



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA  
ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**ACCIÓN PROFILÁCTICA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS  
COMERCIALES FRENTE A *Vibrios spp* EN SISTEMA DE  
CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE *Litopenaeus vannamei***

Previa a la obtención del Título de

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

Solano Soriano Stephany Scarlet

**TUTOR:**

Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc.

**Libertad - Ecuador**

**2024**

**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA  
ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**ACCIÓN PROFILÁCTICA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS  
COMERCIALES FRENTE A *Vibrios spp* EN SISTEMA DE  
CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE *Litopenaeus vannamei***

Previa a la obtención del Título de

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

**SOLANO SORIANO STEPHANY SCARLET**

**TUTOR:**

**BLGA. DENNIS TOMALÁ SOLANO, M.Sc.**


**Libertad - Ecuador**

**2024**

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “**Acción profiláctica de ácidos orgánicos comerciales frente a *Vibrios spp* en sistema de cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei*”**”, elaborado por **Solano Soriano Stephany Scarlet**, estudiantes de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

**Atentamente**



---

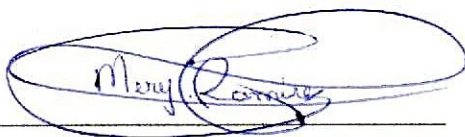
**Blga. Dennis Gisella Tomalá Solano, M.Sc.**

**DOCENTE TUTOR  
C.I. 0922584982**

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**Acción profiláctica de ácidos orgánicos comerciales frente a *Vibrios spp* en sistema de cultivo semi-intensivo de *Litopenaeus vannamei*”**”, elaborado por **Solano Soriano Stephany Scarlet** estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

**Atentamente**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mery Ramírez', is written over a horizontal line.

Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D

**DOCENTE DE ÁREA**

**C.I. 0907694186**

## **DEDICATORIA**

Este proyecto está dedicado principalmente a Dios, quien me ha dado fortaleza, sabiduría y perseverancia ante las adversidades que he enfrentado. A mi madre, Karla Soriano Yagual, cuyo sacrificio y dedicación han allanado el camino para que pueda perseguir mis sueños y alcanzar mis metas.

A mis queridos hermanos, por su inquebrantable apoyo moral y sus palabras de aliento en los momentos de incertidumbre. A mis tíos Cecibel PARRALES y Walter Soriano, y primos, quienes me brindaron ayuda cuando más lo necesité. A mis amigos Luis Plua, Milton Yagual, Orlando Tumbaco y Eduardo Espinoza; quienes han sido un apoyo incondicional, comprendiendo mi ausencia y brindándome ánimo en los momentos más difíciles.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la empresa SANLAB S.A., y en particular al Sr. Freddy Sánchez y la Sra. Ericka Ortega, por su generosidad al proporcionarme acceso a los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo mi investigación.

Además, quisiera expresar mi gratitud al Blgo, Erick Cedeño Valverde, responsable del área de microbiología, quien no solo me brindó una orientación invaluable durante la realización de mis pruebas, sino que también se convirtió en un mentor esencial a lo largo de todo el proceso experimental. Del mismo modo, agradezco al administrador Ricardo Bailón Molina, así como a los técnicos y operarios, por su amabilidad y disposición para resolver mis dudas en todo momento.

A mi querida tutora, Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc., quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su orientación experta y el valioso tiempo que dedicó a supervisar este trabajo. Su compromiso y mentoría fueron esenciales para dar forma a este estudio y para mi crecimiento profesional. También deseo extender mi gratitud a la Universidad Estatal Península de Santa Elena y a todos los docentes de la carrera de biología, por las enseñanzas, apoyo u orientación brindada durante todos estos años.

## TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Solano Soriano Stephany Scarlet** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO:** 15 de julio 2024




Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.

**DIRECTOR/A DE CARRERA  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



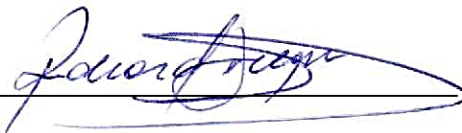
Q.F. Mery Ramírez Muñoz, Ph.D

**DOCENTE DE ÁREA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc

**DOCENTE TUTOR  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.

**DOCENTE GUÍA DE LA UIC II  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Lcdo. Pascual Roca Silvestre, Mgtr.

**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **DECLARATORIA EXPRESA**

La responsabilidad por los datos, ideas y resultados expuestos en este trabajo de Integración curricular, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma compartida con la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



---

**Stephany Scarlet Solano Soriano**

**C.I. 2450793662**



## RESUMEN

En Ecuador se ha establecido una posición sólida y duradera en el mercado internacional gracias a la producción sostenida del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. A pesar de este éxito, la industria enfrenta problemáticas asociadas a brotes de agentes patogénicos, especialmente vinculados al género *Vibrio spp.*, que afectan la productividad final de las cosechas y la supervivencia de estos organismos. Por tal motivo, esta investigación evaluó la acción profiláctica de dos productos acidificantes comerciales conocidos como “ácidos orgánicos” contra la vibriosis provocada por serotipos de *V. vulnificus*, *V. anginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, que también se relacionan con afecciones como el síndrome de Bolitas, síndrome de Zoea II y la mortalidad temprana (EMS) – AHPND. Se analizaron dos ciclos de cultivos en los que se compararon dos tratamientos con ácidos orgánicos (TR1 - TR2) y dos grupos de control sin ácidos orgánicos (C-1 - C-2). Además, durante el ensayo, se mantuvo constante la aireación, mientras que los parámetros fisicoquímicos fueron rigurosamente controlados para asegurar la validez de los resultados y minimizar las variables externas que pudieran influir en los resultados obtenidos. Para el primer tratamiento experimental, cuya composición incluyó ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, lactato de calcio y acetato de sodio, se demostró una eficacia superior con una tasa de supervivencia del 89% y carga bacteriana total en rangos normales  $6.72 \times 10^2$ . En contraste, el segundo tratamiento, con una formulación distinta (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico), alcanzó una tasa de supervivencia del 80%. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), destacando la efectividad superior del primer tratamiento.

Los tratamientos se administraron en concentraciones ajustadas según el estadio larvario durante la experimentación *en vivo*: 2-3 ppm para Zoea a Mysis I-II-III y 4-5 ppm para PL-12, con un rango máximo de hasta 7 ppm/tn en casos extremos de altas cargas bacterianas. En el ensayo *in vitro*, se realizaron tres réplicas del antibiograma utilizando distintas concentraciones (0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm y 2 ppm) contra 3 cepas bacterianas aisladas previamente (*V. anginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*). Se observaron diferencias notables en el diámetro promedio de los halos de inhibición entre ambos compuestos obteniéndose rangos de 9,04 mm a 8,73 mm.

**Palabras clave:** Ácidos orgánicos, *Vibrios spp*, Supervivencia, antibiograma, estadios larvarios de *L. vannamei*.

## ABSTRACT

In Ecuador a solid and lasting position has been established in the international market thanks to the sustained production of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Despite this success, the industry faces challenges associated with outbreaks of pathogenic agents, particularly those linked to the genus *Vibrio spp*, which negatively affect the final productivity of the harvests and the survival rates of these organisms. For this reason, this research evaluated the prophylactic action of two commercial acidifying products known as "organic acids" against vibriosis caused by serotypes of *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus*, which are also associated with conditions such as Bolitas syndrome, Zoea II syndrome, and early mortality syndrome (EMS) – AHPND. Two culture cycles were analyzed, comparing two treatments with organic acid (TR1 - TR2) and two control groups without organic acids (C-1 - C-2). Additionally, during the trial, aeration was kept constant, while physicochemical parameters were rigorously controlled to ensure the validity of the results and minimize external variables that could influence the outcomes. For the first experimental treatment, which included formic acid, acetic acid, citric acid, calcium lactate, and sodium acetate, superior efficacy was demonstrated with a survival rate of 89% and total bacterial load within normal ranges of  $6.72 \times 10^2$ . In contrast, the second treatment, with a different formulation (formic acid, acetic acid, propionic acid, and lactic acid), achieved a survival rate of 80%. Statistical analysis evidenced significant differences ( $p < 0.05$ ), highlighting the superior effectiveness of the first treatment.

The treatments were administered in concentrations adjusted according to the larval stage during the live experimentation: 2-3 ppm for Zoea to Mysis I-II-III and 4-5 ppm for PL-12, with a maximum range of up to 7 ppm/ton in extreme cases of high bacterial loads. In the in vitro assay, three replicas of the antibiogram were performed using different concentrations (0.5 ppm, 1 ppm, 1.5 ppm, and 2 ppm) against three previously isolated bacterial strains (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus*). Notable differences were observed in the average diameter of the inhibition zones between both compounds, with ranges from 9.04 mm to 8.73 mm.

**Keywords:** Organic acids, *Vibrio spp.*, Survival, Antibiogram, Larval stages of *L. vannamei*.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>22</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>25</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL:	29
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	29
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>31</b>
<b>7. MARCO TEÓRICO</b>	<b>31</b>
7.2 Estadios o fases tempranas de crecimiento	32
7.2.1 Nauplio:	32
7.2.2 Zoea	33
7.2.3 Mysis	34
7.2.4 Post-larvas:	35
7.3.1 Parámetros generales para el cultivo semi-intensivo del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	37
7.3.1.2 Salinidad	38
7.3.1.3 Oxígeno disuelto	38
7.3.1.5 pH	39
7.4.1 Estructura del flagelo polar en la familia Vibrionaceae	41
7.5 Patologías bacterianas asociadas al cultivo de <i>L. vannamei</i>	45
7.5.1 Enfermedad de la Necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND)	45
7.5.2 Síndrome de bolitas blancas	46
7.5.3 Síndrome de Zoea II	47
7.6 Ácidos orgánicos	47
7.6.1 Mecanismo de acción	48
7.6.2 Valor de pKa	50

7.7	Efectos de Ácidos orgánicos en larvicultura _____	51
7.8	Grupo de ácidos orgánicos usados en larvicultura _____	52
7.8.1	Ácido fórmico _____	52
7.8.2	Ácido láctico _____	53
7.8.3	Ácido propiónico _____	54
7.8.4	Ácido cítrico _____	54
7.8.5	Lactato de Calcio _____	55
<b>8.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO _____</b>	<b>56</b>
8.1	Área de estudio _____	56
8.2	Enfoque y tipo de investigación _____	56
8.3	<b>FASE DE CAMPO _____</b>	<b>57</b>
8.3.1	Características y alineamientos experimentales _____	57
8.3.2	Diseño experimental _____	57
8.3.3	Dosificación de los ácidos orgánicos _____	59
8.4	<b>FASE DE LABORATORIO _____</b>	<b>60</b>
8.4.1	Muestras para análisis _____	60
8.4.2	Medios de cultivo usados _____	61
8.5	Siembra de muestras _____	62
8.6	Aislamiento secuencial mediante medios selectivos y purificación _____	63
8.7	Identificación, conteo de colonias y Aislamiento de cultivo _____	63
8.8	Antibiograma _____	65
8.9	Variable productiva _____	66
8.10	Registros secundarios (parámetros fisicoquímicos) _____	66
8.11	Condiciones de ensayo _____	67
8.11	Análisis estadístico _____	68
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS _____</b>	<b>69</b>
9.1	Análisis de los tratamientos durante cada ciclo _____	69
9.2.	Análisis bacteriológico _____	75
9.2.1.	Análisis bacteriológico en el grupo control (C-1) en el ciclo 1 _____	76
9.2.2	Análisis bacteriológico en el tratamiento 1 (TR1) en el ciclo 1 _____	78
9.2.3	Análisis bacteriológico en el grupo control (C-2) en el ciclo 2 _____	80
9.2.4	Análisis bacteriológico en (TR2) en el ciclo 2 _____	82

9.3.	Sensibilidad bacteriana (CMI)	84
9.3.1	Ácido orgánico 1 (AO-1)	86
9.3.2	Ácido Orgánico 2 (O2-2)	86
9.4	Variables productivas	87
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>93</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b>		<b>99</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>		<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>101</b>
<b>ANEXOS</b>		<b>115</b>

### Índice de figura

<b>Figura 1</b>	<i>Exportaciones de camarón Ecuatoriano de 1994 hasta 2023</i>	32
<b>Figura 2</b>	<i>Estadios tempranos de crecimiento en <i>L. vannamei</i></i>	35
<b>Figura 3</b>	<i>Proceso de acción antimicrobiana de los SCFAs (ácidos grasos de cadena corta), utilizando el ácido butírico.</i>	51
<b>Figura 4</b>	<i>Ubicación satelital del laboratorio SANLAB S.A</i>	56
<b>Figura 5</b>	<i>Ilustración del diseño experimental.</i>	58
<b>Figura 6</b>	<i>Método de dilución en agar.</i>	65
<b>Figura 7</b>	<i>Tendencias de Vibrios en los diferentes tratamientos y grupo control en el cultivo de <i>L.vannamei</i>.</i>	70
<b>Figura 8</b>	<i>Representación gráfica de las cargas bacterianas durante las fases larvarias del camarón, con una comparación entre los grupos tratados C1 y TR1.</i>	73
<b>Figura 9</b>	<i>Cargas bacterianas totales durante las fases larvarias del camarón, con una comparación entre los grupos tratados (TR2) y el grupo de control (C2).</i>	74
<b>Figura 10</b>	<i>Análisis bacteriológico durante etapa de Zoea, Mysis y Postlarvas en el grupo Control (C-1)</i>	76

<b>Figura 11</b> <i>Análisis bacteriológico durante etapa de Zoea, Mysis y Postlarvas en el grupo Control (C-1).</i>	77
<b>Figura 12</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR1 en el ciclo 1.</i>	78
<b>Figura 13</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR1 en el ciclo 1.</i>	79
<b>Figura 14</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en C-2 en el ciclo 2.</i>	80
<b>Figura 15</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en C-2 en el ciclo 2.</i>	81
<b>Figura 16</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR2 en el ciclo 2.</i>	82
<b>Figura 17</b> <i>Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR2 en el ciclo 2.</i>	83
<b>Figura 18</b> <i>Diagrama de Flexplot de acuerdo con los tratamientos con ácidos orgánicos (AO1 -A02).</i>	85
<b>Figura 19</b> <i>Porcentaje total de supervivencia en los tratamientos experimentales</i>	92
<b>Figura 19</b> <i>Porcentaje total de supervivencia en los tratamientos experimentales</i>	92

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Caracterización del Género Vibrios spp según su flagelo y estilo de vida.</i>	42
<b>Tabla 2</b> <i>Ácidos orgánicos y su mecanismo de acción en la nutrición animal.</i>	50
<b>Tabla 3</b> <i>Tratamientos experimentales (Composición)</i>	59
<b>Tabla 4</b> <i>Dosificación de ácidos orgánicos según los tratamientos experimentales.</i>	60



<b>Tabla 5</b> Identificación de especies de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) basada en la coloración en los medios TCBS y CHROMagar™ Vibrio. _____	64
<b>Tabla 6</b> Grados de severidad de UFC/mL en larvas y postlarvas de camarón. _____	64
<b>Tabla 7</b> Registro de inicio y manejo de larvicultura en dos ciclos de cultivo. _____	67
<b>Tabla 8</b> Análisis descriptivo de las medias de crecimiento de Vibrio por tratamiento	69
<b>Tabla 9</b> Análisis del contraste de Igualdad de Varianzas (Levene) – TR1 vs C-1 _____	71
<b>Tabla 10</b> Análisis del contraste de Igualdad de Varianzas (Levene) – TR2 vs C-2 _____	71
<b>Tabla 11</b> Test U- Mann-Whitney para muestras independientes con respecto a los Vibrios totales en (C-1 vs TR1) _____	72
<b>Tabla 12</b> Test U- Mann-Whitney para muestras independientes con respecto a los Vibrios totales en (TR2 vs C-2) _____	73
<b>Tabla 13</b> Resultados de los halos de inhibición (CMI) _____	84
<b>Tabla 14</b> Supervivencia total por tratamiento en porcentaje. _____	87
<b>Tabla 15</b> Análisis descriptivo de la supervivencia con respecto a cada tratamiento. _	88
<b>Tabla 16</b> Análisis de ANOVA-Welch mediante la proyección de tratamientos. _____	89
<b>Tabla 17</b> Contraste de Igualdad de Varianzas (Brown-Forsythe) en postlarvas de <i>L. vannamei</i> en la supervivencia. _____	89
<b>Tabla 18</b> Contraste de Kruskal-Wallis en los tratamientos experimentales con respecto a la supervivencia. _____	90
<b>Tabla 19</b> Comparaciones Post-hoc de Dunn con correcciones de Bonferroni y Holm.	90

## GLOSARIO

1. **Ácidos orgánicos:** Compuestos químicos naturales utilizados en la larvicultura por sus propiedades beneficiosas para la salud y crecimiento de las larvas.
2. **Larvicultura:** Práctica especializada en la cría de larvas, enfocada en el desarrollo y producción de organismos acuáticos.
3. **Digestibilidad:** Capacidad de los alimentos para ser procesados eficientemente por el sistema digestivo de las larvas.
4. **Antimicrobiano:** Sustancias que protegen contra microorganismos dañinos en entornos de cría.
5. **Suplementación:** Adición de nutrientes o sustancias beneficiosas para optimizar la dieta y salud de las larvas.
6. **Biomasa:** Cantidad total de organismos vivos presentes en un área específica o volumen de agua, utilizada para medir la producción en la larvicultura.
7. **Mecanismo de acción:** Proceso específico mediante el cual una sustancia produce su efecto biológico o químico en un organismo. Es la forma en que interactúa a nivel molecular, celular o tisular para producir un cambio observable en el sistema biológico.

8. Supervivencia: Capacidad de un organismo para mantenerse con vida y sobrevivir en su entorno natural, enfrentando factores como la competencia por recursos, depredadores, enfermedades, y condiciones ambientales adversas.
  
9. Carga bacteriana: Cantidad de bacterias presentes en una muestra, generalmente expresada como el número de bacterias por unidad de volumen, peso o superficie. Es un indicador importante en microbiología para evaluar la concentración de bacterias en un entorno específico.
  
10. Muerte celular: Proceso en el cual una célula pierde su capacidad para mantener su estructura y función normales, resultando en su destrucción. Puede ser el resultado de factores externos como daño físico, químico o biológico, o de cambios internos como apoptosis (muerte celular programada).
  
11. Profilaxis: Acción preventiva que se toma para evitar una enfermedad, infección u otro problema de salud antes de que ocurra.

## ABREVIATURA Y SIMBOLOGÍA

- AHPND: Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
- Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>: Iones de sodio y potasio
- EMS: Síndrome de Mortalidad Temprana
- H<sup>+</sup> - ATP: Bomba de protones (ATPasa de protones)
- mm: Milímetros
- TR1: Tratamiento 1
- TR2: Tratamiento 2
- C-1: Control 1
- C-2: Control 2
- NPL: Nauplios por litro
- ha: Hectáreas
- kg/m<sup>3</sup>: Kilogramos por metro cúbico
- ppm: Partes por millón
- ppt: Partes por mil
- 1 g/kg AM: 1 gramo de sal por kilogramo de agua de mar
- mg/L: Miligramos por litro
- pls/m<sup>2</sup>: Postlarvas por metro cuadrado
- Laf: Numerosos flagelos laterales desnudos
- Fla: flagelo polar recubierto
- µm: Micrómetros
- NaCl: Cloruro de sodio
- pVA-1: Subunidad pirA de la toxina A del patógeno *Vibrio* AHPND

- pirA-B: Genes pirA y pirB de *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND)
- kpb: Kilobase pairs (kilobases, medida del tamaño del ADN)
- Células E, R, F y B: Diferentes tipos de células (Eritrocitos, Reticulocitos, Fibroblastos y Blastocitos)
- HP: Hepatopáncreas
- nm: Nanómetros
- (-COOH): Grupo carboxilo
- SCFAs: Ácidos grasos de cadena corta
- kg/m<sup>3</sup>: Kilogramos por metro cúbico
- pKa: Constante de disociación del ácido
- g/cm<sup>3</sup>: Gramos por centímetro cúbico
- g kg<sup>-1</sup>: Gramos por kilogramo
- mM: Milimolar (concentración molar)
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- TCBS: Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (medio de cultivo selectivo para *Vibrio*)
- UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
- TM: Toneladas métricas
- p/v: Peso por volumen
- µL: Microlitros
- TSA: Agar Tripticasa Soja (medio de cultivo bacteriano)

## 1. INTRODUCCIÓN

La cría del camarón blanco *L. vannamei* inició su trayectoria como actividad productiva en Ecuador en la década de 1960 - 1972 inicialmente en la provincia de El Oro, extendiéndose posteriormente a las provincias de Guayas, Manabí, Esmeraldas y Santa Elena (Pereira, 2022). En la actualidad, este sistema de cultivo se ha consolidado como uno de los principales pioneros en exportación contribuyendo al desarrollo de otros sectores como la cría de larvas, la producción de alimento balanceado, plantas empacadoras, empresas exportadoras y distribuidoras de insumos (Reyes, 2018).

A pesar de este éxito, surgen complicaciones relacionadas con los brotes de diversos agentes patógenos, como las especies del género *Vibrios spp*, lo que constituye obstáculos en la productividad final (Reyes-Mero, 2021). El género *Vibrio spp*, es ampliamente reconocido como el agente causal de patologías en países con industrias camaroneras desarrolladas. Por ejemplo, en Ecuador, se han documentado varias patologías, incluyendo los Síndromes de Bolitas (Blancas y Negras), el Síndrome de Zoea II, la vibriosis que afectan al estado biológico de *L. vannamei* (Triviño De la Cruz & Ortiz, 2020; Nuez et al., 2020).

Los agentes causales que tienen un mayor impacto en los sistemas de cultivo durante las etapas de larvicultura y engorde son *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus*, siendo estos los más perjudiciales (Ina-Salwany, 2019). En la actualidad, el patógeno emergente más significativo a nivel mundial es *Vibrio parahaemolyticus*, una bacteria que provoca la enfermedad de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) (Sony et al., 2021).

No obstante, también puede ser provocada por otras especies de (*V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. owensii*) (Tinoco y Dreyfus, 2017; Angulo et al., 2019). Desde que la FAO restringió el uso de antibióticos en 2006 debido a la creciente resistencia bacteriana, se han buscado diversas alternativas para combatir las infecciones bacterianas. Una estrategia adoptada ha sido la incorporación de ácidos orgánicos, los cuales obtienen propiedades antivirales en las dietas de los camarones (Li et al., 2018).

Los ácidos orgánicos y sus sales son una alternativa viable en la acuicultura, mejorando el crecimiento, utilización de nutrientes, accesibilidad de minerales, la microbiota intestinal de los animales acuáticos e incide a la prevención de enfermedades contribuyendo a la sostenibilidad de la producción (Ng & Koh, 2017). Sardar et al., (2020) menciona que los ácidos orgánicos son compuestos acidificantes que contienen grupos carboxílicos y pueden tener características insaturadas, hidroxílicas, fenólicas o multicarboxílicas.

Debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar las membranas celular de los bacilos gramnegativos (-) aumentando la concentración interna de aniones y desencadenando un mecanismo de compensación que acidifica el pH citoplasmático (Kontominas et al., 2021). Este mecanismo obliga a la bacteria a incrementar los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y glutamato, lo que eleva la fuerza iónica intracelular. Esto genera resulta una presión considerable sobre la pared del microorganismo, lo que eventualmente provoca su ruptura (Anangonó-Lara, 2014; Bremer & Krämer, 2019).

Estos compuestos se distinguen de otros acidificantes por su resistencia a la presencia de cloro, lo que les permite mejorar la digestibilidad de los alimentos. Esto resulta en una reducción del tiempo de retención y un aumento en la ingesta en organismos como *L. vannamei* (Silva et al., 2021). Además, actúan como agentes bacteriostáticos y bactericidas, ganando interés debido a su eficacia contra varios patógenos. Por lo general, están compuestos por ácidos grasos de cadena corta (C1-C7), ácidos grasos volátiles y ácidos carboxílicos débiles que contienen uno o más grupos carboxilo en su estructura (He et al., 2017).

