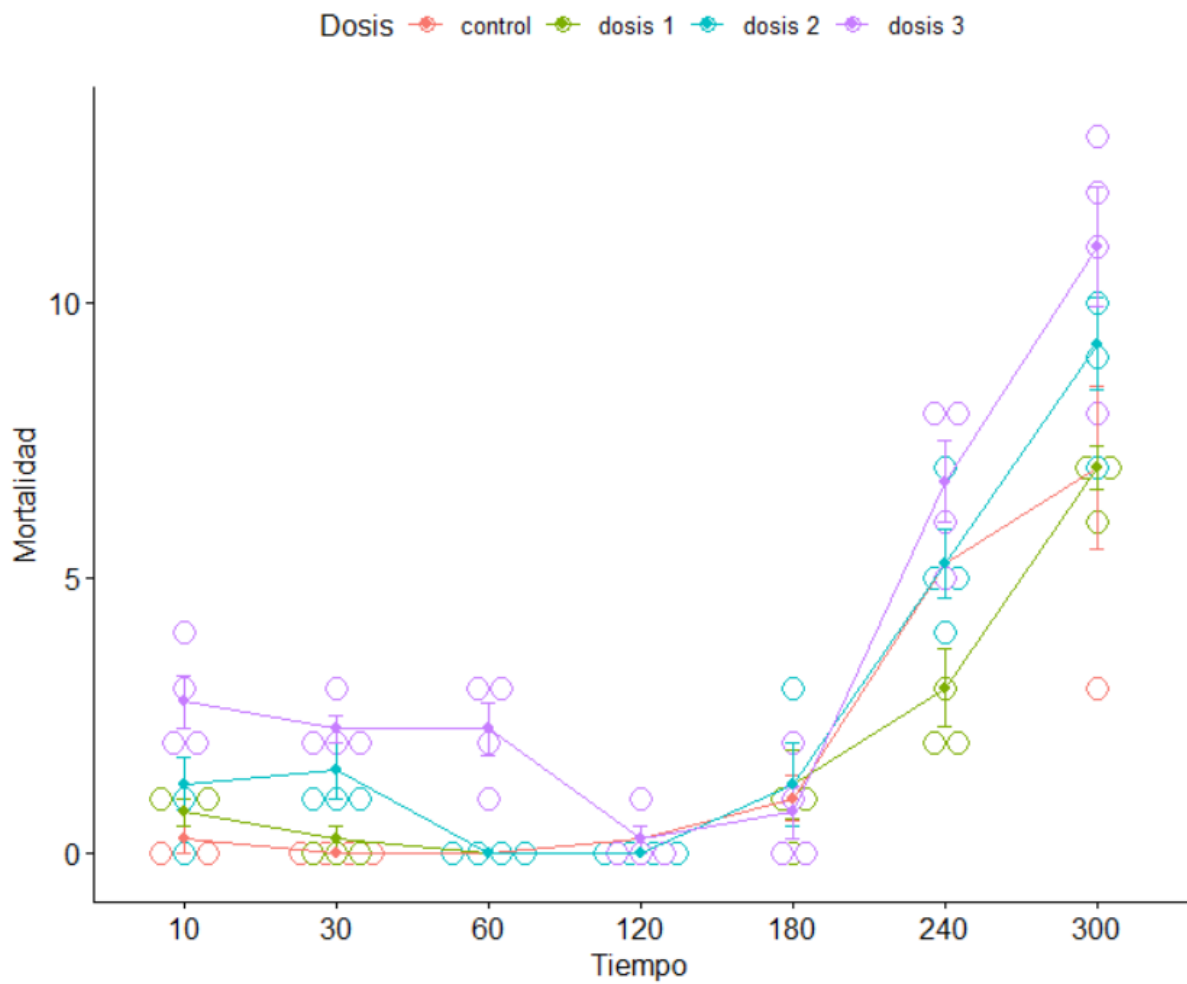


Ilustración 3.13 Distribución de tiempo y mortalidad en función de las dosis. La dosis de control (color naranja) es muy similar a la dosis 2 (color verde) y la dosis 3 (color celeste), siendo la dosis 3 (color morado) la que más se sobresalga en cuanto a la mortalidad.

Análisis de varianza de un factor.

$$Mortalidad_{ij} = Dosis_i + \varepsilon_{ij}$$

Para los niveles del factor 1:

$$i = \{n_1 = 16, n_2 = 16, n_3 = 16, n_4 = 16\}$$

Donde

Se usa la **tabla 3.7**

## Analysis of Variance Table

Response: Mortalidad

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Dosis	3	30.80	10.266	0.7174	0.5455
Residuals	60	858.56	14.309		

Ilustración 3.14 Tabla del análisis de varianza.