El uso en dosis controladas ha mostrado un valor significativo como aditivos funcionales, ofreciendo beneficios como la reducción del pH, mayor palatabilidad de los alimentos, mejora en la actividad de las proteasas, suministro de energía y una conversión alimenticia más eficiente (Kavir et al., 2021). En esta investigación se evaluarán dos mezclas de ácidos orgánicos comerciales mediante tratamientos experimentales con un grupo control durante dos ciclos. El estudio tiene como objetivo determinar cuál de los tratamientos experimentales con diferentes composiciones resulta eficaz en el control de bacterias patógenas (*Vibrio spp*), en los tanques de *L. vannamei*, identificando las dosis adecuadas y analizando su impacto en la supervivencia.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas, la demanda de *L. vannamei* ha aumentado significativamente, destacándose en la industria acuícola porque contribuye tanto a la alimentación mundial como a la economía de muchos países. Sin embargo, para asegurar la sostenibilidad y seguridad alimentaria, es esencial abordar los desafíos relacionados con la inocuidad y calidad de las larvas de camarón, que están vinculados a prácticas de manejo, tratamientos profilácticos eficaces y el control de patógenos bacterianos en los sistemas de cultivo.

Las infecciones patológicas vinculadas al género *Vibrio spp.*, oportunistas por su rápida colonización en fragmentos del hepatopáncreas y del intestino, o su capacidad para provocar estrés y debilitamiento del sistema inmunológico del organismo afectado, tienen un impacto negativo en diversas etapas del ciclo de vida de los camarones, comprometiendo su supervivencia y la productividad final. Además, *Vibrio spp.* está estrechamente asociado con diversas afecciones en los camarones, como septicemia, síndrome de Zoea II, vibriosis y mortalidad temprana (EMS - AHPND).

Los síntomas se presentan con letargia, disminución del apetito, menor tasa de crecimiento, cambios en el color o textura del hepatopáncreas, y elevadas tasas de mortalidad. En respuesta a estos desafíos, los productores se enfrentan a una creciente presión en mejorar los protocolos de manejo, por este motivo, constantemente se han explorado nuevas estrategias y entre estas opciones, los ácidos orgánicos han surgido por sus propiedades antimicrobianas o antibacterianas.

Estos compuestos acidificantes pueden añadirse a la dieta de los camarones para controlar la proliferación de *Vibrio spp* y mejorar el rendimiento zootécnico, destacando la necesidad urgente de investigar y desarrollar tratamientos profilácticos alternativos. Sin embargo, es fundamental definir con precisión la dosis óptima y las funciones específicas de estos compuestos para complementar los tratamientos profilácticos actuales que, en algunos casos, resultan insuficientes.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La incorporación de ácidos orgánicos en las dietas de organismos acuáticos en estadios larvales ha surgido como alternativas porque desempeñan un papel crucial en la nutrición animal mediante diversos mecanismos de acción, lo que justifica su uso en la alimentación. En el tracto digestivo, los ácidos orgánicos incrementan la actividad de la pepsina y disminuyen el pH del estómago, favoreciendo cambios positivos en las concentraciones de microbiota.

A nivel metabólico, actúan como agentes antimicrobianos, reduciendo el pH y desnaturalizando proteínas, lo que mejora la salud y el rendimiento zootécnico de *L. vannamei*. Esto resulta en una mejora notable en la tasa de supervivencia de las larvas de *L. vannamei*, lo que a su vez incrementa significativamente la producción y rentabilidad final de las cosechas. Además, estos compuestos favorecen el equilibrio intestinal al estimular el crecimiento de bacterias benéficas y la producción de ácidos grasos volátiles.

Se ha demostrado que los ácidos orgánicos de cadena corta son efectivos en la inhibición de bacterias patógenas del género *Vibrio*, siendo particularmente útiles en forma de sales de sodio, como el ácido láctico, cítrico, acético, butírico, fórmico y propiónico. Estos hallazgos resaltan la capacidad antibacteriana de estos compuestos, lo cual contribuye a reducir la incidencia de enfermedades como la vibriosis, así como otras afecciones en etapas tempranas, tales como el síndrome de bolitas blancas, la enfermedad de necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND) causada por *V. parahaemolyticus*, y el síndrome de Zoea II.

En Ecuador, la información sobre el uso de ácidos orgánicos como aditivos antimicrobianos en la acuicultura es limitada y, en gran medida, controlada por las principales empresas productoras de insumos acuícolas. No obstante, al incorporarse en la dieta, los ácidos orgánicos tienen el potencial de actuar como una barrera protectora contra el crecimiento microbiano, mejorando así la salud de los camarones. Este enfoque podría ser rentable porque no solo inhibe patógenos, sino también respalda variables productivas, como la supervivencia en las etapas tempranas del cultivo de *L. vannamei*.

Al proporcionar un mejor entendimiento del comportamiento de las bacterias patógenas frente a estos compuestos y al reducir la presencia de patologías asociadas, se promueve una producción más sostenible. Esto no solo mejora la rentabilidad, sino también proporciona soluciones prácticas a la creciente deficiencia de tratamientos profilácticos alternativos que enfrenta la industria de la larvicultura actual.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL:**

Analizar la acción profiláctica de los ácidos orgánicos mediante ensayos *in vitro* y tratamientos experimentales en campo, determinando su efecto en la inhibición de *Vibrios spp* y supervivencia en larvas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Detectar la presencia de *Vibrio spp* en muestras biológicas de *L. vannamei* bajo la inclusión de los tratamientos con ácidos orgánicos como agentes profilácticos en la inhibición bacteriana.
- Comparar la actividad bacteriostática de ácidos orgánicos en presencia de *Vibrios spp* mediante pruebas de sensibilidad bacteriana y análisis microbiológico.
- Determinar la tasa de supervivencia de postlarvas del camarón *L. vannamei*, identificando la efectividad de los ácidos orgánicos en los tratamientos experimentales.

## 6. HIPÓTESIS

**H<sub>1</sub>:** La aplicación de ácidos orgánicos como método profiláctico disminuye la carga bacteriana y aumenta la tasa de supervivencia del camarón *L. vannamei*.

**H<sub>0</sub>:** La aplicación de ácidos orgánicos como método profiláctico no disminuye la carga bacteriana ni aumenta la tasa de supervivencia del camarón *L. vannamei*.

## CAPÍTULO II

### 7. MARCO TEÓRICO

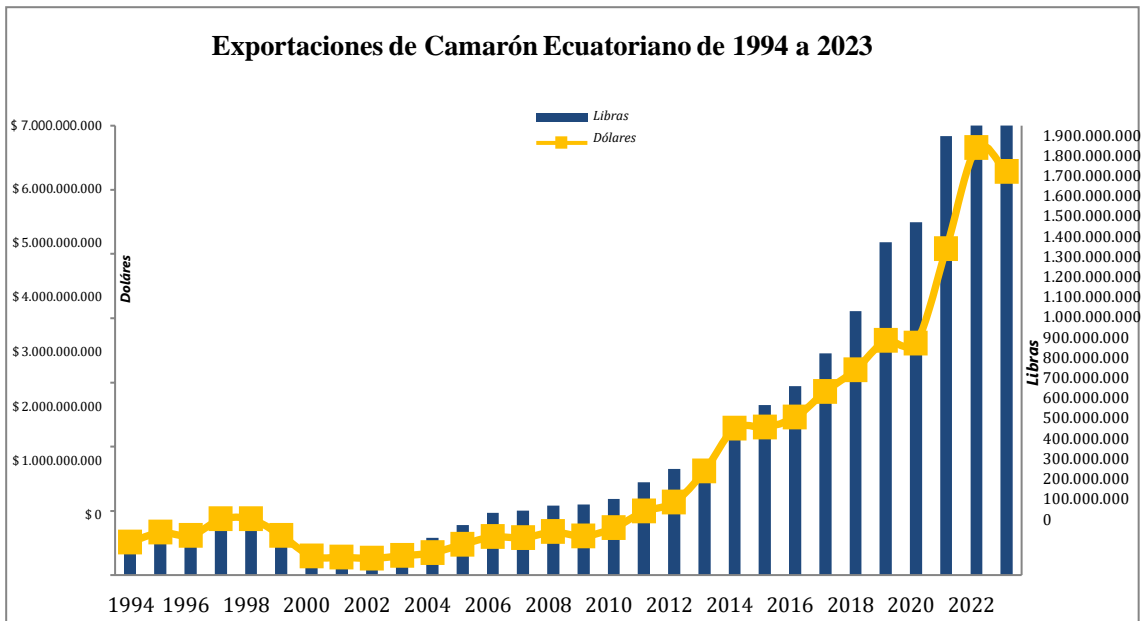
#### 7.1 Larvicultura en *L. vannamei* en Ecuador

El camarón blanco del Pacífico, conocido científicamente como *L. vannamei*, es una especie crucial en la acuicultura costera. Ecuador se ha destacado en la producción y exportación de camarón, generando impactos significativos en la economía a lo largo de los años. La cría de este crustáceo constituye aproximadamente el 15 % de la producción pesquera total, con un valor de mercado global que alcanza cerca de 18 mil millones de dólares (FAO, 2017 como se citó en Jaramillo et al., 2019).

La industria camaronera se posiciona como uno de los principales sectores más importante en términos de volumen exportable, lo cual han experimentado un crecimiento significativo en las últimas tres décadas, convirtiéndose como uno de los pioneros en productos de exportación no petrolera alcanzando 1.7 millones de TM y valores aproximados de USD6.655 millones con volúmenes de 1700 millones de libras en 2023 (Figura, 1), marcando récords para las exportaciones nacionales (Cámara Nacional de Acuicultura, 2024).

**Figura 1**

*Exportaciones de camarón Ecuatoriano de 1994 hasta 2023*



*Nota.* El gráfico representa las tendencias de exportaciones de camarón ecuatoriano desde el año 1994 a 2023, (ene - dic) Libras vs dólares. Estadísticas y reportes [Imagen- Excel], extraído de Cámara Nacional de Acuicultura, 2024, (<https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>).

## 7.2 Estadios o fases tempranas de crecimiento

Durante su crecimiento, este organismo pasa por varias fases de desarrollo: nauplio, zoea, mysis y postlarva (PL).

### 7.2.1 Nauplio:

El periodo de nauplio constituye una fase esencial en el ciclo de vida de los peneidos porque durante este proceso, los nauplios son larvas recién eclosionadas que obtienen una duración de aproximadamente 48 horas a temperaturas de 28°C (Gutiérrez, 2024). Su alimentación se basa en el vitelo, y atraviesan cinco subestadios (Nauplio I, II, III, IV, V) en un lapso que varía entre 36 a 51 horas (Palacios, 2024). Sus características



más notables es la longitud total que oscila alrededor de 0,5 mm y un ancho promedio de 0,18 a 0,2 mm, compuestos por un solo ocelo (Acosta & Muñoz, 2022; González, 2022).

### **7.2.2 Zoea**

Después de pasar por el estadio de nauplio V, que es la fase utilizada para la siembra en los tanques de producción de laboratorios, sigue el estadio de zoea, que se divide en tres subestadios (Zoea I-II-III). En Zoea I, el caparazón carece de espinas, el abdomen no está segmentado, el telson es bilobulado, y el ojo naupliar está presente. Esta fase tiene una duración aproximada de 36 a 48 horas, durante las cuales desarrollan abdomen y tracto digestivo, comenzando así alimentarse.

En Zoea II, se desarrolla el rostrum, el telson se bifurca, y los ojos se vuelven compuestos y pedunculados. En esta etapa, los urópodos aún no están presentes. La duración de este estadio es de aproximadamente 36 a 48 horas a una temperatura de 28°C (Acosta & Muñoz, 2022). En Zoea III, el caparazón es similar al subestadio anterior, con espinas supraorbitales más desarrolladas, telson separado del sexto segmento con espinas segmentadas, maxilipedios birramosos, pereiópodos y urópodos rudimentarios (García et al., 2020; Garnica, 2016).

### 7.2.3 Mysis

En el ciclo de desarrollo de Mysis comprende una fase de muda donde se puede observar un cuerpo encorvado en la región abdominal, y la locomoción se logra mediante contracciones abdominales. Este período consta de tres subestadios (MYSIS I, II, III) con una duración total de 3 días y longitud que varía de 2.8 a 5.2 mm (Chávez, 2022; García et al., 2020). En Mysis I, el cuerpo se asemeja al de un camarón, con pereiópodos bien desarrollados, telson alargado y funcional del primero al tercero con quela rudimentaria. El pleón carece de pleópodos, pero los urópodos ya están completos, y el nado es de cabeza o hacia adelante (Orrala, 2021).

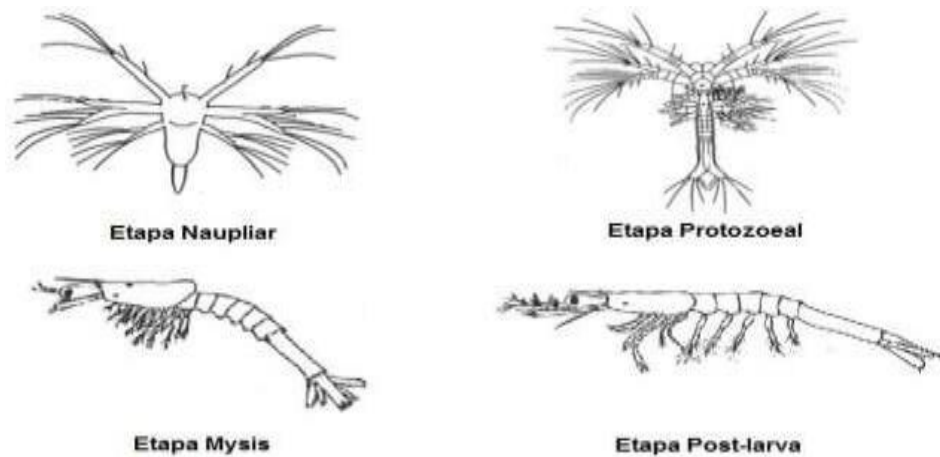
Mysis II presenta una escama antenal conspicua con espina externa, pereiópodos del primero al tercero desarrolladas, y pequeños pleópodos no segmentados que comienzan a emerger, curvados hacia adelante. El flagelo de la antena alcanza la escama, los pleópodos son más desarrollados y articulados, con 2 a 3 setas terminales (Acosta & Muñoz, 2022; Chávez, 2022). Durante las etapas de zoea y mysis, los camarones blancos son organismos planctónicos que se alimentan de materia orgánica muerta, algas y pequeños invertebrados. En la acuicultura comercial, el alimento para las larvas de camarón suele consistir en una o dos especies de diatomeas, como *Chaetoceros gracilis* y *Thalassiosira weissflogii*, con una concentración en el tanque de cría equivalente a  $1 \times 10^5$  células/mL (González, 2022).

#### 7.2.4 Post-larvas:

Después de completar el subestadio de mysis, los camarones avanzan a la fase de Postlarvas I, el cual se prolonga aproximadamente de 20 días. Este período de transición, que dura alrededor de 24 horas por subestadio, marca el desarrollo hacia organismos plenamente funcionales, semejantes a pequeños camarones. Durante esta etapa, las postlarvas obtienen una talla promedio de 5 mm a 25mm y son transportadas a instalaciones de cría en condiciones semicontroladas, como estanques de invernadero o piscinas terrestres, antes de su fase decrecimiento (Acosta & Muñoz, 2022; García et al., 2020). Durante las fases mysis y postlarval, la alimentación comúnmente es: microcrustáceo y *Artemia salina*. Aunque en muchos criaderos, el alimento vivo es reemplazado por alternativas artificiales (Bengtson et al., 2018).

#### Figura 2

*Estadios tempranos de crecimiento en L. vannamei*



*Nota.* Adaptado de *Manual de Laboratorio para el Cultivo de Larvas de Camarón Peneido* (p. 19), extraído de Garnica, 2016.

### 7.3 Sistema semi- intensivo en larvicultura de *L. vannamei*

En la acuicultura moderna, los sistemas semi-intensivos han surgido como una estrategia intermedia que combina elementos de métodos tradicionales, extensivos e intensivos. Además, son reconocidos por proporcionar un entorno adecuado para el crecimiento de organismos acuáticos como *L. vannamei*. Esto se logra manteniendo protocolo de manejo y control, aunque menos exhaustivo como en sistemas intensivos. Por ejemplo, al momento de introducir nuevos ejemplares para la larvicultura, es necesario calcular la cantidad adecuada de biomasa por tanque, por lo que suele oscilar entre 120 a 175 NPL (Skretting, 2018).

Por otro lado, la viabilidad económica de la producción final en este sistema está determinada en gran medida por la disponibilidad de recursos como los recambios de agua y los insumos esenciales, así como por la inversión inicial requerida (Cavalheiro et al., 2022). Carvajal & Bolaños (2013) consideran que en América latina se emplean comúnmente el método de cultivo *semi-intensivo*, los cuales suelen consistir en 1 a 5 ha de extensión con densidades de siembra que abastecen desde 10 a 30 PL/m<sup>2</sup>. Para la renovación de los recambios de agua, se utiliza un sistema de bombeo, y la profundidad de los estanques oscilan entre 1 a 1,2 m con aireación artificial controlada (Vivanco, 2018).

La alimentación de los camarones se basa en productos naturales y exógena, por lo que se promueve su crecimiento mediante la fertilización del estanque, simultáneamente la alimentación de 2 a 3 veces al día. Los rendimientos de producción en estos estanques varían entre 500 a 2.000 kg/ha/cosecha, por ende, los camarones son cultivados en

estanques o sistemas de recirculación con cierta densidad de siembra específica, que generalmente se sitúa entre 10 - 25 kg/m<sup>3</sup> de carga (Álvarez, 2022; Castro & Ordinola, 2021).

Estrada et al., (2022) sugiere que el manejo y control son aspectos esenciales para el éxito de este sistema, los cuales se basan en protocolos de recambios de agua y monitorización constante de la calidad del agua, asegurando que los niveles de oxígeno, pH, temperatura, y equilibrio iónico sean parámetros óptimos para el crecimiento saludable de los organismos cultivados. Además, se deben implementar prácticas de alimentación adecuadas para satisfacer las necesidades nutricionales de los organismos, minimizando el desperdicio y maximizando la eficiencia de la conversión alimenticia (Álvarez, 2022; Rojas, 2018).

### **7.3.1 Parámetros generales para el cultivo semi-intensivo del camarón blanco *L. vannamei***

#### **7.3.1.1 Temperatura del agua**

La temperatura tiene un impacto significativo en los procesos químicos y biológicos, pues cuando esta excede los 10°C, dichos procesos suelen acelerarse de dos a tres veces, lo que a su vez incrementa el consumo de oxígeno por parte de los camarones u otros organismos aeróbicos en el estanque (Reyes, 2017). En un estanque, la radiación solar calienta más el agua superficial que el agua del fondo, debido a la disminución de la densidad con el aumento de la temperatura, por lo que provoca una estratificación térmica, dividiendo el agua en dos capas distintas: el epilimnion (capa cálida superior), y el hipolimnion (capa fría inferior) (Canales-Machado et al., 2017; Orrala, 2021).

Aunque es posible que, en estanques de poca profundidad, como los de 1 m promedio, se produzca estratificación térmica, esta no suele ser muy estable debido al movimiento del agua provocado por el viento. Los principios generales de manejo de la temperatura en el cultivo de camarones sugieren mantener niveles óptimos entre 28 a 33°C (Castro & Ordinola, 2021; Carvajal & Bolaños, 2013).

### **7.3.1.2 Salinidad**

La salinidad se define como la concentración total de iones (sales) disueltos en el agua, y se mide en partes por mil (ppt). Los camarones tienen un amplio rango de tolerancia a la salinidad, pudiendo sobrevivir en niveles que oscilan entre 15 ppt a 25 ppt (Galaviz et al., 2016; García et al., 2020). Los organismos expuestos a grandes variaciones en la concentración de sales disueltas en el agua experimentan presión osmótica, lo que puede llevar a la difusión de agua a través de las paredes celulares en las branquias, resultando en la muerte de estas células. En los estanques, tanto la salinidad como la temperatura pueden causar estratificación del agua porque la densidad del agua aumenta con la salinidad (Canales-Machado et al., 2017).

### **7.3.1.3 Oxígeno disuelto**

La concentración de oxígeno disuelto en el agua, medida en (mg/L), es crucial para la vida acuática, siendo el segundo gas más abundante después del nitrógeno. Una disminución significativa en los niveles de oxígeno causa estrés en los organismos y aumenta las tasas de mortalidad. En el cultivo de camarones, el rango de concentración adecuado de oxígeno disuelto varía entre 3.0 a 8.0 mg/L (Hernández & Jiroó, 2023; García et al., 2021).

Una concentración mínima de 3.0 mg/L de oxígeno disuelto es necesaria para mantener el metabolismo normal de las especies de camarones en cultivo y la supervivencia de estas especies se ve comprometida cuando la concentración de oxígeno disuelto desciende por debajo de 1.3 mg/L considerándose letal durante más de una hora (Canales-Machado et al., 2017; Orrala, 2021).

### **7.3.1.5 pH**

El pH se mide como el logaritmo de la concentración de iones hidrógeno en una solución, y los niveles óptimos en un cultivo de camarón se sitúan en 6.5 a 8. Si las condiciones no son adecuadas, pueden inhibir el crecimiento de los organismos benéficos, afectar la disponibilidad de nutrientes, aumentar la toxicidad de ciertos compuestos, reducir la actividad enzimática, alterar la microbiota y causar estrés fisiológico, comprometiendo así la salud y el desarrollo de estos organismos (Sandoval, 2023).

Antes de colonizar el intestino, las bacterias del género *Vibrio* deben atravesar el estómago, donde enfrentan condiciones altamente ácidas. En respuesta a los cambios de pH, estos microorganismos han desarrollado la capacidad de regular la actividad y síntesis de proteínas, lo que les permite no solo sobrevivir en condiciones extremas, sino también incrementar su capacidad para proliferar. En consecuencia, expresan un conjunto de genes, incluidos aquellos relacionados con la virulencia, como parte de su estrategia para adaptarse y colonizar (Correa, 2018).

#### 7.4. Particularidades del género *Vibrio spp*

El género bacteriano *Vibrio spp* está compuesto por bacterias gramnegativas que logran crecer tanto en presencia de oxígeno (aerobias) como en su ausencia (anaerobias facultativas) (Silva, 2021). Las características distintivas de las bacterias del género *Vibrio* incluyen su forma curvada, su dependencia del ambiente salino (halodependientes), lo que significa que requieren la presencia de cloruro sódico para su crecimiento en concentraciones variables (Prasanga et al., 2022).

Además, estas bacterias son catalasas u oxidasas positivas porque poseen nitratorreductasa y triptofanodesaminasa. También son capaces de fermentar glucosa, es importante señalar que, aunque *Aeromonas* y *Plesiomonas* también fermentan glucosa, no tienen la misma dependencia del ambiente salino que las bacterias del género *Vibrio*. Son comúnmente hallados en ambientes marinos, salobres y estuarinos, por lo que tienden a proliferar cuando las temperaturas del agua aumentan, alcanzando su máximo desarrollo entre los 17 a 20 °C. (Tinoco & Dreyfus, 2017).

En temperaturas más bajas, suelen permanecer en el sedimento marino, con recuentos generalmente insuficientes para provocar infecciones. En climas templados, están presentes en el agua marina durante todo el año, pero su concentración aumenta notablemente en los meses cálidos debido a condiciones ecológicas favorables y al incremento del plancton, lo cual facilita su acumulación por parte de moluscos filtradores u otros organismos marinos (Hernández & Jiroó, 2023).



#### 7.4.1 Estructura del flagelo polar en la familia Vibrionaceae

Los *Vibrios spp* son un grupo de bacterias que pertenecen a la familia Vibrionaceae. Esta familia incluye varios géneros, como *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* (Triviño de la Cruz & Ortiz, 2020). En las especies pertenecientes al género *Vibrio*, el flagelo es una estructura compuesta por un heteropolímero de 4 a 6 fagelinas diferentes (FlaABCDFE), cuya cantidad varía según la especie (Tinoco & Dreyfus, 2017).

En bacterias marinas como *V. cholerae*, *V. alginolyticus* o *V. parahaemolyticus*, el mantenimiento del pH intracelular entre 8 a 9 a través de sistemas de homeostasis resulta en una baja fuerza protón motriz ( $H^+$ ). Para contrarrestar esta situación, las bacterias de la familia Vibrionaceae utilizan un gradiente electroquímico de iones sodio ( $Na^+$ ) como fuente de energía para impulsar la rotación del flagelo polar, lo cual es crucial para el movimiento efectivo del flagelo (Xu et al., 2017).