Contraste de hipótesis para el factor DOSIS:

$$H_0: Dosis_1 = Dosis_2 = \dots = Dosis_4$$

$$s_2 = \dots = Dosis_4$$

$$H_a: \text{No todas las } Dosis_i \text{ son iguales}$$

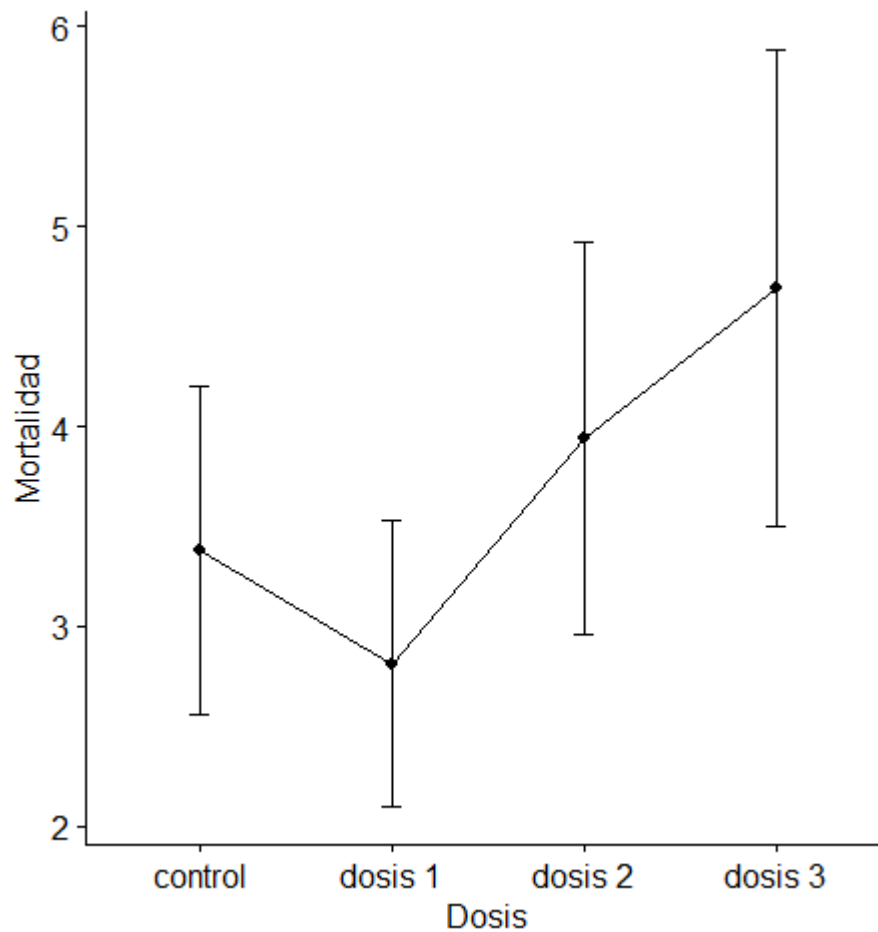


Ilustración 3.15 Media muestral de las mortalidades de cada dosis desde los 120 minutos. Parece que las mortalidades no son iguales en las diferentes dosis.

Tukey multiple comparisons of means  
95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Mortalidad ~ Dosis, data = dmayor\_120)

```
$Dosis
      diff      lwr      upr    p adj
dosis 1-control -0.5625 -4.09664 2.97164 0.9747500
dosis 2-control  0.5625 -2.97164 4.09664 0.9747500
dosis 3-control  1.3125 -2.22164 4.84664 0.7605433
dosis 2-dosis 1  1.1250 -2.40914 4.65914 0.8345977
dosis 3-dosis 1  1.8750 -1.65914 5.40914 0.5031090
dosis 3-dosis 2  0.7500 -2.78414 4.28414 0.9432295
```

**Ilustración 3.16 Resultados de prueba de Turkey para la mortalidad y el tiempo mayor de 120 minutos.**

- No existe diferencia entre la dosis 1 y la dosis de control
- No existe diferencia entre la dosis 2 y la dosis de control
- No existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis de control
- No existe diferencia entre la dosis 2 y la dosis 1
- No existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis 1
- No existe diferencia entre la dosis 3 y la dosis 2

Con el análisis estadístico mediante la prueba de Turkey, con un nivel de confianza del 95%, la hipótesis nula se acepta. Se comprobó que no existe diferencia significativa entre la mortalidad y las diferentes dosis, por lo que se puede aseverar que las mortalidades ocurridas luego de los 120 minutos son debido a factor/es externo/s y no por la exposición al químico ClO<sub>2</sub>.

### 3.4 Análisis de costos

Para el análisis de costos se realizó una revisión en línea para conseguir valores referenciales, de los insumos, equipos, materiales y reactivos usados en el presente proyecto.

Ciertos reactivos y materiales como ácidos orgánicos, postlarvas y balanceado fueron donados por parte de un laboratorio de producción de larvas de camarón.