Algunas especies pertenecientes a este género exhiben dos tipos de flagelos: un flagelo polar cubierto (Fla) y varios flagelos laterales desnudos (Laf) a lo largo del cuerpo celular (distribución peritrica). Entre estas especies, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. shilonii* poseen un flagelo polar constante y flagelos laterales que se desarrollan de manera inducible. En contraste, otras especies del género, como *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *V. fischeri* y *V. vulnificus*, no tienen flagelos laterales (Prasanga et al., 2022; Tinoco y Dreyfus, 2017) (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Caracterización del Género Vibrios spp según su flagelo y estilo de vida.*

Microorganismos	Flagelo polar recubierto <sup>1</sup>	Flagelos laterales desnudos (peritricos) <sup>2</sup>	Estilo de vida
<i>V. alginolyticus</i>	Monotrico	+	Patógeno
<i>V. anguillarum</i>	Monotrico	-	Patógeno
<i>V. cholerae</i>	Monotrico	-	Patógeno
<i>V. fischeri</i>	Lofotrico (2-B) <sup>3</sup>	-	Simbionte
<i>V. harveyi</i>	Monotrico	+	Patógeno
<i>V. parahaemolyticus</i>	Monotrico	+	Patógeno
<i>V. shilonii</i>	Monotrico	+	Patógeno
<i>V. vulnificus</i>	Monotrico	-	Patógeno

*Nota.* Esta tabla muestra la observación de microscopía electrónica de transmisión de cultivo en medio líquido y sólido. (Tinoco y Dreyfus, 2017)

#### 7.4.2 Género *Vibrios spp*

En la actualidad, el género *Vibrio spp* cuenta con aproximadamente 100 especies reconocidas, de las cuales 12 son patógenas para los seres humanos y generalmente las especies de *Vibrio* que causan altas mortalidades en el camarón son *V. penaeicida*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* (Prasanga et al., 2022). Las bacterias del género *Vibrio spp.*, se caracterizan por ser bacilos gramnegativos que no forman esporas, con una longitud que oscila entre 1,4 a 2,6  $\mu\text{m}$ . Mayormente, son positivas para la prueba de oxidasa y presentan una forma que puede ser recta o curva, adoptando una forma de coma. En medios de cultivo, estas

bacterias aparecen como varillas rectas debido a que presentan un solo flagelo polar monotrico, que puede volverse multitrico cuando crecen en medios líquidos y tienden ser tanto aeróbicos como anaeróbicos facultativos (Aguirre-Chanta, 2019).

Las especies halófilas de este género requieren la presencia de cloruro de sodio (NaCl) para su crecimiento, con concentraciones ideales entre 10 - 18 ‰ NaCl, y toleran niveles que van desde 2 hasta 2.5 ‰ NaCl. Estas bacterias suelen ser positivas para oxidasa y catalasa, fermentan la glucosa sin producción de gas, y tienen la capacidad de reducir nitrato a nitrito. Estas características fisiológicas son fundamentales para la adaptación de *Vibrio spp* a condiciones variables de temperatura y salinidad, lo que les permite prosperar en ambientes marinos y estuarinos (Drouboganmis & Katharios, 2022; Xu et al., 2017).

Este tipo de bacterias están distribuidas en entornos acuáticos, particularmente en marinos y estuarinos, por lo que tienden a colonizar las branquias, cutículas y tracto digestivo. Cuando el sistema inmunológico del camarón se debilita, estas bacterias pueden convertirse en patógenos oportunistas, desencadenando brotes cuando las condiciones ambientales favorecen su proliferación (Peña & Cuéllar, 2019). Morales-Covarrubias (2011, citado por Triviño de la Cruz & Ortiz, 2020) afirma que este género es altamente patogénico, provocando enfermedades como la vibriosis sistémica o síndrome de la gaviota, que puede resultar en mortalidades de hasta el 90%; la erosión bacteriana del cefalotórax (manchas marrones o negras); el síndrome de la zoea II frecuentemente en larvicultura caracterizado por la presencia de bolitas en el intestino; y la enfermedad de la luminiscencia.

Además, la AHPND, responsable de considerables pérdidas en la producción y causada por una cepa de *V. parahaemolyticus* infectada con un plásmido (pVA-1) con genes de las toxinas pirA-B, esta enfermedad se distingue por inducir la atrofia del hepatopáncreas, acompañada de una descamación extensiva de células epiteliales y mortalidad de los animales (Sandoval, 2023; Peña-Navarro, 2019).

*Vibrio alginolyticus*, anteriormente conocido como *Vibrio parahaemolyticus* (biotipo II), es notable por su alta tolerancia a la salinidad, pudiendo sobrevivir en concentraciones de hasta un 10% de cloruro de sodio. Aunque este microorganismo puede causar infecciones gastrointestinales en humanos, así como infecciones ocasionales fuera del tracto gastrointestinal, generalmente exhibe baja virulencia (Mira-Gutiérrez & García-Martos, 2016).

*Vibrio vulnificus* es una bacteria en forma de bacilo perteneciente al filo Proteobacteria, conocido como la especie halófila más virulenta para los seres humanos, especialmente en individuos con enfermedades hepáticas, niveles elevados de hierro sérico u otras afecciones (Silva, 2021). Se han identificado varios mecanismos de patogenicidad en *V. vulnificus*, que incluyen la producción de citolisina o hemolisina, colagenasa, elastasa, factor de permeabilidad vascular, fosfolipasa A2, lipofosfolipasa y sideróforos (Baizabal et al., 2011). Es un tipo de bacteria que necesita ciertos rangos de temperatura de 37 °C y niveles de acidez para crecer que va desde ligeramente ácido hasta alcalino, con un pH ideal (7.0 - 8.0), indicando una preferencia por un ambiente neutro a ligeramente alcalino (Teng et al., 2017; Mira-Gutiérrez & García-Martos, 2016)

Además de su impacto en la salud humana, algunas especies de *Vibrio* son conocidas por ser patógenas en la acuicultura. Algunos ejemplos bacterianos son *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* y *V. fischeri*. En particular, *V. parahaemolyticus* es señalado como un agente patógeno significativo en los cultivos, pues esta bacteria es responsable del síndrome de mortalidad temprana (EMS), también conocido como la enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND) (Sandoval, 2023; Aguirre-Chanta, 2019).

### **7.5 Patologías bacterianas asociadas al cultivo de *L. vannamei***

La rápida expansión de la acuicultura comercial de camarones peneidos enfrenta amenazas, siendo una de las más predecibles y constantes la ocasionada por un grupo de bacterias pertenecientes a especies de *Vibrios sp*, generándose la Vibriosis dentro de los medios de cultivos (Varela et al., 2017).

#### **7.5.1 Enfermedad de la Necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND)**

La enfermedad afecta a especies como *Penaeus monodon* y *L. vannamei*, en sus inicios se reconoció a esta enfermedad como “síndrome de mortalidad temprana” caracterizándose por la ocurrencia de mortalidades masivas que oscilan entre el 40% a 100% durante los primeros 5 a 35 días de cultivo y poco después de la aparición de los primeros signos de la enfermedad (Varela-Mejías, 2018).

El agente causante de la AHPND es una cepa patógena de *Vibrio parahaemolyticus* (VpNHPA), que posee un plásmido de ~70 kpb con genes que codifican proteínas de toxinas asociadas con *Photobacterium* (Pir), concretamente, (PirA –PirB) (Sandoval, 2023; Varela & Peña, 2016), aunque también investigaciones posteriores han indicado que pueden surgir por cepas de *V. harveyi* y *V. campbellii*, y posiblemente otras especies o géneros que tienen la capacidad de transferir un plásmido que codifica toxinas.

A diferencia de otras bacterias que se alojan en la hepatopáncreas del camarón, estas bacterias residen en su estómago. Desde allí, liberan toxinas que causan lesiones en la hepatopáncreas, lo que resulta en desprendimientos celulares masivos, debido a que ingresa al organismo por vía oral a través de los detritos presentes en la columna de agua y el fondo del estanque. Una vez dentro del tracto digestivo, esta bacteria coloniza y produce toxinas que causan disfunción en las células de la hepatopáncreas (HP), destruyendo las células E, R, F y B, y provocando el desprendimiento de las células epiteliales tubulares, así como inflamación hemocítica y necrosis marcada del HP (Varela et al., 2017).

### **7.5.2 Síndrome de bolitas blancas**

Según Siñoes (2007, como se citó en Reyes-Mero, 2021), menciona que esta patología está vinculada a *V. alginolyticus* o *V. harveyi*, lo cual se caracteriza por la presencia de pequeñas formaciones esféricas, que son el resultado de células descamadas del hepatopáncreas o hepatocitos hipertrofiados y redondeados, resultando en la pérdida de casi el 100% de la población.

### **7.5.3 Síndrome de Zoea II**

En Ecuador, se ha determinado que *V. harveyi*, es el principal causante de esta patología, aunque algunos estudios han sugerido la posible implicación de bacterias intracelulares. Esta infección fue identificada por primera vez en el año 1993 en cultivos de camarón *L. vannamei* en Ecuador, México y Estados Unidos (Zhang & Austin, 2020). Después de 36-48 horas desde que ocurre la metamorfosis de Zoea I a Zoea II, se observan altas tasas de mortalidad. Los síntomas más destacados es la pérdida de apetito, letargo acompañado de nado errático, y la tendencia de los organismos infectados a permanecer en el fondo del tanque (Zambrano, 2023).

### **7.6. Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos son compuestos de hidrocarburos que presentan uno o varios grupos carboxilo (-COOH), generan a partir de la combinación de dos grupos funcionales en un mismo átomo de carbono: el grupo hidroxilo y el grupo carbonilo (Benavides & Jacome, 2023). Estos compuestos son considerados seguros y contienen uno o más grupos carboxilo. Entre los ácidos de cadena corta, que tienen un número reducido de carbonos (C1-C5), incluyen el ácido láctico, fórmico, cítrico, propiónico y sus sales (Chowdhury et al., 2021; Dun et al., 2018).

Beyer & Walter (2020) afirma que los ácidos orgánicos (AO's) son típicamente poco solubles en agua, pero solubles en cloroformo, éter o benceno, lo que los hacen resistentes al cloro. En los tejidos biológicos, se distribuyen de diversas formas, participando como mediadores en los ciclos metabólicos. Algunos de estos compuestos acidificantes se regeneran en el tracto digestivo mediante procesos de fermentación (Reyes-León, 2017).

### **7.6.1 Mecanismo de acción**

Los ácidos orgánicos regulan los microorganismos en el tracto digestivo reduciendo el pH de la ingesta, lo que inhibe significativamente el crecimiento microbiano. Esta acidificación no solo dificulta la supervivencia de los microorganismos, sino que también fortalece la barrera intestinal, previniendo la invasión de patógenos y manteniendo un equilibrio de la microbiota saludable para la digestión (Kavir et al., 2021; Chowdhury et al., 2021).

La mayoría de las bacterias no crecen bien a pH inferiores a 5, aunque esta acidez no garantiza la eliminación completa de los microorganismos, ya que muchas bacterias pueden sobrevivir en estas condiciones por períodos prolongados. Un pH extracelular desviado de 7 interfiere con el gradiente de protones, esencial para el transporte a través de la membrana, la motilidad y la síntesis de ATP. Así, el metabolismo anaeróbico de las bacterias está regulado por el pH del medio, y la efectividad de la acidificación depende tanto de la concentración como de la fuerza del ácido presente (Gao et al., 2023; Silva et al., 2016).

Aunque todos los microorganismos tienen un pH óptimo para su desarrollo y un rango de pH en el que les resulta difícil o imposible crecer, es crucial destacar que este pH se refiere al entorno extracelular. Incluso los organismos acidófilos, que prosperan en entornos ácidos, mantienen un pH intracelular cercano a la neutralidad. Esto indica la importancia del equilibrio ácido-base en la regulación del crecimiento microbiano y en la eficacia de los agentes antimicrobianos (Ng & Kon, 2017; Reyes, 2017).



Según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, el equilibrio entre la forma disociada (anión) y no disociada ( $H^+$ ) de los ácidos depende del pH y la constante de disociación ( $pK_a$ ). A medida que el  $pK_a$  disminuye, la fuerza del ácido aumenta. La forma no disociada puede atravesar la membrana celular y, una vez dentro, disociarse en aniones y protones, alterando el pH del citoplasma (Nurhan-Gümrükçüoğlu, 2022, pág. 153; Taylor & Doores, 2020). Esto representa una dificultad para las bacterias porque deben mantener un pH constante para la funcionalidad de sus macromoléculas, lo que implica la expulsión de protones al exterior. Sin embargo, este proceso requiere energía en forma de ATP, lo que puede llevar al agotamiento de la energía celular (Kavir et al., 2021; Reyes, 2017)

Además de su efecto general sobre el pH extracelular, los ácidos orgánicos ejercen una influencia notable a nivel intracelular debido a su capacidad para atravesar la membrana celular en su forma no disociada. Esta forma molecular puede penetrar fácilmente las membranas y llegar al interior de las células microbianas, donde induce una reducción adicional del pH intracelular (Zhou et al., 2022; Mine & Boopathy, 2011). En conjunto, estos mecanismos de acción convierten a los ácidos orgánicos en una herramienta esencial para la promoción de la salud intestinal y la prevención de enfermedades asociadas con desequilibrios microbianos en el tracto digestivo (Zambrano, 2023) (Tabla 2).

Es importante destacar que, debido a la escala logarítmica del pH, una reducción mínima de 1 o 2 unidades (representa un incremento de 10 o 100 veces) en la concentración de protones puede tener un impacto significativo en el crecimiento de los

microorganismos. Este fenómeno resalta la susceptibilidad que presentan a los cambios en el entorno ácido-base (Hernández & Jiroó, 2023; Taylor & Doores, 2020).

**Tabla 2**

*Ácidos orgánicos y su mecanismo de acción en la nutrición animal.*

<b>SITIOS DE ACCIÓN</b>	<b>MECANISMO DE ACCIÓN</b>	<b>FORMA EFECTIVA</b>
<i>Tracto intestinal</i>	Reducción del pH del estómago, cambios en las concentraciones de microbiota y aumento en la actividad pepsina	H <sup>+</sup>
	Disponibilidad de cationes (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> )	Anión
<i>Metabolismo</i>	H <sup>+</sup> y Anión.	Efecto antimicrobiano
<i>Dieta</i>	Reducción del pH, reducción del crecimiento microbiano y desnaturalización de proteínas.	H <sup>+</sup>
		Efecto antimicrobiano
		H <sup>+</sup> y Anión

*Nota.* Tabla extraída de Reyes, 2014 citado por Benavides y Jácome, 2023.

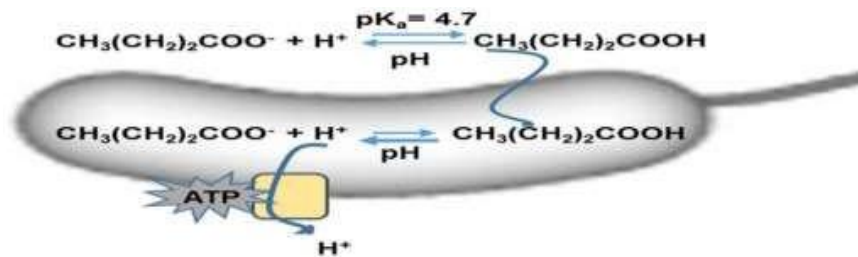
### 7.6.2 Valor de pKa

El valor de pKa indica la fuerza de un ácido en disolución acuosa, es decir, cuanto menor sea el valor de pKa, mayor será la capacidad del ácido para disociarse en iones H<sup>+</sup> y, por lo tanto, más bajo será el pH de la disolución. Los ácidos débiles tienen valores de pKa que varían típicamente entre 1,80×10<sup>-16</sup> y 55,50. En contraste, los ácidos con una constante de pKa inferior a -2 se clasifican como ácidos fuertes porque se disocian casi por completo cuando se disuelven en agua (Zhou et al., 2022; Anangón-Lara, 2014).

Cuando el ácido se disocia en el interior de la célula, se incrementa la concentración de aniones, lo que activa un mecanismo de compensación de la carga eléctrica. Este mecanismo obliga a la bacteria a elevar los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o glutamato, lo que conlleva a un aumento mayor de la fuerza iónica intracelular (Figura, 3). Este proceso suele generar presión mecánica sobre la pared del microorganismo, lo que, eventualmente causa su ruptura (Rodríguez, 2020; Orrala, 2021).

### Figura 3

*Proceso de acción antimicrobiana de los SCFAs (ácidos grasos de cadena corta), utilizando el ácido butírico.*



*Nota.* La figura ilustra el mecanismo de acción del ácido butírico en su forma no disociada, penetrando la membrana celular (a), donde luego se disocia en el citoplasma (b). Se requiere un consumo energético para eliminar el exceso de protones ( $\text{H}^+$ ) al exterior (Defoirdt et al., 2009).

## 7.7 Efectos de Ácidos orgánicos en larvicultura

El uso de ácidos orgánicos en la larvicultura de camarones mejora la digestibilidad de la dieta y la supervivencia de estos organismos al optimizar la absorción de nutrientes. Además, estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas que inhiben patógenos, estabilizan el pH intestinal y promueven un entorno favorable para bacterias beneficiosas, lo que fortalece el sistema inmunológico de las larvas de *L. vannamei* (De Souza & Wan, 2021; Yao et al., 2019).

Reyes (2017) menciona que los ácidos orgánicos presentan varias ventajas en comparación con otras sustancias acidificantes. No se ven afectados por la presencia de cloro y pueden mejorar el proceso de digestibilidad, lo que disminuye el tiempo de retención del alimento y aumenta la ingesta en diferentes organismos como *L. vannamei*. Además, inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos digestivos al reducir el pH del tracto digestivo porque presentan actividad bactericida y bacteriostática. Son estables frente a variaciones en el pH, luz, altas temperaturas, y mantienen su actividad en presencia de materia orgánica (Kavir et al., 2021; Hernández & Jiroó, 2023).

## **7.8 Grupo de ácidos orgánicos usados en larvicultura**

Entre los conservantes más utilizados se encuentran el ácido fórmico, reconocido por su acción bactericida, y el ácido propiónico, destacado por su potente actividad antifúngica. Además, el ácido cítrico y el ácido fumárico se emplean frecuentemente como acidificantes. Otros ácidos en creciente uso incluyen el ácido acético, el ácido láctico, el ácido sórbico y el ácido málico, así como sus diversas combinaciones. Estos ácidos orgánicos combinan propiedades conservantes y acidificantes (Iperty & Alberto, 2021; Zambrano, 2023).

### **7.8.1 Ácido fórmico**

Este ácido es un compuesto utilizado en la acuicultura para mejorar la calidad del agua en los cultivos, demostrando eficacia en la reducción de las concentraciones de amonio. Además, actúa como un agente antimicrobiano efectivo en el control de patógenos, siendo una alternativa profiláctica eficiente que permite disminuir el uso de químicos convencionales (Zambrano, 2023; Ortiz & Wilder, 2019). Es el ácido

carboxílico más simple y tiene un pKa de 3,75 lo que indica que, a pesar de su origen orgánico, es un ácido fuerte (Arteaga, 2017; Llorens-Molina, 2018 citado por Benavides & Jácome, 2023).

### **7.8.2 Ácido láctico**

El ácido láctico es un compuesto con propiedades ácidas moderadas y una estructura que incluye un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo carboxilo (-COOH) (Beyer & Walter, 2020). Es el segundo ácido carboxílico más simple después del ácido fórmico y términos de reactividad, el ácido láctico es estable bajo condiciones normales, pero puede descomponerse bajo calor extremo y reaccionar con bases fuertes, oxidantes y agentes reductores, formando lactato en presencia de bases (San Frutos de Diego, 2019). Este compuesto posee una constante de acidez (pKa) de aproximadamente 4,76 y existe en dos formas isoméricas: L-láctico y D-láctico, siendo la forma L la más común en los organismos vivos (Reyes, 2017; Kavir et al., 2021)

En la camaronicultura, el ácido láctico se utiliza para controlar la proliferación de patógenos, lo que mejora la salud de los camarones y la calidad del agua, reduciendo la incidencia de enfermedades y aumentando la tasa de crecimiento (Chávez & Llanos, 2015). Sin embargo, es crucial gestionar adecuadamente su concentración y tipo, ya que puede reducir el pH del agua y potencialmente interferir con otros tratamientos químicos o bacterianos. Además de su uso para inhibir patógenos, el ácido láctico se emplea en la industria alimentaria como conservante, complementando la dieta junto con otros aditivos y la alimentación básica de los organismos (Reyes, 2017; Benavides & Jácome, 2023).

### 7.8.3 Ácido propiónico

El ácido propiónico es un ácido de origen natural y tanto el ácido propiónico como sus sales, los propionatos, se utilizan principalmente como conservantes contra los hongos, calidad del agua y disminución de patógenos (Zambrano, 2023). El ácido propiónico tiene un pKa de 4.88, indicando su capacidad para liberar protones en solución acuosa y clasificándose como un ácido débil (Reyes, 2017; San Frutos de Diego, 2019).

### 7.8.4 Ácido cítrico

El ácido cítrico, uno de los ácidos orgánicos más investigados en la acuicultura, es conocido por sus múltiples beneficios. Sus sales se utilizan para mejorar el crecimiento, la asimilación del alimento y minerales, especialmente fósforo. Por tal motivo, recientes estudios han demostrado que el ácido cítrico consigue mejorar el valor nutricional de los alimentos para el camarón *L. vannamei*, contribuyendo a maximizar la supervivencia, la resistencia a la vibriosis y la respuesta inmune del camarón (Reyes, 2017; Bioaquafloc, 2020 citado por Benavides & Jácome, 2023).

En términos de propiedades químicas, el ácido cítrico es conocido por ser un ácido débil con un valor de pKa (3.13, 4.77, y 6.39) para sus tres grupos carboxílicos. Estas características lo hacen útil no solo como un conservante y acidulante en alimentos, sino también como un mejorador del rendimiento en la acuicultura (Rabeharitsara et al., 2020). Mediante el estudio por Su et al., (2014) observaron que la inclusión de ácido cítrico en la dieta del camarón *L. vannamei* conlleva mejoras en el crecimiento, la actividad enzimática y la resistencia a *Vibrio alginolyticus*. Los mayores incrementos en el crecimiento se

registraron al añadir 2.0 g - kg<sup>-1</sup> de ácido cítrico. En el estudio de Reyes (2017) se observó que el ácido cítrico mostró un amplio espectro de inhibición contra las cinco cepas de *V. parahaemolyticus* (AHPND+), aunque este efecto solo se logró con concentraciones elevadas (100mM).

### **7.8.5 Lactato de Calcio**

El lactato de calcio se usa en la acuicultura tanto como fuente de calcio como agente tamponante para mantener el pH. Se aplica con frecuencia en sistemas semi-intensivos para asegurar la estabilidad del agua y el equilibrio del pH. El calcio es esencial en varios procesos fisiológicos de los camarones, incluyendo la formación del exoesqueleto y la regulación de la función muscular (Reyes, 2017; Valenzuela et al., 2020; Zhang et al., 2020). El valor de pKa del ácido láctico se sitúa alrededor de 3.86 para el grupo carboxilo (-COOH), esta propiedad influye en su capacidad para actuar como agente tamponante porque puede disociarse y liberar iones H<sup>+</sup> para mantener el pH dentro de un rango deseado (Ortiz & Wilder, 2019; Benavides & Jácome, 2023).