**Tabla 3.9 Costos para la elaboración de la experimentación. (Martínez & Segura, 2022)**

Tabla de costos			
Materiales	Cantidad	Costo Unitario	Costo total
Fiola/Matraz Erlenmeyer 500 ml	2	\$8.00	\$16
Fiola/Matraz Erlenmeyer 250 ml	2	\$6.25	\$12.50
Cajas Petri Mono plástica x20 unidades	1	\$6.25	\$6.25
Tubos Falcon	30	\$0.20	\$6.00

Funda Punta amarilla 200 µl	3	\$10	\$30
Funda punta azul 1000 µl	4	\$10	\$40
Pipeta Pasteur de plástico 3 ml x100 unidades	1	\$10	\$10
Medidor de dióxido de cloro HANNA h197738	1	\$400	\$400
Reactivos para el medidor (4 reactivos)	1	\$100	\$100
Agar TSA	1	\$100	\$100
Agua destilada	3	\$1.65	\$4.95
Calentadores	4	\$12	\$48
Lámparas	4	\$9	\$36
Focos incandescentes	10	\$1	\$10
Gavetas de 9 l	16	\$8	\$128
Aireadores de 4 salidas	2	\$20	\$40
Manguera para pecera (20m)	1	\$20	\$20
Piedras difusoras	25	\$0.19	\$4.75
Balanza digital	1	\$30	\$30
Termómetro digital	1	\$10	\$10
Pipeta automática graduable de 100-1000 µl	1	\$120	\$120
Pipeta automática graduable de 10-100 µl	1	\$100	\$100
<b>TOTAL</b>			<b>\$1,272.45</b>

**Tabla 3.10 Costos de diferentes productos y su comparación de precio con el volumen total de desinfección.**

<b>Tabla de comparación</b>				
<b>PRODUCTO</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario</b>	<b>Volumen total de desinfección</b>	<b>Costo para igualar el dióxido de cloro</b>
Dióxido de cloro	1 litro	\$50	100 000 litros	-
Cloro concentrado al 10%	1 litros	\$1.65	10 000 litros	\$16.50
Yodo liquido al 2.5%	1 litro	\$7.10	10 000 litros	\$71
Ácidos orgánicos (ADISALM L)	1 litro	\$3.50	5 000 litros	\$70

Se aprecia en la tabla 3.10 la comparación de diferentes productos con el dióxido de cloro, pero además del precio se tiene que apreciar la no toxicidad del productos ante los animales, también se tiene que el dióxido de cloro trabaja en un rango amplio de salinidad, pH, temperatura, alcalinidad y OD, por lo que lo hace el mejor producto para la desinfección y eliminación de vibrios.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Discusión del caso

El dióxido de cloro se usa tradicionalmente en la acuicultura para desinfectar el suministro de agua de los tanques de reserva (Flick, 2015). Actualmente se ha aplicado ampliamente en el cultivo, ya sea en laboratorios o en piscinas de engorde para la eliminación de organismos patógenos o presencia de virus mejorando así la calidad del agua (Flick, 2015). La disminución del dióxido de cloro en el agua estará influenciada por varios aspectos como concentración de sólidos en suspensión, materia orgánica oxidable, compuestos inorgánicos como también el oxígeno disuelto. Pero bajo las concentraciones controladas de dióxido de cloro, este es un compuesto muy útil para la eliminación de patógenos, también para mejorar la calidad del agua, además de ser un producto no tóxico para los organismos y disminuyen las tasas de mortalidad por vibrios.

### 4.2 Conclusiones

Los resultados mostraron que para postlarvas PI14 a concentraciones de 0.5 a 2 ppm de dióxido de cloro no demuestra un elevado nivel de toxicidad. Siendo 0.5 ppm la concentración más baja causando mortalidades de hasta un 6.6%; mientras que en concentraciones de 2 ppm las mortalidades alcanzaban un 23% de la población, siendo porcentajes menores del 25% de la población.

La concentración mínima del dióxido de cloro para la eliminación de las bacterias fue 1.00 ppm, en esta concentración los organismos no se ven afectados por el químico. Sabemos anualmente se pierden de 6 mil a 8 mil millones de dólares en diferentes partes del mundo por temas de *vibrios* (Figueredo, y otros, 2020). Por lo que el uso del dióxido de cloro nos ayudaría en las larvicultura para el control y disminución de vibrios, además de disminuir las pérdidas de postlarvas, dando un incremento en la producción y reduciendo las pérdidas comerciales.

El uso del dióxido de cloro si es de carácter factible tanto para mejorar la calidad del agua como para el control de patógenos o virus que se encuentren en el medio. Este químico no solo elimina vibrios, también otras bacterias y esto es un factor a considerar.

### 4.3 Recomendaciones

- ✚ Para llevar a cabo la experimentación del proyecto y obtener los mejores resultados, recomendamos seguir todos los protocolos de bioseguridad ya sea tanto para transporte como para la supervivencia de las postlarvas con las que se trabajara para así tener muestras libres de alguna contaminación externa y que los resultados sean más precisos.
- ✚ Los reactivos y soluciones deben estar siempre rotulados para evitar confusión o posibles contaminaciones en los análisis
- ✚ Trabajar siempre con muestras que se encuentren en buen estado, es decir, que la postlarva tenga buena reacción, se alimente correctamente y que no presente algún signo clínico de patología.
- ✚ Este proyecto es tan solo una experimentación preliminar a baja escala que puede servir como un antecedente sobre el comportamiento de la especie *P. Vannamei* bajo concentraciones de dióxido de cloro para el control de vibrios.
- ✚ La temperatura es un factor crucial para este proyecto ya que al trabajar con organismos vivos muy pequeños y que están en crecimiento, estos requieren de una temperatura de que bordee de los 30 a 33°C y de una correcta alimentación cada 4 horas.

# BIBLIOGRAFÍA

- ACHIPIA. (Agosto de 2017). *Vibrio parahaemolyticus*. Obtenido de Área Soporte al Análisis de Riesgo: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-08-Vibrio-parah-v01.pdf>
- Anaya Rosas, R. E. (Junio de 2005). *CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO, Litopenaeus vannamei, Boone (1931), EN SISTEMA CERRADO A ALTA DENSIDAD*. Obtenido de CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1144/1/167251.pdf>
- Becton, Dickinson and Company. (2010). *Medio BBL de enriquecimiento en tubo para el cultivo de Vibrio*. Obtenido de Alkaline Peptone Water: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=20796>
- Brock, J. y. (2009). *DSM*. Obtenido de <https://www.biomin.net/mx/especies/acuicultura/vibriosis/>
- CNA. (Abril de 2021). *Ecuador se convirtió en el segundo proveedor de camarón en Estados Unidos*. Obtenido de ISSUU: [https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion\\_140/s/12192036#:~:text=Durante%20el%20primer%20trimestre%20del,C%3%A1mara%20Nacional%20de%20Acuicultura%20CNA.](https://issuu.com/revista-cna/docs/edicion_140/s/12192036#:~:text=Durante%20el%20primer%20trimestre%20del,C%3%A1mara%20Nacional%20de%20Acuicultura%20CNA.)
- Condalab. (21 de Diciembre de 2020). *Agua Peptonada Alcalina*. Obtenido de Condalab: [https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-deshidratados/1146-11614-agua-peptonada-alcalina.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-deshidratados/1146-11614-agua-peptonada-alcalina.html#/2-formato-500_g)
- Cuéllar-Anjel, J. (Agosto de 2013). *Vibriosis in shrimp*. Obtenido de The Center for Food Security & Public Health: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- España, S. (24 de Julio de 2021). *El camarón ecuatoriano remonta la corriente*. Obtenido de EL PAÍS: <https://elpais.com/economia/2021-07-25/el-camaron-ecuatoriano-remonta-la-corriente.html>
- FAO. (2009). *Penaeus vannamei (Boone, 1931) [Penaeidae]*. Obtenido de FAO: [https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es\\_whitelegshrimp.htm](https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_whitelegshrimp.htm)
- FDA. (1 de Octubre de 2010). *Miracle' Treatment Turns into Potent Bleach*. Obtenido de U.S. Food and Drug Administration: <https://wayback.archive->

it.org/7993/20170404163509/https://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm228052.htm

Figueredo, A., Fuentes, J. L., Cabrera, T., Patti, J., Silva, J., Ron, E., . . . Marcano, N. (13 de Mayo de 2020). *Bioseguridad en el cultivo de camarones penaeidos: una revisión*. Obtenido de AquaTechnica: <https://doi.org/10.33936/at.v2i1.2409>

Flick, G. J. (2015). *Chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) can be used in many different applications within the aquaculture industry*.

Gintaras Svecevičius, J. Š. (2005). *SpringerLink*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1065/espr2005.04.248>

Gonzabay-Crespin, Á. N., Vite-Cevallos, H. A., Garzón-Montealegre, V. J., & Quizhpe-Cordero, P. F. (8 de Septiembre de 2021). *Análisis de la producción de camarón en el Ecuador para su exportación a la Unión Europea en el período 2015-2020*. Obtenido de Polo del Conocimiento: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/8094522.pdf>

HANNA Instruments. (s.f.). *HI97738 Chlorine Dioxide Photometer*. Obtenido de Hanna Instruments: [https://www.hannainstruments.co.uk/modules/teapotknowledgehub/uploads/man\\_97738\\_11\\_19-60bf4d86a175b.pdf](https://www.hannainstruments.co.uk/modules/teapotknowledgehub/uploads/man_97738_11_19-60bf4d86a175b.pdf)

IDEXX. (Junio de 2022). *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. Obtenido de IDEXX: <https://www.idexx.es/files/micgui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>