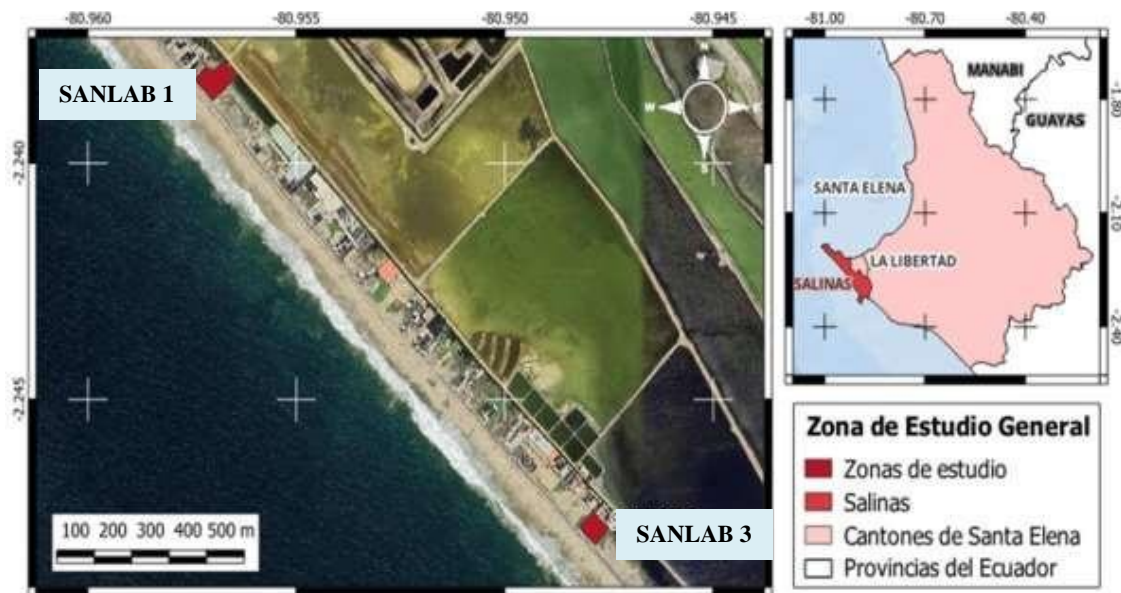
## 8. MARCO METODOLÓGICO

### 8.1 Área de estudio

El presente estudio se realizó dentro de las instalaciones del laboratorio SANLAB S.A, módulo 1 - 3. Se encuentra ubicado en Mar Bravo, entre 2°14'17" S y 80°57'27" W, Salinas, Provincia de Santa Elena (Figura 4).

**Figura 4**

*Ubicación satelital del laboratorio SANLAB S.A*



*Nota.* Extraído de QGIS - (Google Earth, 2024)

### 8.2 Enfoque y tipo de investigación

El diseño metodológico en este estudio se fundamenta en la perspectiva cuantitativa con un enfoque experimental y descriptivo, por lo que implica la realización de pruebas *in vitro*. Además, se registraron los niveles de dosificación de dos ácidos orgánicos comerciales mediante tratamientos experimentales: TR1: Ácido Orgánico 1 (AO-1), TR2: Ácido Orgánico 2 (AO-2) y los grupos controles (C-1; C-2) (variable independiente), con el propósito de evaluar su influencia en la disminución de la carga



bacteriana medida en UFC/mL en el medio de cultivo del camarón blanco *L. vannamei*, (variable dependiente).

## **8.3 FASE DE CAMPO**

### **8.3.1 Características y alineamientos experimentales**

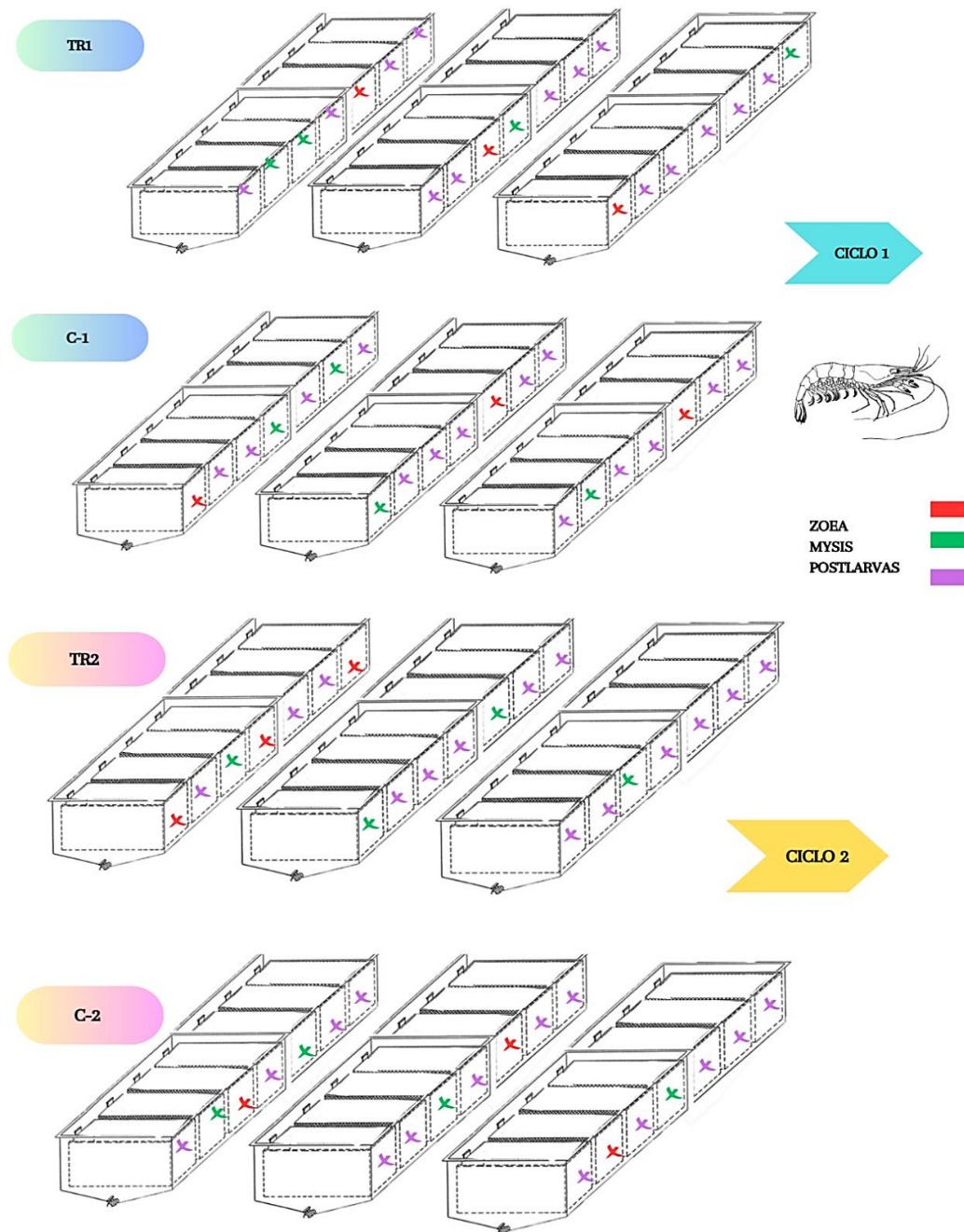
Durante los dos ciclos de cultivo observados, se documentaron 42 tanques de concreto rectangular con profundidades de 3 m, y una capacidad operativa máxima de 20 toneladas métricas (TM). Se realizaron recolecciones de muestras biológicas de *L. vannamei* provenientes de los tanques de forma aleatoria-estratificado seleccionando de 3 a 6 muestras biológicas por estadio, con frecuencia diaria, cada dos días o semanalmente, para facilitar el análisis bacteriológico de las muestras: 3 muestras de Zoea III, 2 muestras de Mysis II-III, 4 muestras de Postlarvas III, 4 de Postlarvas VI y 6 de Postlarvas XII (Figura 5). Estas muestras fueron evaluadas mediante observación macro y microscópica, utilizando un microscopio OMAX con la configuración de objetivos ajustada entre 4x - 10x. Este enfoque permitió obtener datos sobre el nivel de desarrollo, actividad o detectar posibles anomalías físicas de las muestras analizadas.

### **8.3.2 Diseño experimental**

Se implementó un diseño experimental utilizando un muestreo estratificado, en el cual se asignaron un total de 42 tanques por ciclo, los cuales se distribuyeron equitativamente con un registro total de 21 estanques por alineamiento experimental. Los tratamientos experimentales incluyeron dos grupos que recibieron ácidos orgánicos (TR1 - TR2), y grupos controles (C-1 - C-2), que no recibió dicho tratamiento. Los tratamientos con ácidos orgánicos comprendieron dos formulaciones específicas (Figura 5 - Tabla 3).

## Figura 5

Ilustración del diseño experimental.



*Nota.* La ilustración muestra el diseño experimental empleado en dos ciclos de cultivo de *L. vannamei*. Cada ciclo utilizó 42 tanques, distribuidos en 21 tanques para cada tratamiento: TR1 y TR2 (con ácidos orgánicos) y C-1 y C-2 (controles). Se utilizó un enfoque aleatorio-estratificado de acuerdo con los estadios larvales Zoea III (rojo), Mysis I-III (verde) y Postlarvas III-VI-XII (morado).

A continuación, se describe cada tratamiento:

**Tabla 3**

*Tratamientos experimentales (Composición)*

	<b>Tratamiento</b>	<b>Composición</b>
<i>Dieta, +AO-1; AO-2</i>	<b>AO-1: Ácido Orgánico A</b> (T1)	Ácido orgánico comercial -TR1: Ácido fórmico 20%, ácido acético 15%, ácido cítrico 5%, Lactato de calcio 10%, acetato de sodio 8%
	<b>AO-2: Ácido Orgánico B</b> (T2)	Ácido orgánico comercial– TR2: Ácido fórmico 30 %, ácido acético 10%, ácido propiónico 20%, y ácido láctico 6,50%.
	<b>Sin AO</b>	<b>GRUPOS CONTROL (C1 – C2)</b> —

*Nota.* Se aplicó los ácidos orgánicos desde el estadio de Zoea hasta PL-12

### 8.3.3 Dosificación de los ácidos orgánicos

La dosificación empleada en este estudio se ajustó a las cantidades utilizadas siguiendo los protocolos técnicos de la empresa. Esta dosificación se adaptó de acuerdo con la etapa de desarrollo de las larvas y se suplementó en la dieta convencional, según lo especificado en la Tabla 4.

**Tabla 4***Dosificación de ácidos orgánicos según los tratamientos experimentales.*

<i>Ciclo de cultivo</i>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosificación (ppm/ton)</b>		
		<b>Zoea (I, II. II)</b>	<b>Mysis (I, II. II)</b>	<b>Postlarvas (PL1 – PL12)</b>
1	<b>C-1</b>	-	-	-
	<b>TR1</b>	<b>1 – 2 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	4 a 5ppm/t (Casos extremos 7 ppm/ton)
2	<b>C-2</b>	-	-	-
	<b>TR2</b>	<b>1 – 2 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	4 a 5ppm/t (Casos extremos 7 ppm/ton)

*Nota.* Información registrada por la empresa.

## 8.4 FASE DE LABORATORIO

### 8.4.1 Muestras para análisis

Se obtuvo muestras de los estadios larvarios (Zoea, Mysis y postlarvas) de los tanques seleccionados aleatoriamente. Las muestras previamente recolectadas se transfirieron a análisis en el Laboratorio de Microbiología.

## **8.4.2 Medios de cultivo usados**

### **8.4.2.1 Agar TCBS (Tiosulfato Citrato de Sales Biliares)**

Se siguieron las pautas establecidas por Maldonado (2012) como guía para la preparación de este medio: Se pesaron 8.9 gramos de TCBS en un matraz Erlenmeyer añadiendo 750 mL de agua destilada, ajustando la concentración de NaCl al 0.5% (p/v). La mezcla se colocó en un agitador eléctrico CERAN SCHOTT y se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición. El medio se mantuvo hirviendo durante 1 a 2 minutos para asegurar una completa homogeneización, evitando la formación de grumos. Luego, se distribuyeron 10 mL de este medio en cada placa Petri estéril dentro de una cámara de flujo laminar para prevenirla contaminación.

### **8.4.2.2 Agar Chromagar Vibrio**

Se siguieron las indicaciones establecidas por Quintuña (2023) como guía en la preparación de este medio: Se adicionaron 14.94 gramos de agar Chromagar en un matraz Erlenmeyer utilizando agua destilada previamente esterilizada a 750 mL. La mezcla se homogeneizó hasta que el agar alcanzó una consistencia espesa con la ayuda de un agitador eléctrico CERAN SCHOTT y se calentó hasta alcanzar su punto de ebullición a 63°C, manteniendo una agitación constante durante este proceso. Una vez alcanzada la temperatura deseada, la mezcla se enfrió antes de solidificar y posteriormente se distribuyó en placas Petri estériles.

#### **8.4.2.3 Agar TSA (Agar Tripticasa de Soya)**

Recomendado para el aislamiento y purificación de colonias bacterianas, las directrices propuestas por Huacasi et al., (2021) fueron utilizadas como referencia para la preparación de este medio. Para su elaboración, se disolvieron 40 gramos de medio en un matraz Erlenmeyer utilizando agua destilada previamente esterilizada a 750 mL, aumentando la concentración de NaCl y agar al 2%. La mezcla se calentó hasta alcanzar el punto de ebullición utilizando un agitador eléctrico (modelo CERAN SCHOTT), y se mantuvo hirviendo durante 1 a 2 minutos. Posteriormente, se sometió a esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión para garantizar la completa esterilización sin agregados.

#### **8.5 Siembra de muestras**

El proceso de recolección de muestras de *Vibrio spp* se basó en la técnica utilizada por Asanza et al., (2024), que consistió en la extracción de al menos 0.5 mL de muestra y su posterior siembra mediante diluciones seriadas en una relación de 1/1000. Para la siembra, se aplicó la técnica de aislamiento por banco de 3 diluciones sucesivas: 1/10, 1/100, y 1/1000. Inicialmente, se obtuvo una muestra de 1000 µL, de la cual se realizaron diluciones sucesivas utilizando 900 µL de solución salina estéril al 2%, agitando con un Vortex para reducir la carga bacteriana.

## 8.6 Aislamiento secuencial mediante medios selectivos y purificación

Se aplicó la metodología de Glackin et al., (2024) para el aislamiento secuencial de *Vibrio* spp. El proceso comenzó con la siembra directa en placas de agar TCBS y Chromoagar *Vibrio*, utilizando un asa de vidrio Drygalski y la técnica de siembra por extensión para obtener colonias aisladas y evitar falsos positivos. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas, y posteriormente se examinaron las colonias desarrolladas en los medios selectivos. Las colonias sospechosas fueron seleccionadas y subcultivadas en nuevas placas de TCBS y Chromoagar *Vibrio* para confirmar su morfología y características diferenciales. Una vez verificadas las colonias, estas se cultivaron en placas de agar TSA para obtener cultivos puros, los cuales fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

## 8.7 Identificación, conteo de colonias y Aislamiento de cultivo

Utilizando la técnica descrita por Glackin et al. (2024), se analizaron las características de las colonias bacterianas mediante la coloración en Agar TCBS y CHROMagar™ *Vibrio*. Esta metodología permite la identificación de bacterias del género *Vibrio* spp en función de su capacidad para fermentar sacarosa (positivo) o no fermentar, o hacerlo lentamente (Tabla 5). Las colonias de *Vibrio* se contaron en las placas, manteniéndose un número adecuado de colonias y el cálculo de la concentración bacteriana se realizó multiplicando el número de colonias contadas por el factor de dilución y dividiendo por el volumen de la muestra inoculada expresados en (UFC/mL).

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

La interpretación de los niveles de concentración se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Acosta (2020), clasificando los resultados de las cargas bacterianas en niveles normales, elevados y severos (Tabla 6).

**Tabla 5**

*Identificación de especies de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) basada en la coloración en los medios TCBS y CHROMagar™ Vibrio.*

Color de la UFC	Color CHROM UFC	Vibrio– Identificación preliminar
Verde	Azul	<i>V. vulnificus</i>
Verde	Malva-violeta	<i>V. parahaemolyticus</i>
Amarillo	Azul	<i>V. cholerae</i>
Amarillo	crema	<i>V. alginolyticus/ Otros Vibrios spp</i>

*Nota.* Tabla muestra los resultados preliminares de las lecturas de las placas de acuerdo con la coloración, por Glackin et al., (2024).

**Tabla 6**

*Grados de severidad de UFC/mL en larvas y postlarvas de camarón.*

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Colonias</i>	UFC/mL		
		Normal	Elevado	Severo
TCBS	Tipo 1 (amarillas)	$\leq 10^2$	$>10^3$	$>10^5$
	Tipo 2 (verdes)	$\leq 10^2$	$>10^3$	$>10^5$

*Nota.* Tabla clasifica colonias bacterianas en medio de cultivo TCBS en UFC/g de acuerdo con la coloración (amarillas y verdes). Extraído de Acosta, 2022.



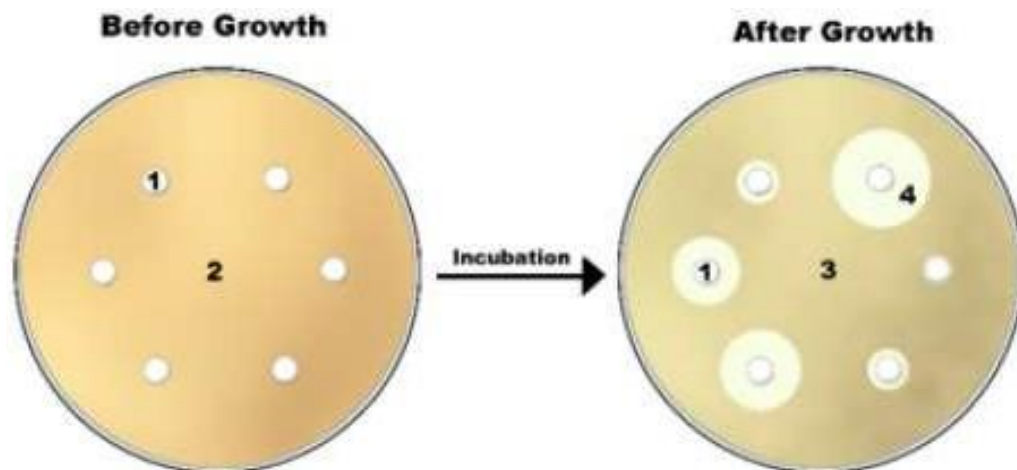
## 8.8 Antibiograma

### 8.8.1 Método de dilución en Agar

Para evaluar la sensibilidad bacteriana, se aplicó la técnica de Kirby-Bauer utilizando discos de dilución en agar, conforme al método descrito en un estudio realizado por Silva et al., (2021). Este enfoque se usó en las dos combinaciones de ácidos orgánicos comerciales bajo análisis. Los resultados fueron verificados mediante la medición en el software ImageJ, expresados en mm y la sensibilidad se determinó calculando el promedio del diámetro de los halos de inhibición (CMI) observados en cepas aisladas del género *Vibrio spp* (Figura 6).

**Figura 6**

*Método de dilución en agar.*



*Nota.* Ilustración sobre los discos de dilución en agar contenidas con AO's para la previo análisis de lectura del antibiograma. (APEC, 2020, pág. 6)

## **8.9 Variable productiva**

### ***8.9.1 Tasa de supervivencia***

Se empleó el método descrito por Saldarriaga y Briones (2005), como se citó en el trabajo de Soriano en 2017, para calcular la supervivencia de las postlarvas en los grupos de tratamiento.

$$S = \frac{\text{Población del muestreo}}{\text{Población inicial}} \times 100$$

Dónde: S = supervivencia (%)

## **8.10 Registros secundarios (parámetros fisicoquímicos)**

Se realizaron mediciones de diversos parámetros ambientales en los tanques de cultivo siguiendo directrices específicas de la empresa: La salinidad se evaluó cuatro veces al día utilizando un refractómetro digital, y la temperatura se registró tres veces al día con un oxígenómetro, al igual que la concentración de oxígeno disuelto. Estas mediciones periódicas permitieron un seguimiento detallado de las condiciones ambientales en los tanques de cultivo.

## 8.11 Condiciones de ensayo

Se constató el registro de muestras biológicas aleatorias, con 3 a 6 réplicas por estadios larvarios (Zoea, Mysis y PL), manteniendo condiciones controladas (Tabla 7).

**Tabla 7**

*Registro de inicio y manejo de larvicultura en dos ciclos de cultivo.*

Parámetro	Ciclo 1	Ciclo 2
Fecha de siembra	17/1/2024	20/2/2024
Densidad de siembra (larvas/L)	50 larvas – 100larvas/L	50larvas/L – 100Larvas/L
Temperatura de siembra	31 °C	31 °C
Rango de temperatura	32.50 - 34 °C	32.50 - 34 °C
Oxígeno disuelto	4 a 7	4 a 7
Rango de pH	7.8 - 8.5	7.8 - 8.5
Salinidad	20 -25	20 - 25 ppt
Uso de alimento líquido + micro <i>Spirulina</i> (Zoea I-II-III)	Sí	Sí
Uso de alimento balanceado + micro <i>Spirulina</i> (Mysis y PL)	Sí	Sí
Uso de sustituto de <i>Artemia salina</i> (huevos) (PL4)	Sí	Sí
Uso de alimento natural	Sí	Sí
Uso de ácidos orgánicos	Ácido orgánico comercial - TR1: Ácido fórmico 20%, ácido acético 30%, ácido propiónico 15%, ácido cítrico 5%, Lactato de calcio 10,00%, ácido láctico 8%.	Ácido orgánico comercial – TR2: Ácido fórmico 20%, ácido acético 30 %, ácido propiónico 20%, y ácido láctico 6,50%.
Uso de vitamina C	Sí	Sí
Período de cosecha	2 - 4 de febrero	8 - 16 de febrero

*Nota.* Información registrada por la empresa.

### **8.11 Análisis estadístico**

Los datos fueron estandarizados utilizando hojas de cálculo de Excel y software avanzado como JASP-Rkward versión 18.3 y MINITAB 19.0. Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para verificar los supuestos de normalidad. Se utilizó la prueba T para muestras independientes no paramétricas a través del test de Mann-Whitney, con un nivel de significancia establecido en  $p > 0.05$  para los tratamientos experimentales y sus controles.

Para examinar la tendencia en la tasa de supervivencia, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Para identificar diferencias específicas entre los grupos, se realizaron comparaciones post-hoc con el test de Dunn, utilizando correcciones de Bonferroni y Holm para controlar el error tipo I. Se utilizó el ANOVA de Welch para evaluar las diferencias significativas entre los grupos, debido a su capacidad para manejar varianzas heterogéneas.

Además, se llevó a cabo un análisis descriptivo y se compararon las medias entre los diferentes tratamientos en los ciclos de producción. Para evaluar la homogeneidad de varianzas, se aplicaron la prueba de Levene y el test de Brown-Forsythe.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Análisis de los tratamientos durante cada ciclo

De acuerdo con los resultados de cada ciclo de cultivo, se comparó la carga bacteriana total(UFC/mL) en cada tratamiento, evidenciando diferencias significativas en las cargas bacterianas de los tanques durante las fases larvarias. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**Tabla 8**

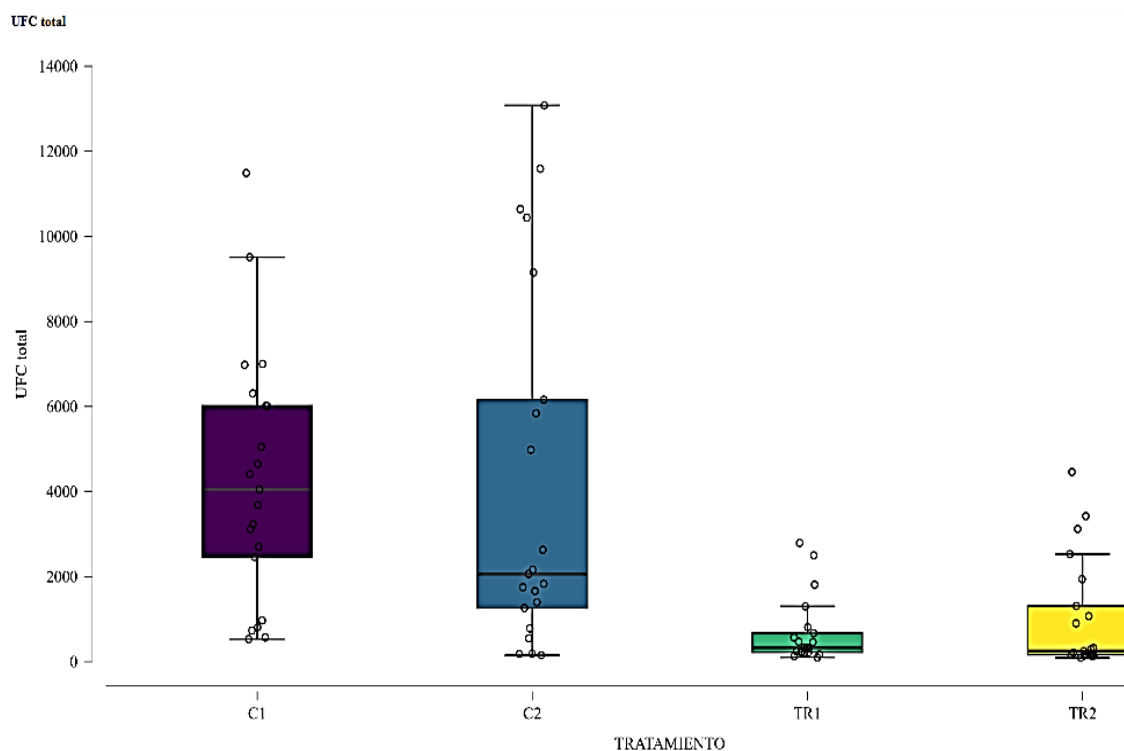
*Análisis descriptivo de las medias de crecimiento de Vibrio por tratamiento*

UFC - Vibrios totales		
TRATAMIENTOS	Mediana	Media $\pm$ DS
C-1	$4.05 \times 10^3$	$(4.30 \times 10^3 \pm 2.98)$
TR 1	$3.30 \times 10^2$	$(6.72 \times 10^2 \pm 7.77)$
C-2	$2.06 \times 10^3$	$(4.21 \times 10^3 \pm 4.27)$
TR 2	$2.50 \times 10^2$	$(1.01 \times 10^3 \pm 1.31)$

*Nota:* (C-1: control 1; TR1: Tratamiento 1; C-2: Control 2; TR2: Tratamiento 2) - Valores expresados como media  $\pm$ Desviación estándar DS.

## Figura 7

Tendencias de *Vibrios* en los diferentes tratamientos y grupo control en el cultivo de *L.vannamei*.



Nota. Diagrama de caja que muestra las tendencias de *Vibrios spp* en los diferentes tratamientos (TR1, TR2) y grupos control (C-1, C-2) en los ciclos de cultivos de *L. vannamei* - JASP-Rkward

En la Figura 7 se ilustran las diversas concentraciones de UFC/mL, mostrando resultados generales con variaciones notables, en ambos tratamientos con ácidos orgánicos demuestran una reducción considerable en las cargas bacterianas en comparación con los controles. No obstante, el Tratamiento 1, con un promedio total de  $(6,72 \times 10^2)$ , presenta una menor dispersión y menos valores atípicos en comparación con el Tratamiento 2, cuyo promedio es de  $(4,21 \times 10^3)$ , lo que sugiere una mayor consistencia en su eficacia (ver Tabla 8).

La carga inicial de las muestras indica que las condiciones en los tanques eran propicias para la proliferación de *Vibrio spp.*, especialmente debido a un pH que osciló entre 7.8 a 8.5 y a la presencia de materia orgánica característica de estos entornos (Rodríguez et al., 2022). En todos los casos, se analizaron los supuestos estadísticos y se observó que los datos no seguían una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk ( $X \neq N(\mu, \sigma^2)$ ). Además, se detectó heterogeneidad de varianzas entre los tratamientos porque el valor p fue extremadamente bajo:  $8,46 \times 10^{-7}$  ( $0,0000846 < 0,05$ ) en el primer caso y  $3,75 \times 10^{-6}$  ( $0,00000375 < 0,05$ ) en el segundo caso (Tabla 9 - 10).

**Tabla 9**

*Análisis del contraste de Igualdad de Varianzas (Levene) – TR1 vs C-1*

<b>Contraste de Igualdad de Varianzas (de Levene)</b>			
<b>F</b>	<b>df<sub>1</sub></b>	<b>df<sub>2</sub></b>	<b>p</b>
<b>19.14</b>	1.00	40	8.46E <sup>-5</sup>

*Nota.* Contraste de igualdad de Varianzas – Levene F (1,40) =19.14, p<.001,. F: estadístico de Levene, df1: grados de Libertad numerador, df2: grados de libertad asociado al denominador, p: probabilidad.

**Tabla 10**

*Análisis del contraste de Igualdad de Varianzas (Levene) – TR2 vs C-2*

<b>Contraste de Igualdad de Varianzas (de Levene)</b>				
	<b>F</b>	<b>df<sub>1</sub></b>	<b>df<sub>2</sub></b>	<b>p</b>
<b>UFC TOTAL</b>	28.72	1	40	3.75E <sup>-6</sup>

*Nota.* Contraste de igualdad de Varianzas – Levene F (1,40) =28,72 p<.001,. F: estadístico de Levene, df1: grados de Libertad numerador, df2: grados de libertad asociado al denominador, p: probabilidad.

En el análisis comparativo de la cantidad total de *Vibrios* en los dos ciclos de cultivo, se utilizó la prueba de Mann-Whitney U para muestras independientes, con el fin de identificar diferencias entre el grupo de control y los tratamientos. Este enfoque permitió evaluar la eficacia de los ácidos orgánicos en cada ciclo de acuerdo con los tratamientos. En el ciclo 1, el análisis comparativo entre los grupos C-1 y TR1 reveló una diferencia estadísticamente significativa. La hipótesis alternativa sugiere que el grupo C-1 tiene un mayor número de UFC en comparación con el grupo TR1, indicando que el tratamiento TR1 es efectivo en reducir las cargas bacterianas en relación con el control C-1 (Figura 8).

Este resultado se respalda por valores de p extremadamente bajos ( $8.72E^{-7} = 0.000000872 < 0.05$ ), lo que indica que las diferencias observadas son robustas y no se deben al azar. Además, la alta relación p máxima de Vovk-Selke apoya la fiabilidad de los hallazgos, sugiriendo una alta probabilidad a favor de la hipótesis alternativa (Tabla 11).

**Tabla 11**

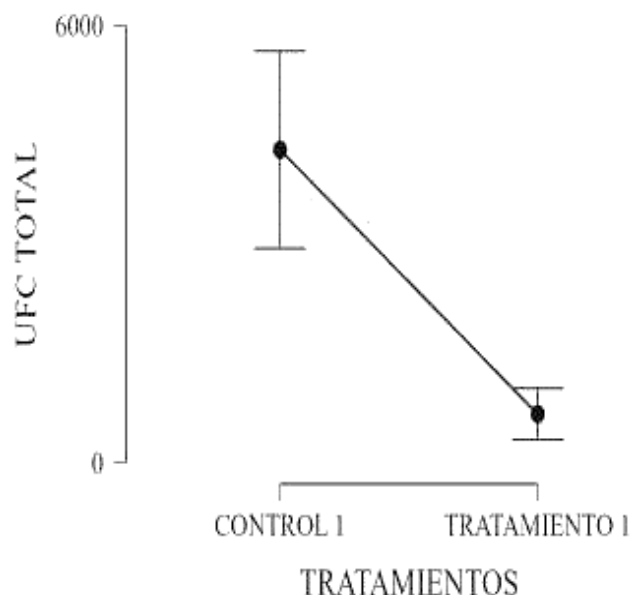
*Test U- Mann-Whitney para muestras independientes con respecto a los Vibrios totales en (C-1 vs TR1)*

	<b>W</b>	<b>P</b>	<b>VS-MPR*</b>
<b>Vibrios totales /Tratamientos</b>	411.00	$8.72E^{-7}$	30252.48



**Figura 8**

Representación gráfica de las cargas bacterianas durante las fases larvarias del camarón, con una comparación entre los grupos tratados C1 y TR1.



Nota. Diagrama de las tendencias de *Vibrios spp* en el primer ciclo de cultivo (C-1 vs TR1) – JASP-Rkward.

**Tabla 12**

Test U- Mann-Whitney para muestras independientes con respecto a los *Vibrios* totales en (TR2 vs C-2)

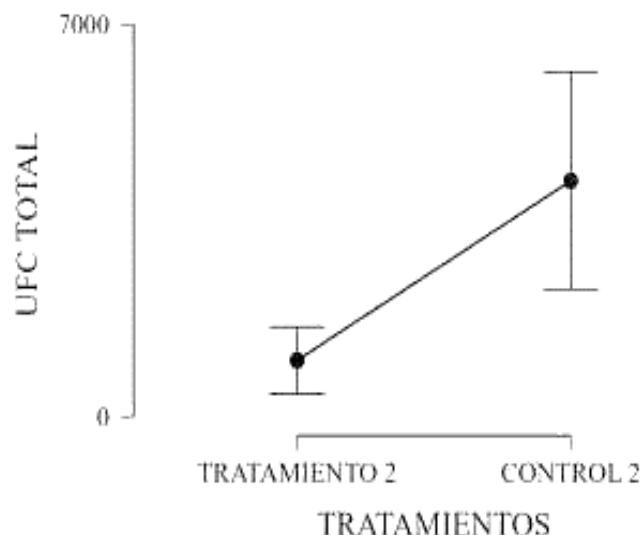
**Contraste T para Muestras Independientes**

	W	p	VS-MPR*
<b>UFC TOTAL</b>	96.50	<b>9.42E<sup>-4</sup></b>	56.04

Nota. Para todos los contrastes, la hipótesis alternativa indica que el grupo *TRATAMIENTO 2* es menor que el grupo *CONTROL 2*. \* Relación p Máxima de Vovk-Sellke: Basado en el valor p bilateral, la máxima probabilidad posible favorable a H<sub>1</sub> sobre H<sub>0</sub> igual a 1/(-e p log(p )) para p ≤ .37 (Sellke, Bayarri y Berger, 2001).

### Figura 9

Cargas bacterianas totales durante las fases larvarias del camarón, con una comparación entre los grupos tratados (TR2) y el grupo de control (C2).



Nota. Diagrama de las tendencias de *Vibrios spp* en el segundo ciclo de cultivo (C-2 vs TR2) – JASP-Rkward.

En el ciclo 2, los tratamientos TR2 y C-2 mostraron diferencias significativas en las cargas bacterianas de *Vibrios spp.*, con un valor de p bilateral de  $9.42E^{-4}$ . Este resultado indica una alta significancia estadística, lo que sugiere que la diferencia observada es extremadamente improbable que sea producto del azar. Dado que este valor es menor que el nivel de significancia establecido ( $0.000942 < 0.05$ ), se rechaza la hipótesis nula, que postula la inexistencia de diferencias entre los grupos. Por lo tanto, existe suficiente evidencia para afirmar que el grupo TR2 presenta una carga bacteriana de *Vibrio spp* significativamente menor en comparación con el grupo C-2, indicando que el tratamiento TR2 es considerablemente más efectivo en inhibir las altas concentraciones de cargas bacterianas que el control C-2 (Figura 9).

La relación p máxima de Vovk-Selke, que asciende a 56.04, refuerza aún más esta conclusión. Esta relación indica que la máxima probabilidad de obtener un valor de p tan extremo o más extremo, asumiendo la veracidad de la hipótesis nula, es del 56.04%, lo que refuerza la evidencia en contra de la hipótesis nula (Tabla 12). Adicionalmente, en el análisis comparativo de la cantidad total de *Vibrios spp.* en los distintos estadios larvarios, la prueba de Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre los grupos C-1 vs TR1; C-2 vs TR2. Los valores de p fueron extremadamente bajos confirmando que los tratamientos TR1 - TR2 son significativamente más efectivos en reducir las UFC totales de *Vibrio spp.* en comparación con los controles.

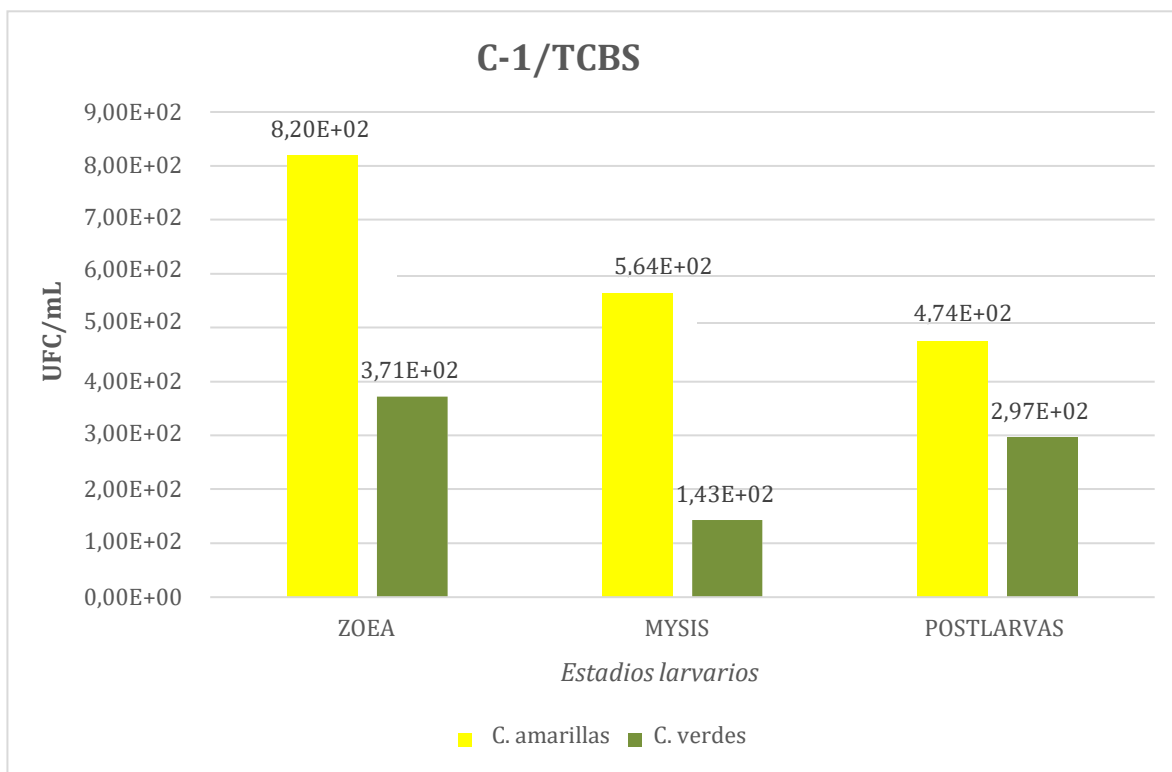
## **9.2. Análisis bacteriológico**

Para la recolección de datos se utilizó la herramienta digital Excel, donde las muestras fueron tabuladas por módulo y posteriormente por cada estadio, obteniendo un total de 84 muestras en dos ciclos de cultivo. Las muestras fueron sembradas previamente en agar TCBS y CHROMOagar Vibrio™, permitiendo una adecuada diferenciación y cuantificación de las especies de *Vibrio spp.*

### 9.2.1. Análisis bacteriológico en el grupo control (C-1) en el ciclo 1

**Figura 10**

*Análisis bacteriológico durante etapa de Zoea, Mysis y Postlarvas en el grupo Control (C-1)*



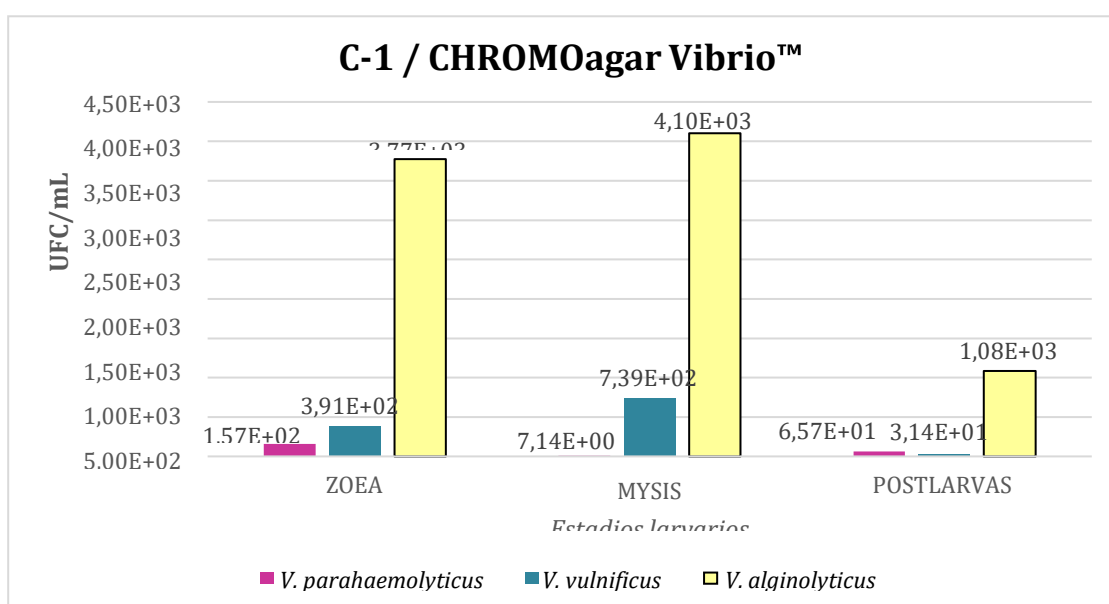
*Nota.* Representación gráfica evidencia los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en AGAR TCBS (colonias amarillas y verdes) de estadios temprano *L. vannamei* en el grupo control (C-1)

Se observa que en el grupo C-1 del ciclo 1, el estadio de Zoea y Mysis mostró una mayor cantidad de colonias en comparación con los demás estadios. Es importante destacar que en este grupo no se aplicó ácido orgánico. Al analizar la coloración de las colonias amarillas, es posible que estas correspondan a especies como *V. cholerae* o *V. alginolyticus*, con valores promedio de Zoea (8,20E+02), Mysis (5,64E+02) y Postlarvas (4,74E+02).

Por otro lado, las colonias verdes podrían indicar la presencia de *V. vulnificus* o *V. parahaemolyticus*, con valores de Zoea ( $3,71E+02$ ), Mysis ( $1,43E+02$ ) y Postlarvas ( $4,74E+02$ ). A pesar de la presencia de colonias amarillas y verdes, se mantuvieron dentro de rangos normales de carga bacteriana ( $<10^3$ ) (Figura 10).

### Figura 11

Análisis bacteriológico durante etapa de Zoea, Mysis y Postlarvas en el grupo Control (C-1).



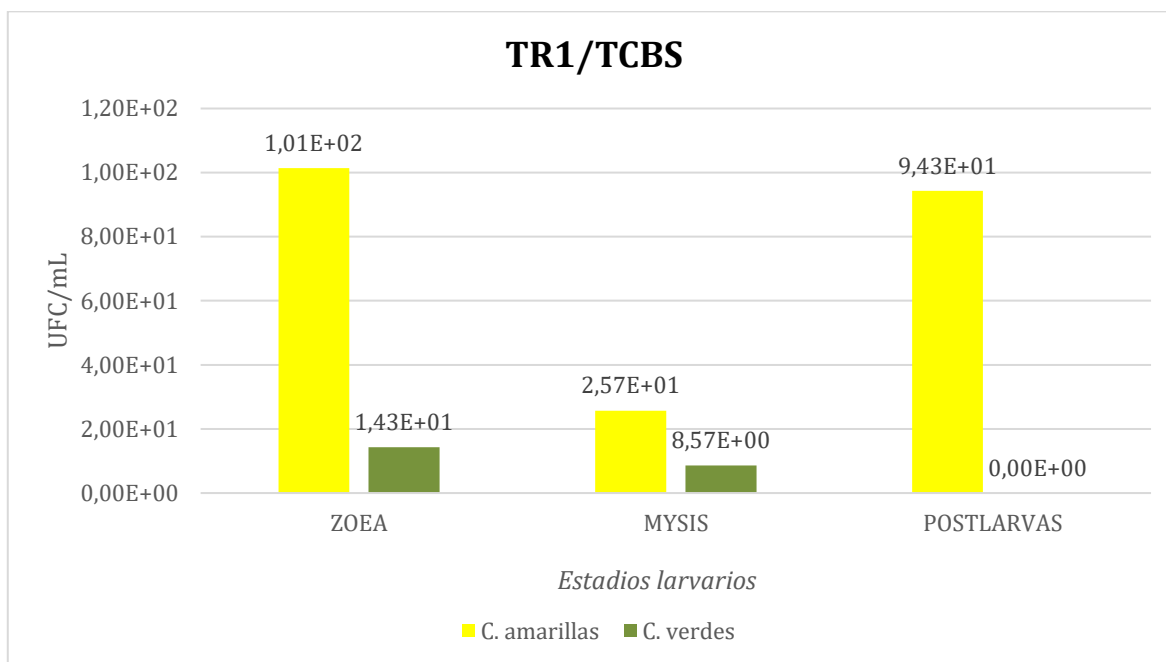
Nota. Representación gráfica muestra los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en Chromoagar Vibrio™ de estadios temprano *L. vannamei* en el grupo control (C-1).

Mediante la comparación de los resultados del Chromoagar Vibrio™ se confirmó la presencia de colonias específicas tales como; *V. alginolyticus*, con valores más altos en los estadios de Zoea ( $3,77E+03$ ) y Mysis ( $4,10E+03$ ). Además, se observaron colonias azul turquesa, presumiblemente de *V. vulnificus*, con presencia notable en Zoea ( $3,91E+02$ ) y Mysis ( $7,39E+02$ ), y colonias malva-violeta, identificadas como *V. parahaemolyticus*, con cargas muy irrelevantes (Figura 11).

## 9.2.2 Análisis bacteriológico en el tratamiento 1 (TR1) en el ciclo 1

**Figura 12**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR1 en el ciclo 1.*

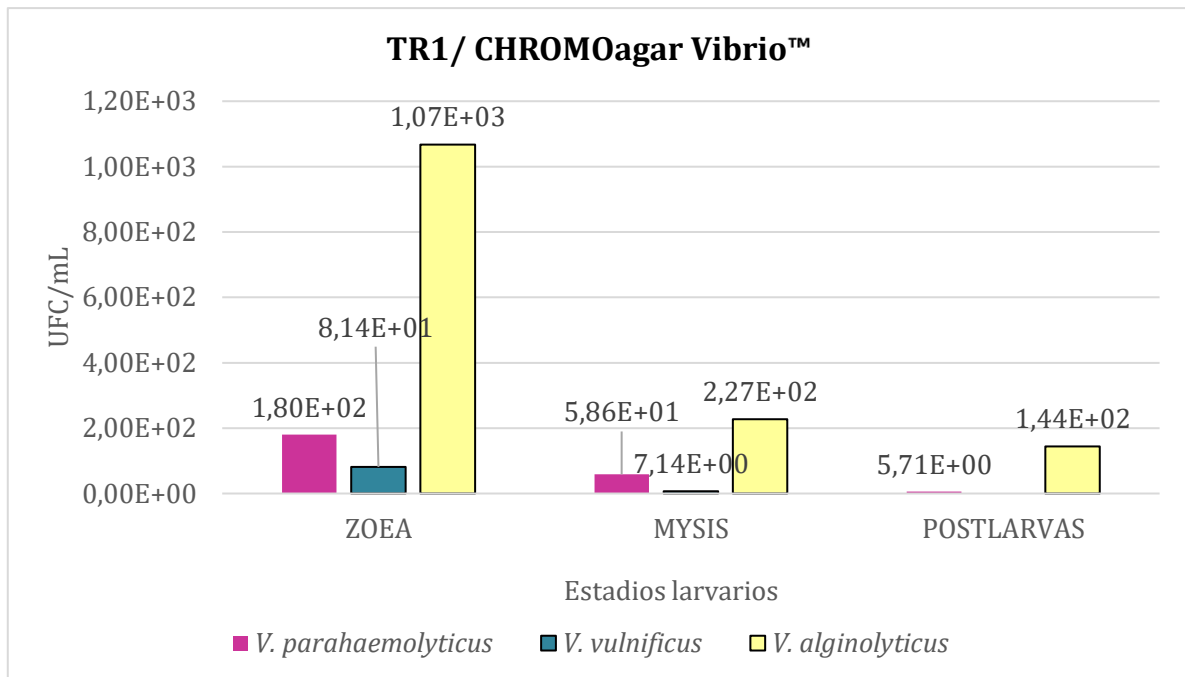


*Nota.* Representación gráfica de los valores promedios UFC/mL en muestras biológicas sembrados en TCBS (colonias amarillas y verdes) de estadios tempranos de *L. vannamei* en el tratamiento 1 (TR1).

En el caso del Tratamiento 1 (TR1) del ciclo 1, se analizaron muestras y se observó una notable presencia de colonias amarillas en los estadios de Mysis y Postlarvas, aunque con cargas bacterianas dentro de los rangos normales. Estas colonias amarillas probablemente correspondan a *V. cholerae* o *V. alginolyticus*, con valores promedio de Zoea ( $1,21E+02$ ), Mysis ( $2,57E+02$ ) y Postlarvas ( $9,43E+02$ ). Por otro lado, las colonias verdes, indicativas de la presencia de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, mostraron valores considerablemente bajos y no se detectaron en el estadio de Postlarvas (Figura 12).