Irith Wiegand, K. H. (2008). Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Kai-Hilpert/publication/5576597\\_Agar\\_and\\_broth\\_dilution\\_methods\\_to\\_determine\\_the\\_minimal\\_inhibitory\\_concentration\\_MIC\\_of\\_antimicrobial\\_substance/links/560a699708ae576ce63fd7d7/Agar-and-broth-dilution-methods-to-determi](https://www.researchgate.net/profile/Kai-Hilpert/publication/5576597_Agar_and_broth_dilution_methods_to_determine_the_minimal_inhibitory_concentration_MIC_of_antimicrobial_substance/links/560a699708ae576ce63fd7d7/Agar-and-broth-dilution-methods-to-determi)

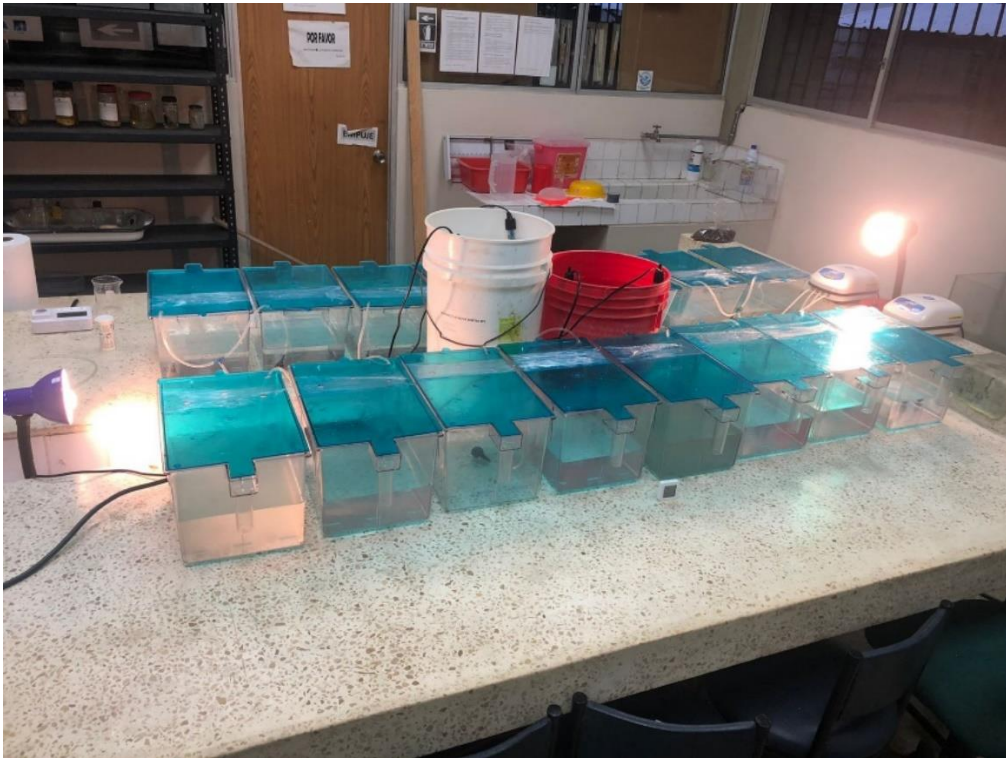
Marcillo, F. (2003). *Crisis por la Mancha Blanca y Su Recuperación Actual*. Obtenido de DSpace: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/8972/3/AnalisisWSSV2003.pdf>

Medina Guerra, E. (Junio de 2020). *Guía para uso de cloro en desinfección de frutas y hortalizas de consumo fresco, equipos y superficies en establecimientos*. Obtenido de Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria: <https://www.oirsa.org/contenido/2020/Guia%20para%20uso%20de%20cloro%20como%20desinfectante%20en%20establecimientos%2023.06.2020.pdf>



- Morales, V., & CuéllaR-Anjel, J. (Octubre de 2014). *PATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE CAMARONES PENAEIDOS*. Obtenido de Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria: [https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf\\_revistas/Guia\\_Tecnica\\_Patologia\\_Inmunologia\\_de\\_Camarones\\_Penaeidos.pdf](https://utm.edu.ec/fcv/acuicultura/images/acuicultura/pdf_revistas/Guia_Tecnica_Patologia_Inmunologia_de_Camarones_Penaeidos.pdf)
- Navarro, N. P. (2016). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v51n3/art07.pdf>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2006). MÉTODOS PARA LA DESINFECCIÓN DE LOS ESTABLECIMIENTOS DE ACUICULTURA. *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*, 54-69.
- Scelzo, M. A. (1997). *Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial Artemesia longinaris Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)*. Obtenido de Investigaciones marinas: [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-71781997002500013&script=sci\\_arttext#tab1](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-71781997002500013&script=sci_arttext#tab1)
- Selective Micro Technologies. (4 de Abril de 2017). *Environmental Assessment*. Obtenido de U.S. Food and Drugs Administration: <https://www.fda.gov/media/108323/download>
- Somboon, M., Purivirojkul, W., Limsuwan, C., & Chuchird, N. (Enero de 2012). *Effect of Vibrio spp. in White Feces Infected Shrimp in Chanthaburi, Thailand*. Obtenido de KASETSART UNIVERSITY: <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/JFE/article/view/80769/64309>
- Songsrichun, S., Songpradit, N., Thapuksorn, A., & Supamattaya, W. (2000). *Effect of chlorine dioxide on black tiger shrimp (Penaeus monodon), pathogen and water quality*. Thailand.
- Varela, A., & Choc-Martínez, L. F. (11 de Agosto de 2020). *Técnicas diagnósticas para enfermedades bacterianas en camarones. Usos, alcances y limitaciones*. Obtenido de SCielo.org: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v31n3/1609-9117-rivep-31-03-e18165.pdf>
- World Health Organization. (24 de Abril de 2017). *Guidelines for drinking-water quality*. Obtenido de World Health Organization: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>