**Figura 13**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR1 en el ciclo 1.*



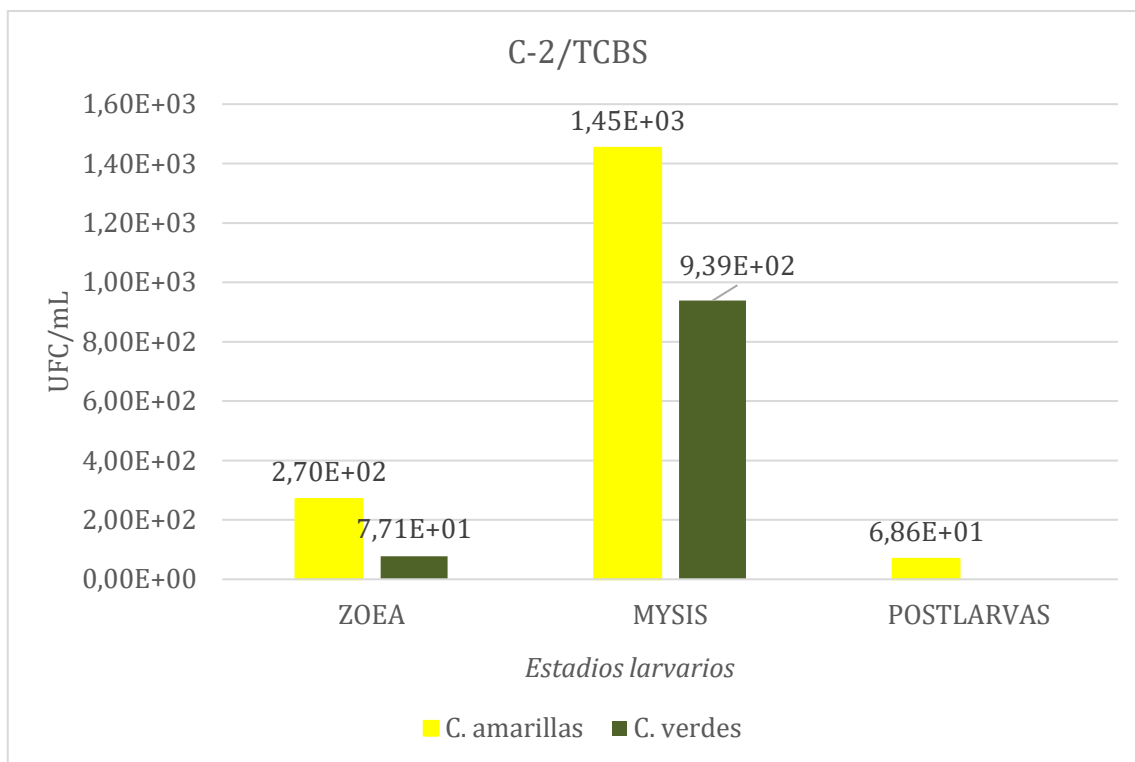
*Nota.* Representación gráfica exhibe los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en Chromoagar Vibrio™ de estadios tempranos de *L. vannamei* en el tratamiento 1 (TR1).

Al comparar los resultados en el Chromoagar Vibrio™, se distinguieron las colonias cremas de *V. alginolyticus*, con los valores más altos en Zoea (1,07E+03) y normales en Mysis y Postlarvas. Asimismo, se observaron colonias azul turquesa de *V. vulnificus*, con presencia en Zoea con resultados muy bajos en Mysis, y sin presencia en Postlarvas. Las colonias malva-violeta, identificadas como *V. parahaemolyticus*, mostraron cargas inferiores a  $<10^2$  indicando que el tratamiento fue efectivo en la reducción de las cargas bacterianas (Figura 13).

### 9.2.3 Análisis bacteriológico en el grupo control (C-2) en el ciclo 2

**Figura 14**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en C-2 en el ciclo 2.*



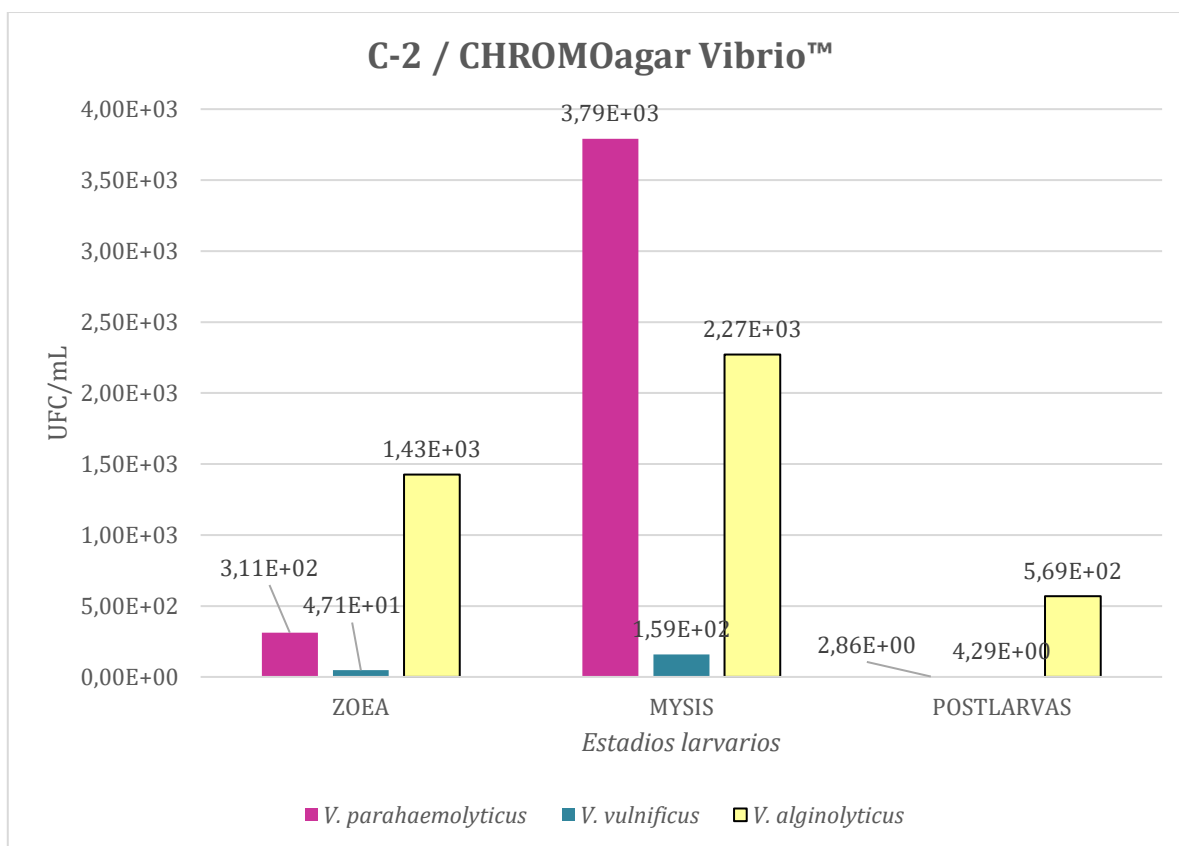
*Nota.* Representación gráfica evidencia los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en AGAR TCBS (colonias amarillas y verdes) de estadios temprano *L. vannamei* en grupo control (C-2).

En el ciclo 2, el grupo C-2 sin la adición de ácidos orgánicos mostró altas cargas bacterianas, particularmente en el estadio de Mysis, que fue el más afectado con valores superiores a  $>10^3$ . Las colonias amarillas, identificadas como *V. alginolyticus* se obtuvieron valores elevados de  $1,45E+03$ , mientras que las colonias verdes, fueron menores (Figura 14).



**Figura 15**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en C-2 en el ciclo 2.*



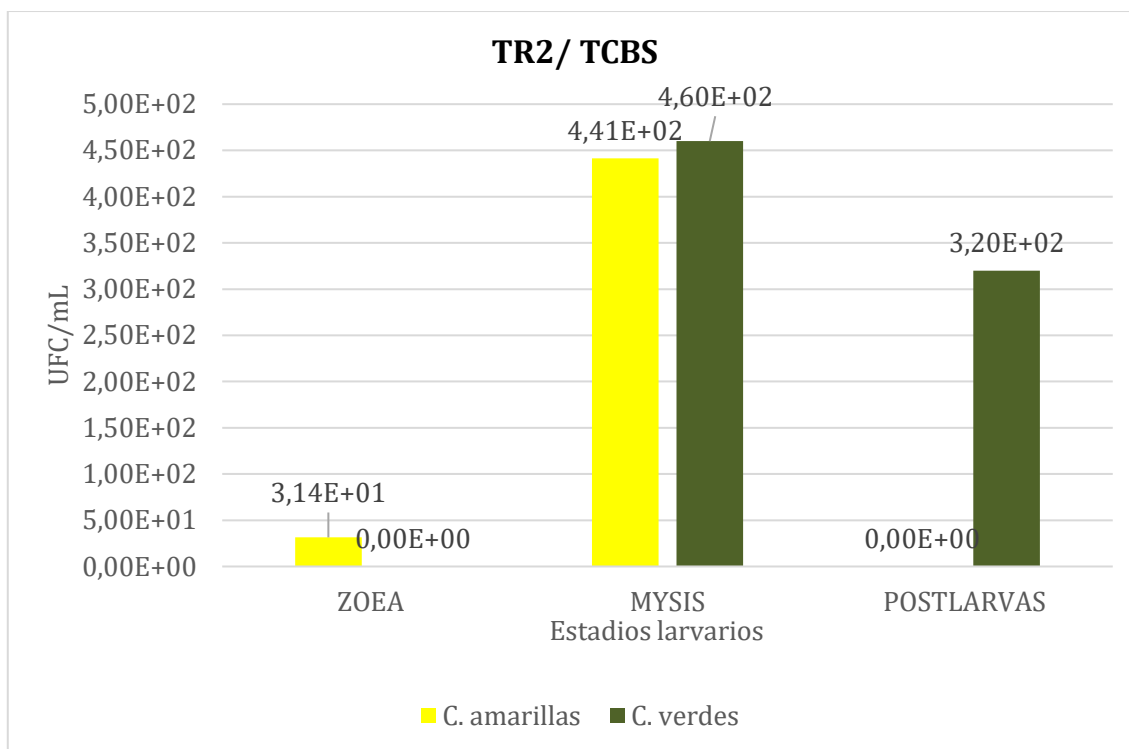
*Nota.* Representación gráfica muestra los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en Chromoagar Vibrio™ de estadios temprano *L. vannamei* en el grupo control (C-2).

El análisis microbiológico en CHROMOagar Vibrio™ confirmó la presencia de *V. parahaemolyticus*, lo que indica que este serotipo afectó significativamente el estadio de Mysis, con un valor promedio de 3,79E+03 y, por otro lado, se detectaron niveles elevados de *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*, con valores moderados de 1,59E+02 (Figura 15).

## 9.2.4 Análisis bacteriológico en (TR2) en el ciclo 2

**Figura 16**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR2 en el ciclo 2.*

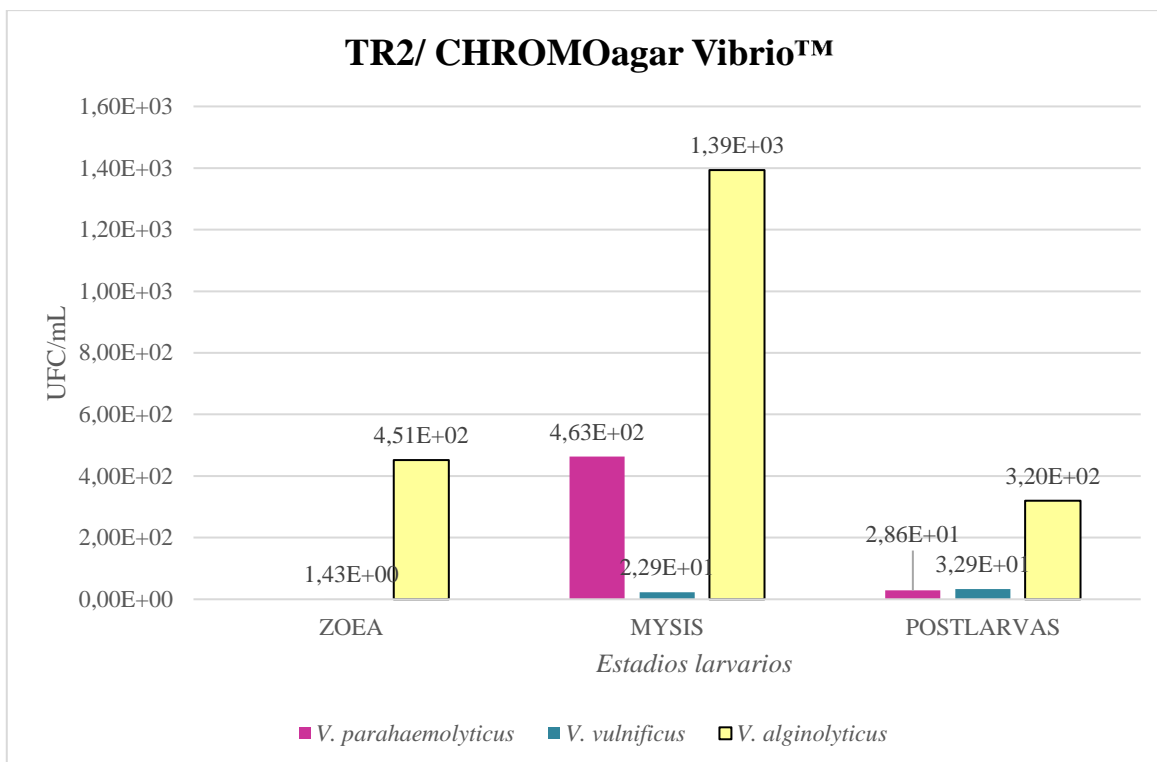


*Nota.* Representación gráfica evidencia los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en AGAR TCBS (colonias amarillas y verdes) de estadios temprano *L. vannamei* en tratamiento 2 (TR2).

En el Tratamiento 2 (TR2), se evidenció menores colonias amarillas correspondientes a *V. alginolyticus* mostrando una disminución considerable de 3,14E+01. Además, las colonias verdes identificadas como *V. parahaemolyticus* presentaron en el estadio de Mysis una reducción notable hasta 4,60E+02, mientras que *V. alginolyticus* se mantuvo en niveles estables. Finalmente, en el estadio de Postlarvas se obtuvieron rangos normales para *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus*, con una concentración de 3,20E+02 (Figura 16).

**Figura 17**

*Análisis bacteriológico en etapas de Zoea, Mysis y Postlarvas en TR2 en el ciclo 2.*



*Nota.* Representación gráfica muestra los valores promedios UFC/mL de muestras biológicas sembrados en Chromoagar Vibrio™ de estadios temprano *L. vannamei* en el tratamiento 2 (TR2).

Los resultados en la lectura de las placas contenidas con CHROMOagar Vibrio™ se evidenció la permanente presencia en colonias cremas identificadas previamente como *V. alginolyticus*, pero con cargas normales en Zoea ( $4,51E+02$ ) y *V. vulnificus* ( $1,43E+00$ ). En contraste, las cargas bacterianas subieron en Mysis ( $1,39E+03$ ) lo que pudo indicar deficiencias en el producto o si bien; se lo relacionó con las condiciones ambientales, los cuales eran constantes en temperaturas de 32 - 37°C lo que pudo ocasionar su aparición. Finalmente, se pudo controlar debido a la dosificación que se incrementó de 5 a 7ppm/ton para PL, obteniéndose cargas inferiores de  $10^2$  (Figura 17).

### 9.3. Sensibilidad bacteriana (CMI)

A partir del ensayo *in vitro* se logró evidenciar la acción de los ácidos orgánicos observando la actividad inhibitoria frente al análisis de los antibiogramas con los presuntivos aislados bacterianos con agar TSA en las cepas de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, y *V. alginolyticus* identificados según lo señalado por Glackin et al., (2024) (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Resultados de los halos de inhibición (CMI)*

#### Tablas de Contingencia

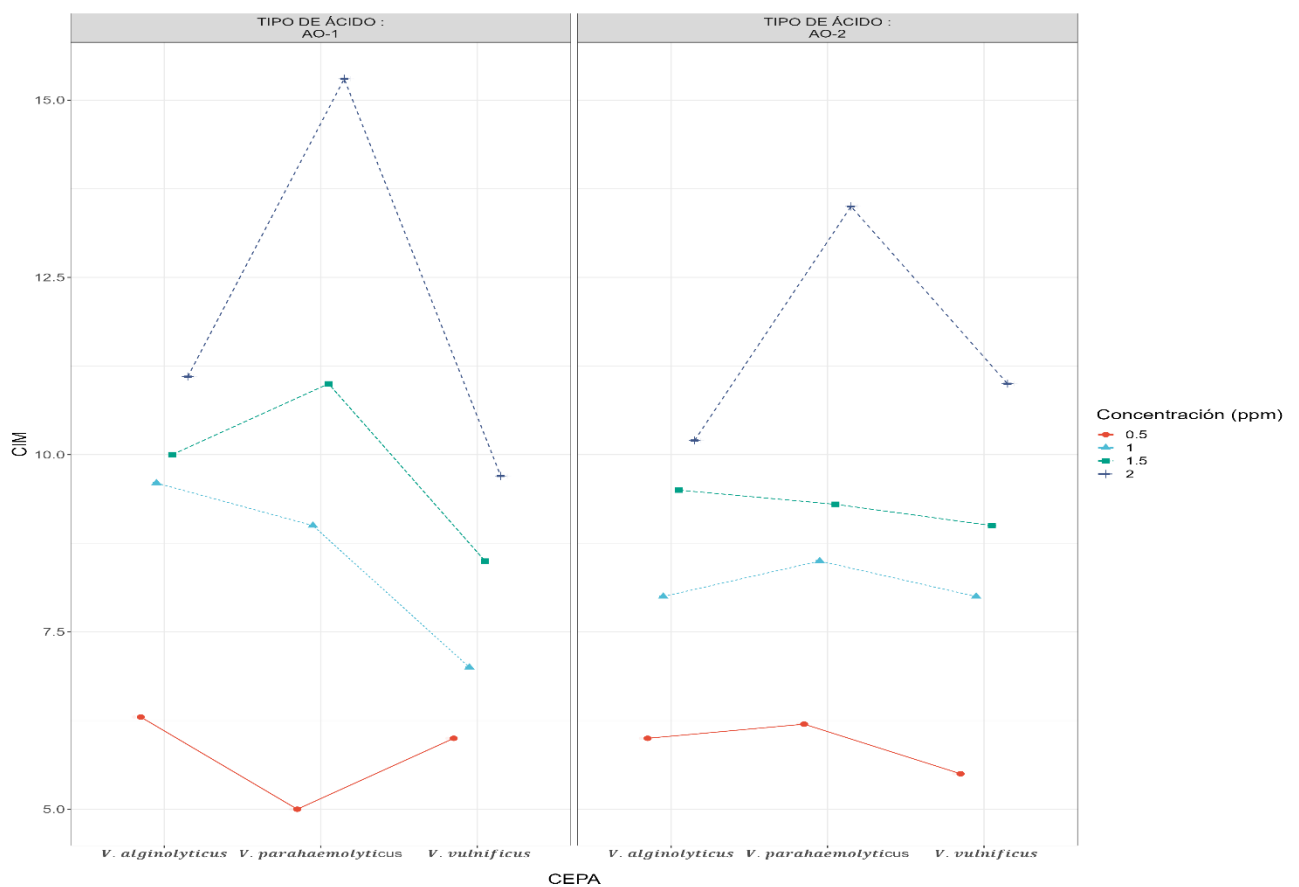
CONCENTRACIÓN ug/ml (expresados en %)	CEPA	TIPO DE ÁCIDO – Halos de inhibición (mm)		
		AO-1	AO-2	Total
0,50	<i>V. alginolyticus</i>	6.30	6.00	12.30
	<i>V. vulnificus</i>	6.00	5.50	11.50
	<i>V. parahaemolyticus</i>	5.00	6.20	11.20
1	<i>V. alginolyticus</i>	9.60	8.00	17.60
	<i>V. vulnificus</i>	7.00	8.00	15.00
	<i>V. parahaemolyticus</i>	9.00	8.50	17.50
1,50	<i>V. alginolyticus</i>	10.00	9.50	19.50
	<i>V. vulnificus</i>	8.50	9.00	17.50
	<i>V. parahaemolyticus</i>	11.00	9.30	20.30
2,00	<i>V. alginolyticus</i>	11.10	10.20	21.30
	<i>V. vulnificus</i>	9.70	11.00	20.70
	<i>V. parahaemolyticus</i>	15.30	13.50	28.80
<b>PROMEDIO</b>		<b>9.04 mm</b>	<b>8,73 mm</b>	

Nota. Tabla demuestra los aislados de *Vibrio spp* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*) tratados con mezclas sinérgicas de ácidos orgánicos (AO1 - AO2).

Según los datos mostrados en la Tabla 13 y la Figura 18, se evidencia la actividad bacteriostática de los ácidos orgánicos AO-1 y AO-2, con promedios de halos de inhibición que alcanzan desde 9,04 mm a 8,73 mm, respectivamente. Estas dos composiciones fueron analizadas frente a tres cepas de *Vibrio spp* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*) en diversas concentraciones en ppm (0,5, 1, 1,5 y 2).

**Figura 18**

Diagrama de Flexplot de acuerdo con los tratamientos con ácidos orgánicos (AO1 - A02).



*Nota.* El gráfico demuestra la proyección de cada tratamiento con respecto a su actividad bacteriostática contra 3 cepas de *Vibrio spp* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*)

### 9.3.1 Ácido orgánico 1 (AO-1)

De acuerdo con las réplicas obtenidas de los antibiogramas, el ácido AO-1 demuestra una mejora progresiva en la inhibición bacteriana con el aumento de la concentración. A 0.5 ppm, los halos de inhibición son relativamente pequeños obteniéndose rangos desde 5.00mm hasta 6.30 mm en las 3 cepas bacterianas. Con el aumento de la concentración a 1 ppm, se observa una mejora notable en la CMI. Por ejemplo, en *V. vulnificus* se obtuvo 7.00 mm, *V. alginolyticus* alcanzó 9,60mm y 9.00mm para *V. parahaemolyticus*. Al elevar la concentración a 1.5 ppm, los halos se amplían aún más, alcanzando rangos desde 8.50 mm hasta 11.00 mm.

Finalmente, a la concentración máxima de 2.0 ppm, se obtienen los mayores halos de inhibición: *V. vulnificus* consiguió 9.70 mm, 11.10 mm para *V. alginolyticus* y 15.30 mm en *V. parahaemolyticus*. Estos datos indican que el ácido AO-1 muestra efectividad en todas las concentraciones evaluadas, con su actividad antibacteriana incrementando de manera proporcional al aumento de la concentración.

### 9.3.2 Ácido Orgánico 2 (O2-2)

El ácido AO-2 también muestra una mejora en la inhibición con el aumento de concentración, pero con una eficacia generalmente inferior al AO-1 en todas las concentraciones. A 0.5 ppm, los halos de inhibición son de 6.00 mm para *V. alginolyticus*, 5.50 mm para *V. vulnificus*, y 6.20 mm para *V. parahaemolyticus*. La efectividad aumenta significativamente a 1 ppm, con halos de 8.00 mm para *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*, 8.50 mm para *V. parahaemolyticus*.

Por otro lado, aumentando la concentración a 1.5 ppm, los halos de inhibición son desde 9.00 mm a 9.30 mm, del mismo modo, a 2.0 ppm se constataron rangos desde 10.20 mm hasta 13.50 mm en todas las cepas evaluadas. Aunque los valores de AO-2 son menores en comparación con AO-1, muestran que este ácido también proporciona una inhibición significativa, aunque con una eficacia global más baja.

## 9.4 Variables productivas

### 9.4.1 Tasa de supervivencia

Para cada tratamiento, se calculó el porcentaje total de supervivencia, indicando una desviación de la normalidad, evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y heterogeneidad de varianzas, determinada por el test de Brown-Forsythe y el ANOVA de Welch. Dado que los supuestos indicaban un enfoque no paramétrico, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y pruebas de post-hoc de Dunn para el análisis correspondiente.

**Tabla 14**

*Supervivencia total por tratamiento en porcentaje.*

<i>Supervivencia total</i>	
<b>TRATAMIENTO 1 (TR1)</b>	<b>89%</b>
<b>GRUPO CONTROL (C-1)</b>	<b>72%</b>
<b>TRATAMIENTO 2 (TR2)</b>	<b>80%</b>
<b>GRUPO CONTROL (C-2)</b>	<b>76%</b>
<i>Nota. Cantidades totales en %.</i>	

El tratamiento 1 (TR1) mostró una supervivencia significativamente superior (89%) en comparación con el grupo control 1 (72%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Aunque el tratamiento 2 (TR2) también presentó una mejora en la supervivencia (80%) respecto al control con 76%, la diferencia observada es menos marcada (Tabla 14).

**Tabla 15**

*Análisis descriptivo de la supervivencia con respecto a cada tratamiento.*

**Descriptivos – Supervivencia%**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>N</b>	<b>Media ± DT</b>	<b>ET</b>	<b>CV</b>
C1	21	0.72 ± 0.04	0.0078	0.05
C2	21	0.76±0.080	0.017	0.10
TR1	21	0.89±0.045	0.0098	0.05
TR2	21	0.80 ±0.03	0.0054	0.031

*Nota:* N (Individuos), Valores expresados como media ± DS, ET: error típico, CV: coeficiente de variación.

El ANOVA de Welch (Tabla 16) identificó diferencias significativas en las tasas de supervivencia entre los tratamientos, con una suma de cuadrados para el tratamiento de 0.34 y un cuadrado medio de 0.10. El valor del estadístico F fue de 42.28, con un p-valor extremadamente bajo ( $6.23E^{-14}$ ), lo que confirma la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.



**Tabla 16***Análisis de ANOVA-Welch mediante la proyección de tratamientos.***ANOVA - Supervivencia individual**

<b>Corrección de Homogeneidad</b>	<b>Casos</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Welch	TRATAMIENTO	0.34	3.00	0.10	42.28	<b>6.23E<sup>-14</sup></b>
	Residuals	0.20	43.00	6.39 <sup>-3</sup>		

*Nota. Suma de Cuadrados Tipo III, F: estadístico, p=0,05***Tabla 17***Contraste de Igualdad de Varianzas (Brown-Forsythe) en postlarvas de L. vannamei en la supervivencia.***Contraste de Igualdad de Varianzas (Brown-Forsythe)**

	<b>F</b>	<b>df<sub>1</sub></b>	<b>df<sub>2</sub></b>	<b>p</b>
<b><i>Supervivencia individual</i></b>	9.71	1	82	<b>2.53E<sup>-3</sup></b>

*Nota. F: estadístico, p=0,05.*

Los resultados del contraste de Brown-Forsythe revelan una heterogeneidad significativa entre los grupos, porque el valor F de 9.71 indica una desigualdad siendo elevado e indicando una mayor disparidad en la variabilidad entre los grupos (Tabla 17). El valor p asociado con este contraste es extremadamente bajo ( $2.53E^{-3}$ ), lo que demuestra que las diferencias en las varianzas entre los grupos son estadísticamente significativas.

**Tabla 18**

*Contraste de Kruskal-Wallis en los tratamientos experimentales con respecto a la supervivencia.*

**Contraste de Kruskal-Wallis**

<b>Factor</b>	<b>K-W</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
<b>TRATAMIENTO</b>	49.78	3	<b>8.88E<sup>-11</sup></b>

*Nota.* KW: estadístico, p=0,05, dF1, gl= grados de libertad.

El estadístico de Kruskal-Wallis obtenido es de 49.78 asociados al factor "tratamiento". El valor p obtenido es extremadamente pequeño (8.88E<sup>-11</sup>), lo que indica que existe una diferencia significativa en la supervivencia entre al menos dos de los tratamientos (Tabla 18). Por tal motivo, se llevaron a cabo pruebas de comparaciones post-hoc de Dunn con correcciones de Bonferroni y Holm para evitar el error tipo I.

**Tabla 19**

*Comparaciones Post-hoc de Dunn con correcciones de Bonferroni y Holm.*

**Comparaciones Post-hoc de Dunn - TRATAMIENTO**

<b>Comparación</b>	<b>z</b>	<b>Wi</b>	<b>Wj</b>	<b>p</b>	<b>PBonf</b>	<b>pHolm</b>
C1 - TR1	-6.86	19.52	70.67	6.75E <sup>-12</sup>	4.05E <sup>-11</sup>	4.05E <sup>-11</sup>
C2 - TR2	-1.31	35.02	44.79	0.19	1.00	0.19
TR1 -TR2	3.47	70.67	44.79	5.15E <sup>-4</sup>	3.09E <sup>-3</sup>	2.06E <sup>-3</sup>

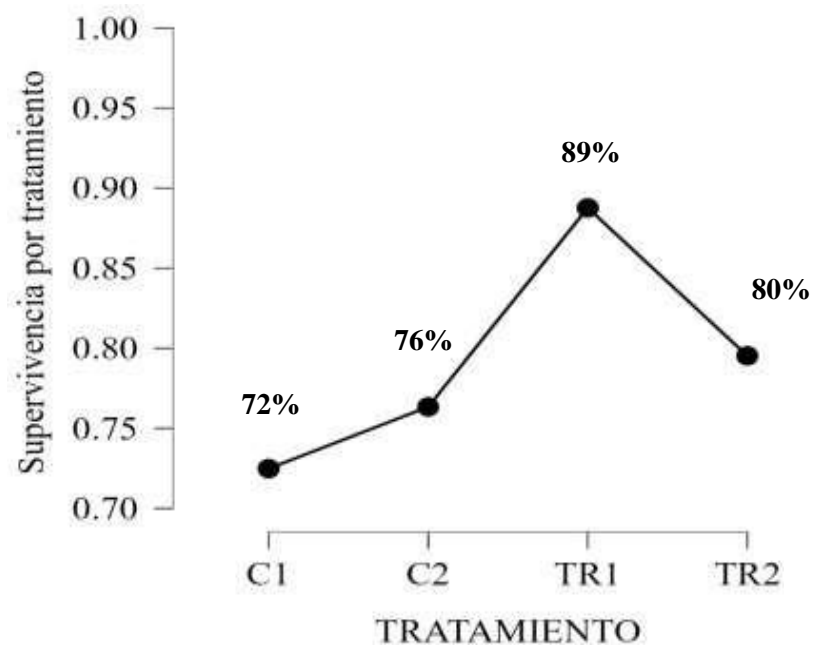
*Nota:* Valores expresados como **Wi**: rango sumado de observaciones en el grupo i; **Constante z**: estadística de prueba de deferencia; **Wj**: Rango sumado de observaciones en el grupo j; **Valor p**: (probabilidad); **pBonf**: Valor p ajustado a el método de Bonferroni para controlar el error tipo I; **pHolm**: Valor p ajustado a el método de Holm.

Las comparaciones post hoc de Dunn, ajustadas mediante las correcciones de Bonferroni y Holm, proporcionan un análisis detallado de las diferencias observadas. En la comparación entre los grupos experimentales C1 y TR1, se obtuvo un valor z de -6.86, con valores p ajustados de  $6.75E^{-12}$  (Bonferroni) y  $4.05E^{-11}$  (Holm), ambos significativamente  $< 0.05$ , lo cual indica una diferencia altamente significativa en la supervivencia, confirmando la superioridad del tratamiento TR1.

En contraste, durante el Tratamiento 2 (TR2) mostró una supervivencia del 80%, que fue ligeramente superior al 76% observado en el Control 2 (C-2). Sin embargo, la diferencia no alcanzó significancia estadística porque la prueba de Dunn arrojó un valor z de -1.31 y un p-valor  $0.19 > 0.05$ , indicando que no hay suficiente evidencia para concluir que TR2 mejora considerablemente la supervivencia en comparación con C-2. De la misma forma, se comparó los dos grupos con tratamientos de ácidos orgánicos (TR1 - TR2) revelando un valor z de 3.47, con valores p ajustados de  $5.15E^{-4}$  (Bonferroni) y  $2.06E^{-3}$  (Holm), ambos menores que el nivel de significancia ( $p < 0.05$ ), indicando una diferencia significativa (Tabla 19). Esto resalta que TR1 es más efectivo que TR2 en la mejoramiento de la supervivencia de las postlarvas de camarón *L. vannamei*, con una tasa de supervivencia del 89% para TR1 frente al 80% para TR2, lo cual respalda esta conclusión (Figura 19).

**Figura 19**

*Porcentaje total de supervivencia en los tratamientos experimentales*



## DISCUSIÓN

Mar Bravo - Salinas es una de las zonas más afectadas por las elevadas salinidades, condiciones que favorecen la proliferación de organismos oportunistas como los *Vibrio spp* (Acosta, 2022). Estos microorganismos se desarrollan en entornos con temperaturas altas y salinidades fluctuantes, lo que provoca inestabilidad y estrés en las larvas de camarón (*L. vannamei*). Villavicencio (2019, citado por Acosta, 2022) destaca la importancia de mantener un entorno estable y equilibrado para la salud de los cultivos acuícolas.

Según Nuez et al., (2020), una mezcla de ácidos orgánicos de cadena corta y media proporcionaron distintos beneficios directos como la reducción de la vibriosis y la prevención de infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*. Además, ofrece beneficios indirectos, como la reducción del pH del tracto digestivo, lo cual se logra disminuir el riesgo de colonización de patógenos en los tramos posteriores. También se menciona que los ácidos de cadena corta, como el ácido fórmico, el ácido propiónico y el ácido acético, fomentan la proliferación de microorganismos benéficos que optimizan la digestión y eliminan considerablemente *Vibrios* al perforar la membrana de la bacteria, lo que resulta en una mayor supervivencia y rendimiento zootécnico de los organismos cultivados.

Los resultados *in vitro* han confirmado que ambos tratamientos experimentales con ácidos orgánicos comerciales AO-1 - AO-2, poseen propiedades inhibitoras contra cepas patógenas como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* alcanzando los mayores halos de inhibición en concentraciones de 2ppm. La mayor efectividad observada en AO-1 en comparación con AO-2 sugiere diferencias en la composición y

sinergia de los componentes de estas mezclas, por lo que Khan et al., (2016, citado en Reyes, 2017), indican que la capacidad antimicrobiana de los ácidos orgánicos puede ser influenciada por múltiples factores, tales como la fórmula química del ácido, valor de pKa, concentración inhibitoria (IC) relacionada al microorganismo.

Por otro lado, Cabrera (2022) menciona que los ácidos orgánicos pueden actuar como compuestos bacteriostáticos y bactericidas según las concentraciones administradas. Silva et al., (2021) reportaron que los ácidos orgánicos frente a cepas de *Vibrio spp* presentaron un rango de inhibición bacteriana de 8,5 mm, lo cual en este estudio se consideró como valores intermedios para ambos grupos (AO-1: 9,04 mm a AO-2: 8,73 mm). Por tanto, cada ácido tiene su propio espectro de actividad microbiana, relacionado con un rango de pH específico, así como con la estructura y fisiología de las células microbianas, por lo que AO-1 mostró consistentemente mayores halos de inhibición, especialmente contra *V. parahaemolyticus*, lo cual es crucial, ya que esta cepa es particularmente virulenta y representa un riesgo significativo en la acuicultura (Reyes, 2017).

De igual manera, otro autor como Loo et al., (2023) menciona que el ácido fórmico indica características potenciales y basándose en el análisis microbiológico, concluyeron que presentó la mejor efectividad en la reducción de la población de *Vibrio*, con un porcentaje del 27% y 23% para las temperaturas de 25 °C - 35 °C, respectivamente. Según Acosta (2022), las concentraciones bacterianas en un medio de cultivo con temperaturas superiores a 37°C se clasifican de la siguiente manera: las concentraciones que superan 10<sup>3</sup> UFC/mL se consideran elevadas, mientras que aquellas que exceden 10<sup>5</sup>

UFC/mL se consideran severas. Tras el análisis microbiológico, realizado en estudio con las distintas combinaciones de ácidos orgánicos, la mezcla de AO1 del TR1 logró una notable reducción con niveles normales de *Vibrio spp* ( $6,72 \times 10^2$ ), con una tasa de supervivencia del 89%. Por otro lado, el TR2 registró cargas bacterianas elevadas de ( $4,21 \times 10^3$ ), con una supervivencia del 72% en ambos tratamientos a temperaturas controladas de 32.5°C a 34°C. Sin embargo, en el segundo ciclo las temperaturas eran variables con respecto al clima teniendo 36.5°C, el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos disminuyó. Esta disminución en la efectividad podría estar relacionada con la promoción del crecimiento de *Vibrios*, que se desarrollan óptimamente a una temperatura de 37°C (Rodríguez, 2020).

Sotomayor et al., (2019) corroboró que la combinación de ácidos orgánicos compuestos por ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico y formaldehído se destacó en generar una mayor sensibilidad en especies de *Vibrios*, por lo que esta actividad inhibidora se atribuye a la capacidad de los ácidos orgánicos para alterar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana e interferir con el metabolismo intracelular. Los tratamientos experimentales *in vivo* evaluados en la dieta convencional utilizando ácidos orgánicos mostraron que el tratamiento 1 (TR1) con AO-1 resultó en una mayor supervivencia de las postlarvas de camarón en comparación con el grupo control y el tratamiento con AO-2. Específicamente, el tratamiento 1 (TR1) demostró una supervivencia del 89%, atribuyéndose a su composición: ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, lactato de calcio y ácido láctico, superando significativamente al 72% del grupo control C-1.

El segundo tratamiento (TR2), compuesto por ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico, mostró una influencia en los resultados, aunque fue mínimamente significativa, con una tasa de supervivencia del 80% en comparación con el grupo control (C-2). No obstante, el grupo control C-2 no mostró resultados significativos y presentaba altas cargas bacterianas en TR2 durante el estadio de Mysis. Por ende, se administró 7 ppm por día (durante 24 horas) como primera dieta del día para observar si había cambios en los resultados finales. Este hallazgo es consistente con estudios que reportan mejoras en la salud y supervivencia de organismos acuáticos mediante el uso de aditivos dietéticos (Busti et al., 2020; Acosta, 2022).

En el estudio de Silva et al. (2021), se utilizaron concentraciones (0,25 ppm, 2 ppm, 0,35 ppm en mysis 0,5 ppm) bajas de ácidos orgánicos a lo largo de diferentes estadios de desarrollo. Estos niveles demostraron ser efectivos en mejorar la supervivencia y productividad de las larvas, así como en reducir la carga bacteriana de manera significativa. En el estudio actual se aplicó concentraciones ajustadas y más altas: 2-3 ppm en los estadios de Zoea a Mysis I-II-III, y 4-5 ppm en postlarvas (PL-12), con un rango máximo de hasta 7 ppm en casos extremos de alta carga bacteriana. Este enfoque mostró que concentraciones más altas también aportan beneficios considerables, especialmente en condiciones de alta carga bacteriana. En contraste, aunque las concentraciones más bajas del estudio de Silva et al., (2021) fueron efectivas, los beneficios adicionales observados con concentraciones más altas en el estudio actual sugieren que el uso de dosis superiores puede ofrecer ventajas adicionales en términos de control de patógenos y manejo de condiciones de cultivo adversas.



Otro estudio mencionado por Da Silva et al., (2013) confirmó el uso potencial de sales de ácidos orgánicos como aditivos en la dieta y la eficacia en el inhibir de forma *in vitro* tres serotipos de *Vibrio* (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. anguillarum*) a dos distintos rangos de pH (6.2 - 7.1) en un sistema de cultivo de camarón al emplearse sales de sodio de los ácidos láctico, cítrico, acético, butírico, fórmico y propiónico. Los mejores resultados más destacados se lograron en compuestos acidificantes como acetato, butirato, formiato y propionato de sodio.

En los estudios sobre el lactato de calcio y el ácido láctico en la larvicultura del camarón *L. vannamei* resaltan los beneficios de estos compuestos en la salud y resistencia a enfermedades de los camarones. Burel et al., (2021) descubrieron que la actividad antimicrobiana del ácido cítrico aumenta a un pH más alto, lo que implica que afecta a las propiedades de la superficie celular microbiana. Thompson et al., (2022) encontraron que las bacterias lácticas (BAL) como *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidolactici* inhibieron significativamente el crecimiento de *Vibrios* patógenos, sugiriendo su uso potencial en el cultivo de camarones para mejorar la resistencia a las enfermedades sin afectar los parámetros de crecimiento.

El ácido cítrico, al igual que otros ácidos orgánicos, funciona al reducir el pH del entorno, lo que crea un ambiente desfavorable para los patógenos. Por otro lado, el lactato de calcio no solo actúa como un agente antimicrobiano, sino que también proporciona una fuente adicional de calcio, lo que puede ser beneficioso para el desarrollo esquelético de las larvas de camarón (Mendoza, 2024).

La utilización de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el lactato de calcio puede ayudar a prevenir la proliferación de parásitos y bacterias patógenas en el agua de cultivo. Además, controlar parámetros como la temperatura y la salinidad, junto con la suplementación de ácidos orgánicos, puede mejorar el ambiente de cultivo, asegurando que las larvas de camarón crezcan en condiciones óptimas y saludables. Asimismo, el uso de bacterias ácido-lácticas como aditivos de agua puede mejorar la supervivencia larval al reducir el pH y aumentar la actividad enzimática digestiva (Talpur et al., 2012).

## 11. CONCLUSIONES

- El Tratamiento 1 (TR1) mostró los mejores resultados, indicando que la combinación de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, lactato de calcio y ácido láctico, fue la más efectiva. Este tratamiento redujo significativamente las cargas bacterianas de *Vibrio spp* ( $6,72 \times 10^2 \pm 7,77$ ) y logró una supervivencia del 89% en comparación con el Grupo Control (C-1).
- El Tratamiento 2 (TR2), compuesto por ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido láctico, también contribuyó a la reducción de la carga bacteriana. No obstante, la mejora en la supervivencia fue marginal, alcanzando un 80% en comparación con el 76% del grupo control. Además, la eficacia en la reducción de las cargas bacterianas fue inferior ( $1,01 \times 10^3 \pm 1,31$ ), en contraste con los resultados obtenidos con el Tratamiento 1 (TR1).
- De las cepas evaluadas, *V. parahaemolyticus* demostró ser la cepa más sensible al ácido AO-1, alcanzando CMI de 15.30 mm a 2 ppm.
- El tratamiento 1 (TR1) mostró una eficacia superior en la reducción de cargas bacterianas en todas las etapas de desarrollo (Zoea, Mysis, y Postlarvas) durante el Ciclo 1, con una disminución significativa en Mysis y mantenimiento de niveles bajos en Postlarvas ( $<10^2$ ).

## **11.RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar nuevas pruebas de validación en campo, cubriendo todo el ciclo de cultivo y probando diferentes dosis de productos en todas las etapas del cultivo de camarón.
- Además del uso de aditivos es crucial mantener prácticas adecuadas de manejo en las instalaciones de larvicultura.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M., & Muñoz, A. (2022). *Validación de estrategias profilácticas en larvicultura del camarón *Penaeus vannamei* en la provincia de Santa Elena, Mar Bravo* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena. 2022).  
<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8074/1/UPSE-TBI-2022-0020.pdf>
- Acosta, R. E., & Marcillo, F. (2016). *Análisis del Sector de Larvicultura del Camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sp. en el Ecuador; Énfasis en el mercado de insumos y comportamientos del sector* (Doctoral dissertation, ESPOL. FIMCM: Acuicultura).  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/54170/1/D-76551%20Acosta%20Espinoza.pdf>
- Aguirre-Chanta, L. E. (2019). *Efecto del neem (*Azadirachta indica*) y orégano (*Origanum vulgare*) en el crecimiento de *Vibrio* spp. resistentes a antibióticos, aislados de *Litopenaeus vannamei**. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/487>
- Álvarez Perero, C. D. (2022). *Comparación del rendimiento productivo del cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* entre la alimentación manual tradicional y alimentación automática temporizada en sistemas semi-intensivos* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022.).
- Anangonó Lara, C. A. (2014). *Eficiencia del uso de ácidos orgánicos en camarón* (Bachelor's thesis)  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/25104>
- Angulo, C., Loera-Muro, A., Trujillo, E., & Luna-González, A. (2019). *Control of AHPND by phages: a promising biotechnological approach*. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 989-1004.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12275>
- Arteaga, P. (2017). *Los ácidos carboxílicos*. *Boletín Científico*: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

- Asia-Pacific Economic Cooperation - APEC (2020). *Laboratory Guide: Methodologies for Antimicrobial Susceptibility Testing*.  
<https://aimp2.apec.org/sites/PDB/Supporting%20Docs/3425/Completion%20Report/CTI%2024%2017A%20Anx%203%20Laboratory%20Guide.pdf>
- Asanza, S. M. Y., Castillo, J. D. M., Calderón, C. E. S., Loaiza, S. G. M., Acosta, A. R. F., & Zuñiga-Moreno, L. E. (2024). *Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenida por ordeño manual*, 8(22), 69-83.  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S266409022024000100069&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S266409022024000100069&script=sci_arttext)
- Bai, S. C., Hamidoghli, A., & Bae, J. (2022). *Feed additives: an overview*. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*, 195-229.
- Benavides, E. & Jacome, S. A. M. (2023). *Efecto de los ácidos orgánicos en la carga bacteriana de Vibrios spp. en el camarón blanco (litopenaeus vannamei)*.  
[https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/21923/1/Trabajo\\_Titulacion\\_2201.pdf](https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/21923/1/Trabajo_Titulacion_2201.pdf)
- Bengtson, D. A., Léger, P., & Sorgeloos, P. (2018). *Use of Artemia as a food source for aquaculture*. In *Artemia biology* (pp. 255-286). CRC Press.  
<https://www.vliz.be/imisdocs/publications/2803.pdf>
- Beyer, H., & Walter, W. (2020). *Manual de química orgánica*. Reverte.  
<https://books.google.com.mx>
- Breath, S. O., Cough, O., Or, N. Feeling, I. (2021). *Particularidades del agar CHROMagar vibrio™ para aislamiento de Vibrios spp.*
- Bremer, E., & Krämer, R. (2019). *Responses of microorganisms to osmotic stress*. *Annual review of Microbiology*, 73(1), 313-334. [https://www.uni-marburg.de/de/fb17/fachgebiete/mikrobiologie/ag-bremer/publikationen/pdf-zu-reviews/rev\\_23.pdf](https://www.uni-marburg.de/de/fb17/fachgebiete/mikrobiologie/ag-bremer/publikationen/pdf-zu-reviews/rev_23.pdf)

- Burel, A., Céline, B Kala, L., & Purevdorj-Gage, L. (2021). *Impact of pH on citric acid antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. Letters in Applied Microbiology*, 72(3), 332-340. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099798/>
- Busti, S., Rossi, B., Volpe, E., Ciulli, S., Piva, A., D'Amico, F., Soverini, M., Candela, M., Gatta, P. P., Bonaldo, A., Grilli, E., & Parma, L. (2020). *Effects of dietary organic acids and nature identical compounds on growth, immune parameters and gut microbiota of European sea bass. Scientific Reports*, 10, 21321. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78441-9>
- Cámara Nacional de Acuicultura. (2024). *Estadísticas – Reporte de exportaciones ecuatorianas totales de camarones*. <https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/>
- Canales Machado, M. L., Cáceres Quiroz, O. J., & Flores Romero, J. J. (2017). *Comparación del crecimiento del camarón blanco Litopenaeus vannamei, en dos condiciones de estudio, salinidad óptima y salinidad cercana a cero* (Doctoral dissertation). <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/6943/1/240608.pdf>
- Carvajal, J. Y., & Bolaños Núñez, M. B. (2013). *Efecto de dos tipos de dietas: Comercial y Experimental sobre el crecimiento de camarones Litopenaeus vannamei en etapa de postlarvas* (Doctoral dissertation). [riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3107/1/225254.pdf](http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3107/1/225254.pdf)
- Cabrera Torres, N. K. (2022). *Estrategia de biorremediación para contrarrestar los efectos del vibrio sp. en el cultivo de camarón (litopenaeus vannamei)*. <https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/19772/1/ECUACA-2022-IAC-DE00008.pdf>
- Castro Morán, J. J., & Ordinola-Zapata, A. (2021). *La estrategia de ayuno y realimentación, una alternativa viable para optimizar el consumo de alimento balanceado en el cultivo semi-intensivo de camarón blanco Litopenaeusvannamei. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5).