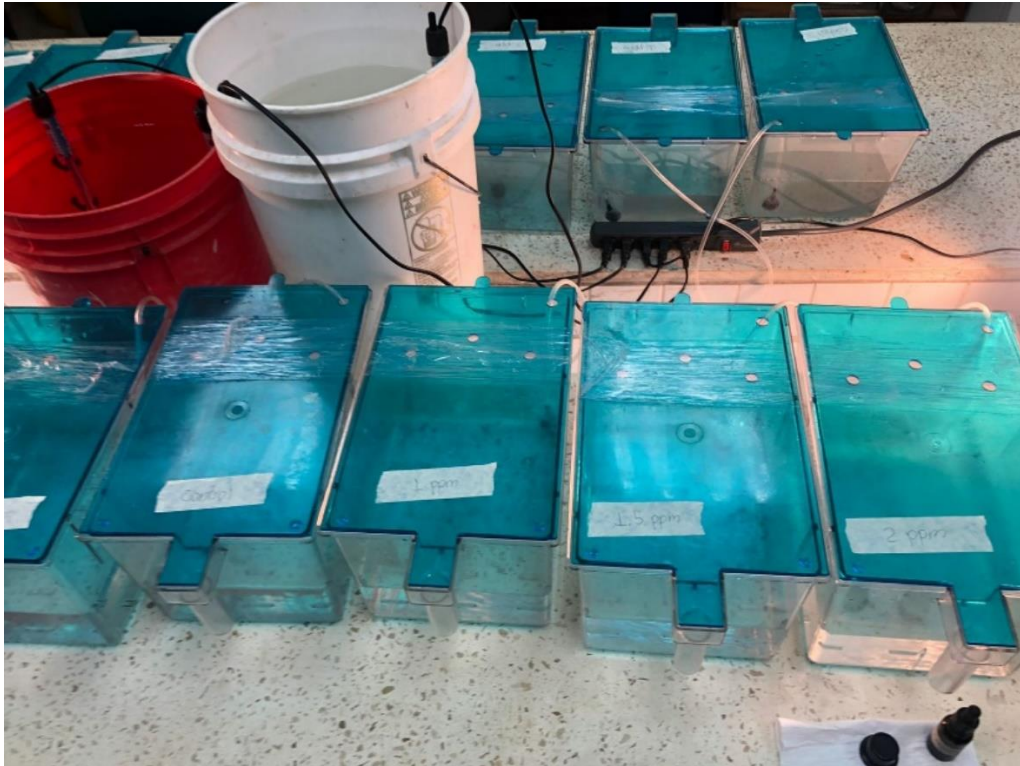
# APÉNDICES



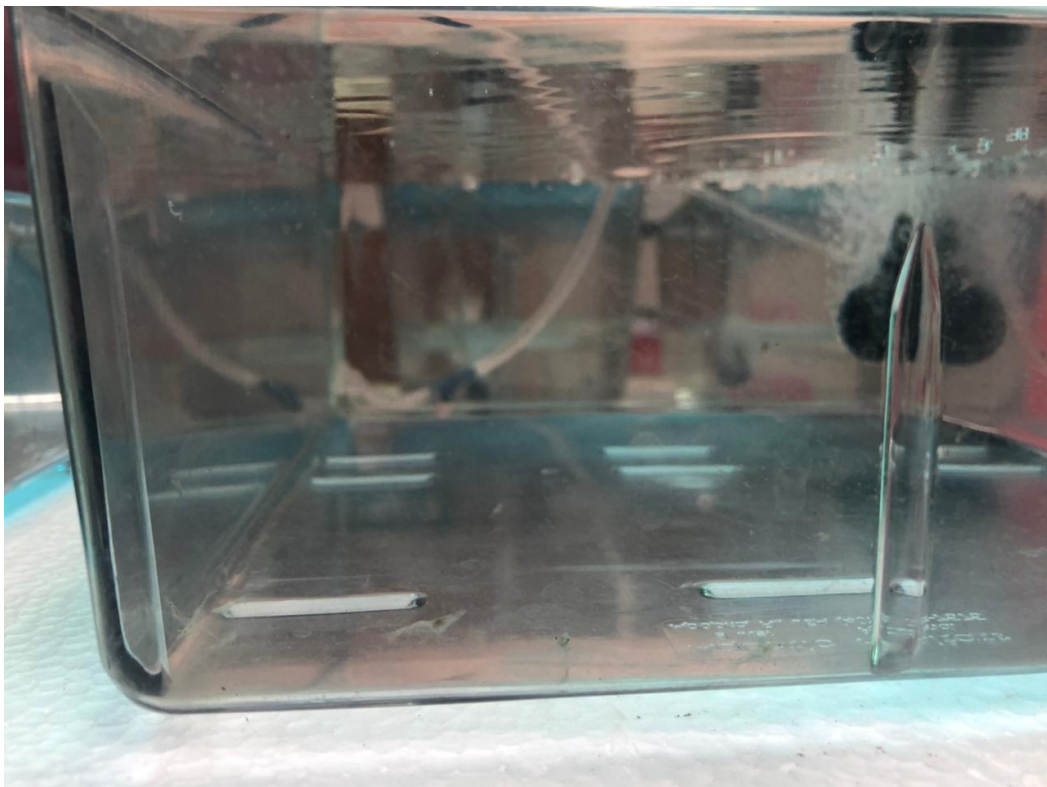
**Ilustración 0.1 Sistema de bioensayo armado.**



**Ilustración 0.2 Tanques reservorios.**



**Ilustración 0.3 Acuarios rotulados con la concentración de  $\text{ClO}_2$ .**

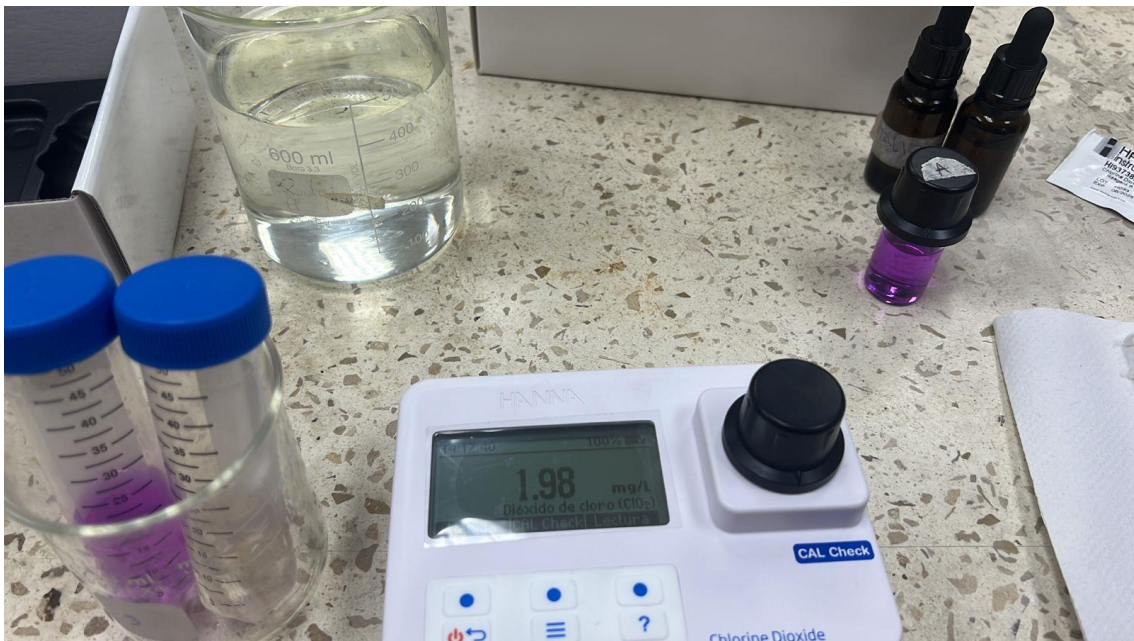


**Ilustración 0.4 Acuario con postlarvas de camarón.**





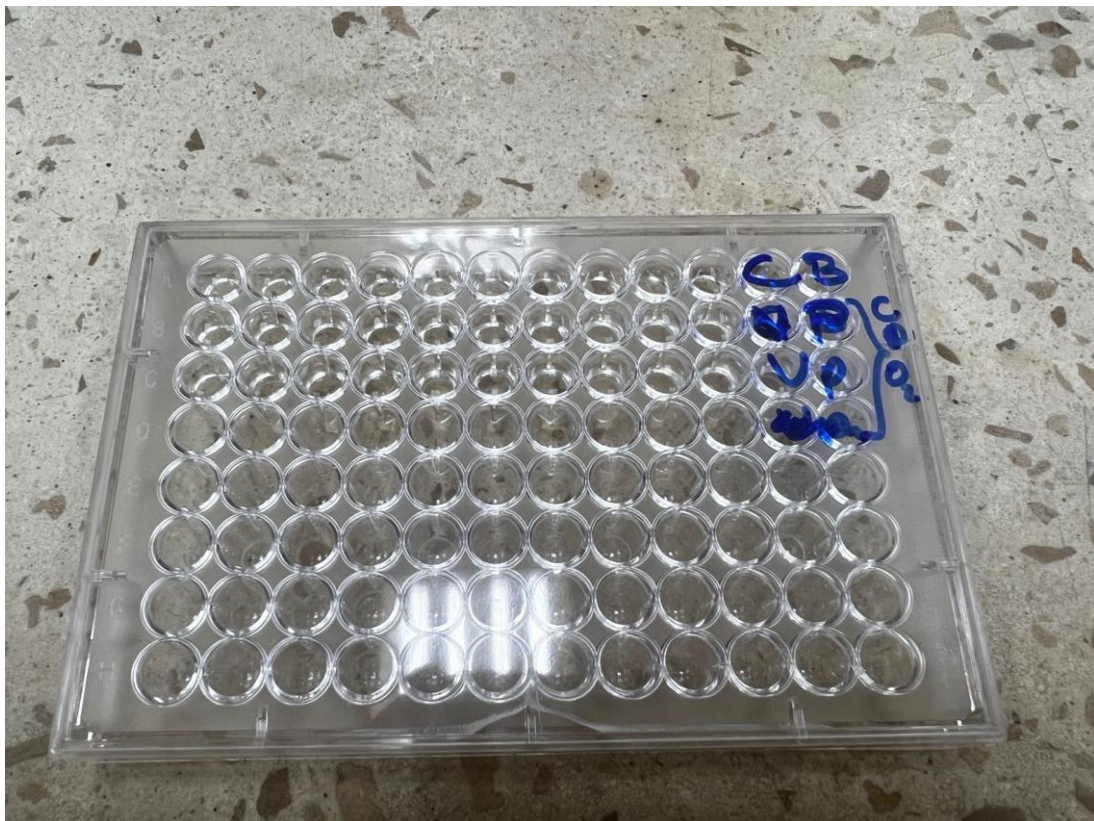
**Ilustración 0.5 Postlarvas de camarón en la experimentación con ClO<sub>2</sub>.**



**Ilustración 0.6 Fotómetro para la medición de ClO<sub>2</sub>.**

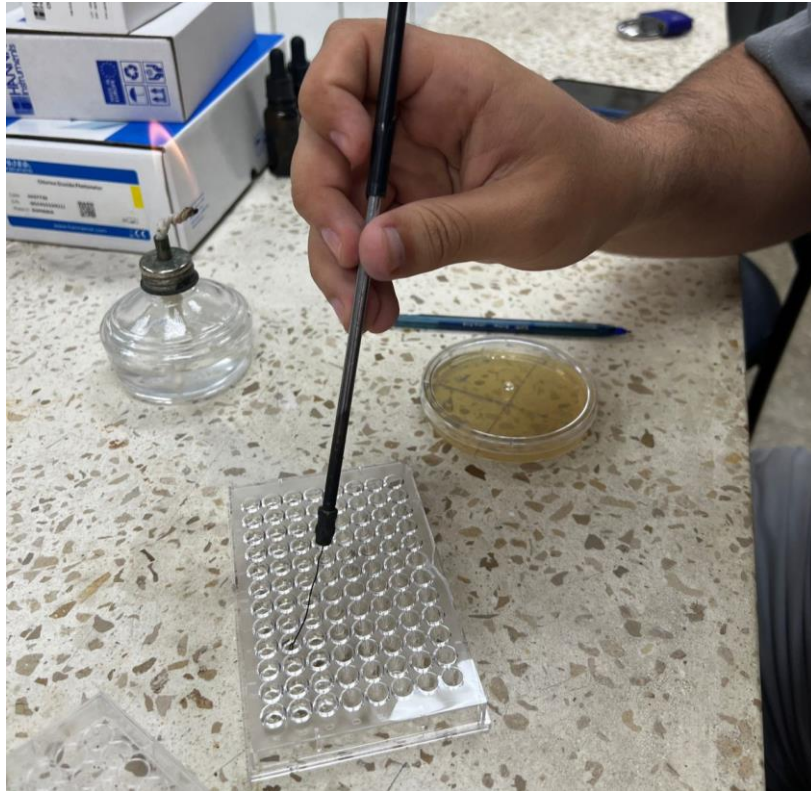


**Ilustración 0.7 Control de temperatura de los acuarios.**



**Ilustración 0.8 Placa de cultivo para bioensayo inoculados y filas rotuladas.**





**Ilustración 0.9 Cultivo del contenido en los pocillos en una placa de agar.**



**Ilustración 0.10 Placa de agar inoculada y sellada.**



**Ilustración 0.11 Placa de agar luego de las 24 horas de sembrada.**



**Ilustración 0.12 Pruebas de estrés y del ClO<sub>2</sub> en las larvas del laboratorio.**



**Ilustración 0.13 Transporte del agua marina tratada del laboratorio hasta el laboratorio de piscicultura en la ESPOL.**