- Cavalheiro, T. B., Carvajal, J. C. L., Lucena, R. F. P. D., Nascimento, C. V. C. D., & Ribeiro, T. T. B. C. (2022). *Water parameters correlated with the zootechnical performance of shrimp Litopenaeus vannamei grown in oligohaline waters*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 45, e57700. <https://www.scielo.br/j/asas/a/FMhdTWkJtrXC9VsQKd9tkZM/>
- Chávez Alcívar, M. D., & Llanos Fernández, K. K. (2015). *Estudio de la actividad antibacteriana de diferentes ácidos orgánicos sobre distintas bacterias Gram negativas de importancia en la industria acuícola* (Bachelor's thesis). <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/29554/1/D-76456%20Llanos%20Fern%C3%A1ndez>
- Chávez Castillo, E. J. (2022). *Determinación de tres tipos de alimento natural para el estadio de mysis y en el cultivo larvario de Litopenaeus vannamei*. <https://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/19775>
- Chowdhury, M. A. K., Song, H., Liu, Y., Bunod, J. D., & Dong, X. H. (2021). *Effects of microencapsulated organic acid and their salts on growth performance, immunity, and disease resistance of Pacific White Shrimp Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 13(14), 7791. <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/14/7791>
- Correa Coello, L. R. (2018). *Beneficios de la aplicación de probióticos durante el cultivo de engorde del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) en Ecuador*. [https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12908/1/DE00007\\_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf](https://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/12908/1/DE00007_EXAMENCOMPLEXIVO.pdf)
- Da Silva B.C., F.d.N. Viera, J.L. Mouriño, G.S. Ferreira, W.Q. Seiffert. (2013). *Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition*. *Aquaculture*.384-387:104-110. [https://www.academia.edu/download/45354097/Salts\\_of\\_organic\\_acids\\_selection\\_by\\_mult20160504-7424-1osptba.pdf](https://www.academia.edu/download/45354097/Salts_of_organic_acids_selection_by_mult20160504-7424-1osptba.pdf)
- De Souza Valente, C., & Wan, A. H. (2021). *Vibrio and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201120302330>



- Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L., & Tantillo, G. (2021). Comparison between thiosulfate-citrate-bile salts sucrose agar (TCBS) and CHROMagar Vibrio to isolate *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 22(1), 124-127. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510001957>
- Droubogiannis, S., & Katharios, P. (2022). *Genomic and biological profile of a novel bacteriophage, Vibrio phage Virtus, which improves survival of Sparus aurata larvae challenged with Vibrio harveyi*. *Pathogens*, 11(6), 630. <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/6/630>
- Elgoul, A. (2016). *Retos de la producción de larvas del Ecuador*. Salinas, Ecuador. [https://issuu.com/revista-cna/docs/aqua\\_cultura\\_115](https://issuu.com/revista-cna/docs/aqua_cultura_115)
- Estrada-Pérez, N., Estrada-Pérez, M., Ruiz-Velazco, J. M. J., Zavala-Leal, I., Valdéz-González, F. J., Cuevas-Rodríguez, B. L., & González-Huerta, C. A. (2022). *Predicción de la producción semi-intensiva de Penaeus vannamei utilizando modelos de regresión lineal simple: un análisis de la importancia de las variables ambientales y de manejo*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2007-33802022000100418&lng=es](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-33802022000100418&lng=es)
- Galaviz Silva, L., Pérez Treviño, K. C., Gutiérrez Salazar, G. J., & Molina Garza, Z. J. (2016). *Agentes infecciosos de Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) y su relación con parámetros físicoquímicos de tres diferentes sistemas de cultivo en el golfo de México*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 134-139. <http://eprints.uanl.mx/23889/1/99.pdf>
- Galaviz-Silva, L., Robles-Valdez, A., Sánchez-Díaz, R., Ibarra-Gamez, J. C., Gómez-Gil, B., & Molina-Garza, Z. J. (2021). *Cepas de Vibrio parahaemolyticus que causan necrosis hepatopancreática aguda en camarón cultivado de Sonora, México y su resistencia a antibióticos*. *Hidrobiológica*, 31(2), 111-123.
- Gao, R., Liu, H., Li, Y., Liu, H., Zhou, Y., & Yuan, L. (2023). *Correlation between dominant bacterial community and non-volatile organic compounds during the fermentation of shrimp sauces*. *Food Science and Human Wellness*, 12(1), 233-241.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453022001094>

García, J. M., Hernández Zuniga, A. J., & Narváez Miranda, M. I. (2020). *Comparación de la sobrevivencia de post-larva de camarón Litopenaeus vannamei, cultivados a densidades de 45 y 70 individuos/m<sup>2</sup> utilizando aireación y recambios de agua respectivamente, en las instalaciones de laboratorio LIMA. Las Peñitas septiembre 2019* (Doctoral dissertation).

<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/7778/1/244633.pdf>

Garnica, F. (2016). *Rediseño del sistema térmico para la producción de nauplios de camarón* (Bachelor's thesis).

<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/36934/1/D-CD88353.pdf>

Glackin, C. C., Dupke, S., Chandra, T. S., Riedinger, D., & Labrenz, M. (2024). *Combined TCBS and CHROMagar Analyses Allow for Basic Identification of Vibrio vulnificus within a 48 h Incubation Period in the Coastal Baltic Sea. Microorganisms*, 12(3), 614. <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/3/61>

González Serrano, G. M. (2022). *Análisis del crecimiento de larvas de camarón Litopenaeus vannamei en el laboratorio LARVALABSO, Mar Bravo–Ecuador* (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022).

<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8075/1/UPSE-TBM-2022-0008.pdf>

Gümrükçüoğlu, N. (2022). *Antimicrobial Organic Acids. Research & Reviews in Health Sciences*.

Gutiérrez Pérez, E. D. (2024). *Estabilidad ecológica en sistemas acuícolas: un enfoque holobiómico para la gestión sostenible de la producción de camarón*.

[http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3209/gutierrez\\_e%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3209/gutierrez_e%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). *Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) against Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 70, 164-173. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464817305181>
- Hernández, V., & Jiroó, I. (2023). *Remoción de nutrientes (N y P) en un sistema acuapónico utilizando Salicornia bigelovii en co-cultivo con camarón blanco Penaeus vannamei a diferentes niveles de salinidad*. [http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/handle/DGB\\_UAS/395](http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/handle/DGB_UAS/395)
- Jaramillo, F. Y. V., Apolo, N. J. V., & Sotomayor, J. G. (2019). *La productividad del sector camaronero en la Provincia de El Oro y su impacto al medio ambiente*. *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(1), 39-44. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/download/240/260/>
- Joshi, J. Srisala, J., Truong, V. H., Chen, I. T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C. F., Flegel, T. W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. (2014). *Variation in Vibrio parahaemolyticus isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)*. *Aquaculture*. 428-429: 297-302. [http://marine.chanthaburi.buu.ac.th/old/file\\_research/2014-01.pdf](http://marine.chanthaburi.buu.ac.th/old/file_research/2014-01.pdf)
- Kabir Chowdhury, M. A., Song, H., Liu, Y., Bunod, J.-D., & Dong, X.-H. (2021). *Effect of Microencapsulated Organic Acid and Their Salts on Growth Performance, Immunity, and Disease Resistance of Pacific White Shrimp Litopenaeus vannamei*. *Sustainability*, 13(14) <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/14/7791>
- Li, E., Xu, C., Wang, X., Wang, S., Zhao, Q., Zhang, M., ... & Chen, L. (2018). *Gut microbiota and its modulation for healthy farming of Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei*. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(3), 381- 399.
- Li, Z., Tang, X., Li, J., & He, Y. (2021). *Comparative proteomic and transcriptomic analysis reveals high pH-induced expression signatures of Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis*. *Functional & Integrative Genomics*, 21(2), 299-311. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10142-021-00779-8>

- Lombana, S. M., Gómez, O. T., & Matamoros, K. N. (2016). *Evaluación de la carga bacteriana y resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta influencia de producción larvaria en Ecuador*. Revista del Instituto de investigación de la Facultad de minas, metalurgia y ciencias geográficas, 19(38), 137-146. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/download/13580/11991>
- Loor Intriago, E. D., & Plaza Álava, E. J. (2023). *Evaluación de tratamientos para reducción de Vibrio en piscinas camaroneras por medio de pruebas microbiológicas*. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/60784/1/T-114243%20INGE-2215.pdf>
- Mendoza, A. A., Delgado, H. R. B., Seañez, A. R. R., & Hernández, H. H. (2024). *Estudio de los cambios químicos en microensilados de exoesqueletos de camarón (Litopenaeus vanamei) y chapulín (Sphenarium purpurascens) durante la fermentación en medio sólido*. Biotecnia. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/download/1976/997>
- Mira-Gutiérrez, J., & García-Martos, P. (2016). *Vibrios de origen marino en patología humana*. Revista Aquatic, (2). <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/15/0>
- Mine, S., & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. Current Microbiology, 63(1), 1-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21479932/#:~:text=Among%20four%20acids%20C%20formic%20acid%20showed%20the%20strongest,to%20be%20the%20pH%20effect%20of%20organic%20acids>.
- Ng, W. K., & Koh, C. B. (2017). *The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals*. Reviews in Aquaculture, 9(4), 342-368. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/raq.12141>
- Nuez-Ortín, W. G., Isern-Subich, M. M., & Guérin, M. (2020). Organic acids–synergy at work to prevent vibriosis and promote growth in shrimp. *AQUACulture Asia Pacific Junho*, 37-51. <https://www.adisseo.com/wp-content/uploads/2023/06/2020-03->

bactinil-disease-prevention-in-shrimp-aqua-culture-asia-pacific-mayjune-2020-lr-2-2.pdf

- Orrala Sandoval, G. L. (2021). *Comparación de producción larvaria de distintas maduraciones en el laboratorio Incamar-alfamarina, San Pablo-provincia de Santa Elena (Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2021.)*  
<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6585/1/UPSE-TBM-2021-0007.pdf>
- Palacios Méndez, L. R. (2024). *Cultivo de camarón blanco (Penaeus vannamei) con agua subterránea en Guasave, Sinaloa.*  
<https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/5165>
- Peña Osorio, L. J., & Cuéllar-Anjel, J. (2019). *Vibriosis en camarón blanco del pacífico Penaeus vannamei.* [Reporte de caso, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales]. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/2755>
- Peña-Navarro, N. (2019). *Presencia y factores de riesgo en Whispovirus, Vibrio parahaemolyticus (AHPND) y Enterocytozoon hepatopenaei en camarones de cultivo en Costa Rica.*  
<https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/22005/Nelson%20Pena%20Navarro.pdf?sequence=1>
- Pereira, J. S. (2022). *Análisis del sector camaronero de la provincia de El Oro, Ecuador (Bachelor's thesis, Guayaquil: ULVR.*  
<http://repositorio.ulvr.edu.ec/bitstream/44000/5911/1/T-ULVR-4838.pdf>
- Kumarage, P. M., De Silva, L. A. D. S., & Heo, G.-J. (2022). *Aquatic environments: A potential source of antimicrobial-resistant Vibrio spp. Journal of Applied Microbiology, 133(4), 2267-2279.* <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jam.15702>
- Quintuña, F. (2023). *Evaluación de probióticos comerciales en el crecimiento, supervivencia y estado sanitario del camarón blanco Litopenaeus vannamei cultivado bajo condiciones de laboratorio (Bachelor's thesis, La Libertad:*

- Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2023).  
<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/10132/1/UPSE-TBM-2023-0003.pdf>
- Rabeharitsara, A. T., Esperance, S. D. M., Randriamanantena, N. I. E., Mampitefa, R. F., & Randriana, N. R. (2020). *Esterification Between Citric Acid and Callistemon citrinus, Rice-Husk, Garcinia dulcis Catalysed by Citric Acid's H-Monomers and Polymers Formation Mechanism. American Journal of Applied Chemistry*, 8(2), 31-54.
- Reyes León, G. S. (2017). *Efecto sinérgico antimicrobiano in vitro de ácidos orgánicos y fitoquímicos, frente a vibrio parahaemolyticus, potencialmente patógenos aislados de cultivos de camarón Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) (Master's thesis, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC).*  
[http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3065/reyes\\_g%20TE SIS.pdf?sequence=1](http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3065/reyes_g%20TE%20SIS.pdf?sequence=1)
- Reyes, J. K. (2018). *Sensibilidad bacteriana a agentes terapéuticos utilizados para controlar problemas bacterianos en larvicultura de Penaeus Litopenaeus vannamei.*  
<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4432/1/UPSE-TBM-2018-0009.pdf>
- Reyes-Mero, A. J. (2021). *Principales agentes infecciosos asociados al cultivo del camarón blanco Penaeus vannamei reportados en Ecuador durante el periodo 2010-2021.*  
<https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/6640>
- Rodríguez, M. V. I., Mesa, L. G., Guilarte, E. O., Valcárcel, C. M. Á., Gallardo, G. M. L., & Moreira, R. R. N. (2020). *Influencia del pH y la concentración de NaCl en el crecimiento y emisión de luz de dos cepas de Vibrio harveyi. Biotecnología Aplicada*, 37(4), 4211-4217. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2020/ba204b.pdf>
- Rojas, A. A. (2018). *Comparación financiera del cultivo de camarón entre el sistema semi intensivo y el hiper intensivo en la finca Videmar ubicada en Jama, Manabí, Ecuador (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2018).*  
<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6293/1/AGN-2018-T035.pdf>
- Rodríguez, P. (2022). *Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos.* En XVI Curso de Especialización FEDNA. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de

Madrid. <https://fedna.biolucas.com/wp-content/uploads/2022/02/00CAP8.pdf>

San Frutos de Diego, R. (2019). *Estudio teórico de la estructura y propiedades espectroscópicas de los ácidos fórmico y acético.*

<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/36026/TFG-G3543.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sandoval Cabrera, L. S. (2023). *Papel de la salinidad, temperatura y pH sobre el nivel de expresión de mRNA de las toxinas PirA y PirB en vibrio Parahaemolyticus* (Doctora dissertation). <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/9730/1/253113.pdf>

Sardar, P., Shamna, N., & Sahu, N. P. (2020). *Acidifiers in aquafeed as an alternate growth promoter: A short review. Animal Nutrition and Feed Technology*, 20(2), 353-366.

[https://www.researchgate.net/profile/Parimal-Sardar/publication/342437859\\_Acidifiers\\_in\\_Aquafeed\\_as\\_an\\_Alternate\\_Growth\\_Promoter\\_A\\_Short\\_Review/links/5ef461f8299bf15a2ea09958/Acidifiers-in-Aquafeed-as-an-Alternate-Growth-Promoter-A-Short-Review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Parimal-Sardar/publication/342437859_Acidifiers_in_Aquafeed_as_an_Alternate_Growth_Promoter_A_Short_Review/links/5ef461f8299bf15a2ea09958/Acidifiers-in-Aquafeed-as-an-Alternate-Growth-Promoter-A-Short-Review.pdf)

Silva, F. X. (2021). *Type IV pili and their role in virulence in Vibrio vulnificus.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=301629>

Silva, J., Jiménez, I., Vivas, J., Mayer, L., & Figueredo, A. (2021). *Algunas experiencias usando ácidos orgánicos para optimizar el desempeño de una larvicultura comercial de camarón blanco, Penaeus vannamei.*

Skretting. (2018). *Manual de Larvicultura.* <https://libreriascretting.ec/admin/public/uploads/catalogos/manual-larvicultura-skretting.pdf>

Sony, M., Sumithra, T. G., Anusree, V. N., Amala, P. V., Reshma, K. J., Alex, S., & Sanil, N. K. (2021). *Antimicrobial resistance and virulence characteristics of Vibrio vulnificus, Vibrio parahaemolyticus and Vibrio harveyi from natural disease outbreaks of marine/estuarine fishes. Aquaculture*, 539, 736608. [http://eprints.cmfri.org.in/15139/1/Aquaculture\\_2021\\_Sumithra%20T%20G.pdf](http://eprints.cmfri.org.in/15139/1/Aquaculture_2021_Sumithra%20T%20G.pdf)

- Soriano, R. R. (2017). *Efecto de la harina de espirulina *Arthrospira platensis* como complemento alimenticio sobre el crecimiento y supervivencia de la zoea y mysis de *Litopenaeus vannamei** [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Tumbes]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/347>
- Sotomayor, M. A., Reyes, J. K., Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Maldonado, M., & Bayot, B. (2019). *Efficacy assessment of commercially available natural products and antibiotics, commonly used for mitigation of pathogenic *Vibrio* outbreaks in Ecuadorian *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* hatcheries. *PloS one*, 14(1), e0210478. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210478>*
- Su X., Li, X. Leng, C. Tan, B. Liu, X. Chai, T. (2014). *The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. *Aquacult. Int.* 22(6):1823-183* <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-014-9785-3>
- Teng T, Liang L, Chen K, Xie J, Xu, P (2017) *Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei**. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186135>
- Tinoco, Y. G., & Dreyfus, G. (2017). *Motilidad de las bacterias marinas del género *Vibrio**. *Revista de Educación Bioquímica*, 34(4), 98-108. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2015/reb154c.pdf>
- Thompson, J. S., Weaver, B. A., Lupatsch, I., Shields, R. J., Plummer, S., Coates, C. J., & Rowley, A. F. (2022). *Antagonistic activity of lactic acid bacteria against pathogenic vibrios and their potential use as probiotics in shrimp (*Penaeus vannamei*) culture*.
- Triviño De la Cruz, K. D., & Ortiz Tirado, J. C. (2020). *Evaluación de diferentes concentraciones de algas marinas *Phycovax*® en dietas balanceadas para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en etapa de pre-cría y su impacto en la supervivencia en una producción semi-intensiva*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/37532/1/IASA-TIC-0078.pdf>.



- Valenzuela-Cobos, J., Vargas, C., Garcés, F., Grijalva, A., & Marcillo, R. (2020). *Biocontrol of the vibriosis in the white shrimp (Litopenaeus vannamei) using organic acids in the feeding*. *Revista Egipcia de Biología Acuática y Pesca*, 24(5), 279-287. [https://ejabf.journals.ekb.eg/article\\_104727\\_67ab1e831d49a15e975722488c898cfb.pdf](https://ejabf.journals.ekb.eg/article_104727_67ab1e831d49a15e975722488c898cfb.pdf)
- Varela, A., Peña, N. (2016). *Histopatología diferencial de tres enfermedades bacterianas que afectan la hepatopáncreas de camarones peneidos*. *Rev. Agron. Mesoam.* 27(1): 73-80. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212016000100073&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212016000100073&script=sci_arttext)
- Varela, A., Peña-Navarro, N., Aranguren-Caro, L. F. (2017). *Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en Penaeus vannamei*. *Revisión bibliográfica. Agron. Mesoam.* 28(3): 735-745. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v28n3/43752453016.pdf>
- Varela-Mejías, A. (2018). *Patologías del hepatopáncreas en camarones marinos cultivados en América y su diagnóstico diferencial mediante histopatología*. *AquaTIC*, (50)-13-30. <https://www.redalyc.org/journal/494/49460101003/49460101003.pdf>
- Vivanco, J. D. (2018). *Estudio de factibilidad para el establecimiento de tanques pre criaderos de camarón (Litopenaeus vannamei) para la camaronera Limonver, Machala-El Oro-Ecuador* (Doctoral dissertation, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2018.). <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6306/1/AGN-2018-T042.pdf>
- Xu, Y. G., Sun, L. M., Wang, Y. S., Chen, P. P., Liu, Z. M., Li, Y. J., & Tang, L. J. (2017). *Simultaneous detection of Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay*. *Food Control*, 71, 64-70. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516303310>

- Zambrano Vera, C. J. (2023). *Aislamiento y caracterización de bacterias responsables de enfermedades en el camarón *Penaeus vannamei*, determinando su caracterización bioquímica y su respuesta a la susceptibilidad a diferentes patógenos comerciales* (Bachelor's thesis, <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/9670/4/UPSE-TBI-2023-0028.pdf>)
- Zhang XH, He X, Austin B. (2020). *Vibrio harveyi: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42995-020-00037-z>
- Zhou, C., Song, H., Feng, J., Hu, Z., Yang, M. J., Shi, P., ... & Zhang, T. (2022). Metabolomics and biochemical assays reveal the metabolic responses to hypo-salinity stress and osmoregulatory role of cAMP-PKA pathway in *Mercenaria mercenaria*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4110-4121.

## ANEXOS



**Anexo 1.** Insumos y materiales de laboratorio para bacteriología.



**Anexo 2.** Realización de diluciones seriadas.



**Anexo 3.** Aislamiento y siembra realizando microbiología.



**Anexo 4.** Antibiograma – ICM.

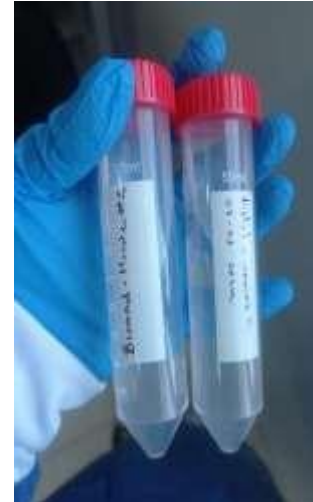




**Anexo 5.** Aislamiento de cepas de *Vibrios spp*



**Anexo 6.** Conteo de CFU.



**Anexo 7.** Ácidos orgánicos.



**Anexo 8.** *Artemia salina*



**Anexo 9.** Estadio de Nauplio V.



**Anexo 10.** Estadio de Zoea



**Anexo 10.** Revisión de estado de Nauplios para la siembra.



**Anexo 11.** Estadio de Mysis



**Anexo 11.** Estadio de Postlarvas (PL).



## Anexo 12. Bitácora sobre los parámetros fisicoquímicos controlados en dos ciclos de cultivo

The image shows two pages of a logbook from SANLAB. The left page is dated 16/01/2024 and the right page is dated 29/01/2024. Both pages contain a grid with columns for various parameters and rows of handwritten data. The data appears to be organized in a table format, likely recording physicochemical parameters over time.



Anexo 13. Personal de la empresa



# ACCIÓN PROFILÁCTICA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS COMERCIALES FRENTE A *Vibrios spp* EN SISTEMA DE CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE *Litopenaeus vannamei*

**2%** Textos sospechosos

**1%** Similitudes

- 0% similitudes entre comillas
- 0% entre las fuentes mencionadas
- < 1% Idiomas no reconocidos

Nombre del documento: ACCIÓN PROFILÁCTICA DE ÁCIDOS ORGÁNICOS COMERCIALES FRENTE A *Vibrios spp* EN SISTEMA DE CULTIVO SEMI-INTENSIVO DE *Litopenaeus vannamei*.docx  
ID del documento: ac2e56cff7f289da15538eecbc90948426c577c  
Tamaño del documento original: 1,19 MB  
Autor: Stephany Solano Soriano

Depositante: Stephany Solano Soriano  
Fecha de depósito: 8/7/2024  
Tipo de carga: url\_submission  
fecha de fin de análisis: 8/7/2024

Número de palabras: 17.692  
Número de caracteres: 117.626

Ubicación de las similitudes en el documento:



## Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<a href="http://www.dspace.espol.edu.ec">www.dspace.espol.edu.ec</a> https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/210/1/350.pdf 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (50 palabras)
2	<a href="http://idear.espol.edu.ec">idear.espol.edu.ec</a> https://idear.espol.edu.ec/sites/default/files/posters/edicion_x/Póster_Loor_Plaza.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (31 palabras)

## Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<a href="http://dspace.cibnor.mx">dspace.cibnor.mx</a> http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/3065/reyes_g_TESIS.pdf?sequence=1	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (39 palabras)
2	<a href="http://repositorio.unu.edu.pe">repositorio.unu.edu.pe</a> http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/UNU/4006/1/00003620T-ECONOMIA.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (34 palabras)
3	<a href="http://repositorio.unu.edu.pe">repositorio.unu.edu.pe</a> http://repositorio.unu.edu.pe/bitstream/handle/UNU/4839/UNU_MAESTRIA_2020_TM_KENIA-GALAN...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (30 palabras)
4	<a href="http://repositorio.ucsg.edu.ec">repositorio.ucsg.edu.ec</a> http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/13390/3/T-UCSG-PRE-TEC-IEM-234.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (21 palabras)
5	<a href="http://www.medigraphic.com">www.medigraphic.com</a> https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2015/reb154c.pdf	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (22 palabras)

**Fuente mencionada (sin similitudes detectadas)** Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

1	<a href="https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/">https://www.cna-ecuador.com/estadisticas/</a>
---	---